



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMA COM PRODUTO REPELENTE DE
INSETOS E METODOLOGIA ANALÍTICA

MARCIO COSTA MIRANDA

Orientador: Dra. Sheila Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Agosto de 2005

M672d

Miranda, Marcio Costa.

Desenvolvimento de lipossoma com produto repelente de insetos e metodologia analítica/ Marcio Costa Miranda. – Rio de Janeiro: UFRJ/ FF, 2005.

xviii, 130f.: il.; 31 cm.

Orientador: Sheila Garcia

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Faculdade de Farmácia/
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005.

Referências Bibliográficas: f. 102-108.

1. Repelente. 2. DEET. 3. Lipossoma. 4. Fosfatidilcolina. 5. *Aedes aegypti*. I. Miranda, Marcio Costa. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 668.55



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMA COM PRODUTO REPELENTE DE
INSETOS E METODOLOGIA ANALÍTICA**

MARCIO COSTA MIRANDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Faculdade de Farmácia da Universidade
Federal do Rio de Janeiro.

APROVADA EM 30/08/2005.

Profª _____ Dra. Sheila Garcia
Adjunto - Faculdade de Farmácia/UFRJ

Profª _____ Dra. Elisabete Pereira
Titular - Faculdade de Farmácia/UFRJ

Prof _____ Dr. Claudio Cerqueira Lopes
Adjunto - Instituto de Química/UFRJ

Prof. _____ Dr. Hélio de Mattos Alves
Adjunto - Faculdade de Farmácia/UFRJ

**Rio de Janeiro
2005**

A Deus,

Agradeço enquanto viver pela força, graça, segurança,
paz e saúde. Pelo grande incentivo e cuidado em todas
as áreas da minha vida.

Dedico aos meus filhos Renata e Vinicius, aos meus pais Tenir (in memorian) e Paulina e a minha esposa Lilia que sempre incentivou minha trajetória como pessoa e profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus Cristo por me conceder a feliz oportunidade de estar aqui.

Aos prezados companheiros de profissão, Cel Farm Haroldo e Cel Farm Goulart do LQFEx, por me darem a oportunidade de ingressar no Programa de Mestrado e pelo apoio no cumprimento desta missão.

Aos companheiros do LQFEx: Maj William, Cap Moisés, Cap Vânia, Cap Sandra, Cap Cristiane, Cap Eduardo, Cap Maurício, Ten Figueiredo, Ten Leandro Pereira, Ten Leandro, Ten Dora, Ten Luciana Azevedo, Ten Nogueira, Ten Mairink, Ten Carla Cristina e SC Vilma pela tranquilidade e pelo apoio para a realização deste trabalho.

À Dra. Sheila Garcia, a quem chamo carinhosamente de “minha teatcher,” por aceitar ser a minha orientadora. Pelas sugestões, críticas e incentivos que muito valeram para elaboração e conclusão desta dissertação. Pela amizade e paciência além do crédito a mim confiado.

Ao Diretor do Instituto de Biologia do Exército, Cel Med Ferrari que muito colaborou para a realização dos ensaios biológicos e todo o pessoal desta Instituição que muito honra o Brasil pela sua história e suas tradições.

A Dra. Denise Valle pela confiança, pela orientação nos ensaios biológicos e por me fazer “quase” gostar mais dos mosquitos.

Ao companheiro Ademir pela ajuda nas planilhas e pelas dicas imprescindíveis nas análises estatísticas dos ensaios biológicos.

Aos colegas da Seção de Entomologia Dr José Bento, Dra Jutta, Dra Isabella, Eliane, Gilberto, Tânia, Nathalia, Camila, Luana, Rose, Thiago, Priscila, Gustavo, Aline Lima, Diogo, Patrícia e Rosangela.

Ao senhor Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRJ, Professor Dr. Eliezer J. Barreiro.

Ao amigo Prof. Dr Hélio de Mattos Alves pelo incentivo e pelos anos de amizade.

Ao Prof Dr Cláudio Lopes pela contribuição com o DEET sintetizado no Laboratório de síntese e análises de produtos estratégicos (Lasape) que muito contribuiu para a realização dos experimentos.

A Dra. Elisabete Pereira dos Santos do Laboratório de desenvolvimento galênico da Farmácia Universitária.

A Dra. Glória Soares do Laboratório de microscopia eletrônica PEMN, COPPE/UFRJ.

A Bianca Waruar pelo apoio na determinação do tamanho médio dos lipossomas.

Aos colegas de LabCQ Prof. Dra. Nádia Maria Volpato, Prof Dra Valéria Pereira de Souza, Prof Dr. Luís Maurício Tambaioli, Eliane, Vivian, Laís, Bianca, Tailane e Catarina, pelas horas de convívio e aprendizado.

Aos colegas de Pós-Graduação Renata, Emeli, Bianca, Edilene, Tatiana, Débora, Magda, Aline, Vinícius e Mariana pelos momentos agradáveis que desfrutamos.

Aos colegas Ana Ribeiro e Marcio Robert um agradecimento especial pelos momentos de batalha e ensinamentos diários. Por todas as horas de “fantasmas” que passamos, que nossas amizades sejam eternas.

Aos meus leais colaboradores que “deram o sangue” para a realização dos ensaios biológicos: Bruno Jorge de Carvalho Ribeiro, Luiz Antonio Nunes Bonjour, Leandro Fernandes Vianna, Maurício Antonio Silva, Estevam Jesus de Oliveira, Ulysses Santos de Jesus, Marcio Padilha Soares e Diogo Fernandes Bellinato, o meu eterno agradecimento. Vocês são o que se diz na gíria: “SANGUE BOM”, valeu !

A minha esposa Lilia que em tudo ajudou. Você é meu braço direito. Obrigado.

Sou grato, ainda, a todas as outras pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

	Pg
LISTA DE SÍGLAS E ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 A pele	2
2.2 Os mosquitos	3
2.2.1 Taxonomia dos Mosquitos	3
2.3 Algumas doenças transmitidas por mosquitos	7
2.3.1 Malária	8
2.3.2 Dengue e Febre amarela	9
2.3.3 Filariose linfática	10
2.4 Os Repelentes de mosquitos	12
2.4.1 Estrutura e propriedades físico-químicas do DEET	14
2.4.2 Mecanismo de ação dos repelentes e a relação estrutura x atividade	15
2.4.3 Os métodos de análise do DEET	17
2.5 Os lipossomas	17
2.5.1 Preparação dos lipossomas	22
2.5.2 Caracterização dos lipossomas	24
2.5.3 A estabilidade dos lipossomas	25
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Planejamento	28
4.2 Materiais	29
4.2.1 Equipamentos	29
4.2.2 Reagentes	30
4.2.3 Matérias-primas	30
4.3 Preparação das soluções de uso	31
4.4 Análise das Matérias-primas	32
4.4.1 Análise do teor de fosfatidilcolina no Phosal® e Phospholipon®	32
4.4.2 Análise do teor de DEET	35
4.4.3 Análise do DEET nas preparações	35
4.5 Preparação dos lipossomas	36
4.5.1 Método de hidratação do filme lipídico	36
4.5.2 Método do pré-lipossoma	37
4.5.3 Separação das frações de ambos os métodos para análise	38
4.5.4 Formulas testadas para verificação da % de incorporação do DEET	40
4.6 Preparação das formulações	41
4.6.1 Preparação do gel de Carbopol®	41
4.6.2 Preparação do gel de Carbopol® contendo DEET	42
4.6.3 Preparação do gel de Natrosol®	42
4.6.4 Preparação do gel de Natrosol® contendo lipossomas com DEET	43

4.7	Caracterização	43
4.7.1	Preparação da curva-padrão do DEET	43
4.7.2	Determinação do tamanho médio dos lipossomas	44
4.7.3	Visualização dos lipossomas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	44
4.7.4	Análise do DEET nas preparações gel com lipossoma por CLAE	45
4.7.5	Parâmetros de validação das análises por CLAE	47
4.7.5.1	Especificidade	47
4.7.5.2	Precisão	47
4.7.5.3	Exatidão	47
4.7.5.4	Recuperação	47
4.7.5.5	Robustez	47
4.8	Determinação da eficácia da preparação repelente	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Resultado das análises dos teores de fósforo nas matérias-primas Phosal® e Phospholipon®	54
5.2	Resultado das análises dos teores de DEET nas amostras de DEET sintetizado e DEET comercial.	57
5.3	Resultado das análises dos teores de PC e DEET nas formulações manipuladas para verificação do teor máximo de incorporação da dietiltoluamida.	62
5.4	Análise das preparações gel contendo lipossoma com DEET	66
5.5	Análise do comportamento das corridas cromatográficas com a modificação de alguns parâmetros do método	72
5.6	Determinação do tamanho médio dos lipossomas com DEET	83
5.7	Visualização dos lipossomas por Microscopia eletrônica de transmissão	85
5.8	Determinação da eficácia da preparação gel com lipossoma contendo DEET	85
6.	CONCLUSÕES	101
7.	PERSPECTIVAS	102
8.	REFERÊNCIAS	103
9.	APÊNDICE	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

atm – unidade de pressão em atmosfera

°C – graus centígrados

C18 – cadeia de hidrocarboneto com 18 átomos de carbono

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLS-ODS – coluna para cromatografia em fase reversa revestida com octadecilsilano

cm⁻¹ – unidade de frequência

CT – Centro de Tecnologia

DEET – N,N-dietil-*m*-toluamida

DP – desvio padrão em uma amostra de dados

G – 25 – material de filtração em gel (partículas de 50 – 150 μ)

G – 50 – material de filtração em gel (partículas de 150 – 300 μ)

g – gramas

g/cm³ – gramas por centímetros cúbicos

gl – graus de liberdade

GmbH – Phospholipid – Laboratório produtor das matérias-primas testadas para produção de lipossomas

h – horas

H₀ – hipótese nula

IV – infravermelho

Kv - quilovolts

LabCQ – Laboratório de Controle de qualidade em medicamentos

Lasape – Laboratório de análise e síntese de produtos estratégicos

LD50 – dose letal, quantidade da substância que mata 50% dos indivíduos testados.

M – unidade de concentração molar

MeOH – metanol

mg/mL – concentração em miligramas por mililitros

mM – milimolar

mmHg – unidade de pressão em milímetros de mercúrio

μ - média aritmética de uma população de dados

μg P/mL – microgramas de fósforo por mililitros

μL – microlitro

μm – micrometros

N – solução normal

nm – nanômetros

NPPN – Núcleo de pesquisa em produtos naturais

P – probabilidade ou proporção populacional

P.A. – pró-análise

p/v – concentração peso por volume

PC – fosfatidilcolina

pH – potencial de hidrogênios iônicos

r – coeficiente de correlação

R% - recuperação em porcentagem

R² – coeficiente de determinação

Sephadex G – Composto por dextran usado para filtração em gel e cromatografia de exclusão

t – estatística do teste t de Student

TRIS – tampão Tris[hidroximetil] aminometano

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ur – umidade relativa do ar

USP 27 – Farmacopéia americana

UV – ultravioleta

UV/VIS – região do espectro eletromagnético entre ultravioleta e visível

v/v – porcentagem volume/volume

α – nível de significância: probabilidade de erro do tipo 1

ΔT – diferença de temperatura

λ – comprimento de onda

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pg	
FIGURA 1	Representação esquemática da pele, mostrando as camadas: epiderme e derme	2
FIGURA 2	Representação esquemática da classificação resumida dos mosquitos, evidenciando os gêneros <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> e <i>Culex</i> , de interesse em entomologia médica	6
FIGURA 3	Representação esquemática do ciclo de vida dos mosquitos, mostrando as fases ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto.	7
FIGURA 4	Esquema representando o modelo da orientação das moléculas de fosfolipídios dependente da Temperatura de transição de fase gel - líquido cristalino	18
FIGURA 5	Representação esquemática da Metodologia de análise das matérias-primas Phosal® e Phospholipon® pelo método de Bartlett	34
FIGURA 6	Representação esquemática da formação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico	37
FIGURA 7	Representação esquemática da formação de lipossomas pelo método do pré-lipossoma	38
FIGURA 8	Representação esquemática dos processos de manipulação e análise do fosfolipídio e DEET nos lipossomas (42mM PC; 8,4 mM DEET) produzidos	39
FIGURA 9	Representação esquemática do processo de eclosão dos ovos de mosquitos	48
FIGURA 10	Procedimentos operacionais de manutenção da colônia	49
FIGURA 11	Material usado nos testes de repelência em voluntários	50
FIGURA 12	Desenho do projeto para confecção da caixa de acrílico segundo a ASTM	51
FIGURA 13	Procedimentos operacionais do teste de repelência	52
FIGURA 14	Contagem do número de fêmeas alimentadas	53
FIGURA 15	Curva padrão de fósforo	55
FIGURA 16	Espectros de IV (filme líquido) das amostras usadas na incorporação de DEET em lipossomas: DEET sintetizado no Lasape e DEET comercial	57
FIGURA 17	Espectros de varredura no UV/VIS das amostras de DEET usadas como referência na incorporação de DEET em lipossomas	58
FIGURA 18	Sobreposição dos Espectro de varredura no UV do DEET em concentrações variadas de 7 mg/ml a 0,1 mg/ml	59
FIGURA 19	Espectro de varredura no UV da 1ª e 2ª derivação	60
FIGURA 20	Espectro de varredura do DEET no UV em diferentes concentrações na região entre 260 e 290 nm	61
FIGURA 21	Curva padrão de DEET	62
FIGURA 22	Gráfico dos resultados das análises de PC e DEET nos lipossomas manipulados pelo método do pré-lipossoma (taxa de incorporação)	64
FIGURA 23	Espectro de varredura da diluição em etanol empregada para analisar a concentração de DEET nos lipossomas 42 mM PC : 4,8 mM DEET	66
FIGURA 24	Espectro de infravermelho das amostras de DEET: padrão USP (A) DEET do Lasape (B) e DEET comercial (C), ampliado no intervalo entre 600 – 800 cm ⁻¹	67

FIGURA 25	Curva de calibração do DEET por CLAE	69
FIGURA 26	Cromatograma do DEET matéria-prima na concentração 800 µg/m	70
FIGURA 27	Cromatograma do gel com lipossoma e DEET concentração 600 µg/mL	71
FIGURA 28	Sobreposição dos picos em diferentes comprimentos de onda (220, 250 e 270 nm) no cromatograma do gel com lipossoma e DEET concentração 400 µg/mL	72
FIGURA 29	Comparação entre os cromatogramas do gel com lipossoma contendo DEET na concentração 400 µg/mL e gel com lipossoma sem DEET.	73
FIGURA 30	Cromatograma do DEET padrão (400 µg/mL), vazão de 0,8 mL/min	78
FIGURA 31	Cromatograma do DEET padrão (400 µg/mL), vazão de 1,2 mL/min	78
FIGURA 32	Cromatograma do DEET padrão na concentração 400 µg/mL	79
FIGURA 33	Cromatograma do DEET padrão na concentração 400 µg/mL	80
FIGURA 34	Cromatograma do gel com lipossoma e DEET na concentração 320 µg/mL. Fase móvel com pH = 5,5	81
FIGURA 35	Cromatograma do gel com lipossoma e DEET na concentração 320 µg/mL. Fase móvel com pH = 3,5	81
FIGURA 36	Gráfico de distribuição de tamanho do lipossoma preparado pelo Método do pré-lipossoma (42 mM: 8,4 mM DEET), filtrado em coluna de Sephadex®	84
FIGURA 37	Gráfico de distribuição de tamanho do lipossoma preparado pelo Método da hidratação do filme lipídico (42 mM: 8,4 mM DEET), filtrado em coluna de Sephadex®	84
FIGURA 38	Fotomicrografia eletrônica dos lipossomas preparados com Phosal preparado pelo método da gota (aumento de 50 mil vezes)	85
FIGURA 39	Gráfico representativo do efeito das formulações placebos aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> (tempo = 9 h)	89
FIGURA 40	Gráfico representativo do efeito das formulações contendo DEET aplicadas em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> (tempos = 10, 11 e 12 h)	92
FIGURA 41	Gráfico representativo do efeito das formulações contendo DEET aplicadas em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> (tempo = 10 h)	94
FIGURA 42	Gráfico representativo do efeito das formulações contendo DEET aplicadas em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> (tempo = 11 h)	94
FIGURA 43	Gráfico representativo do efeito das formulações contendo DEET aplicadas em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> nos tempos 10, 11 e 12 h	95
FIGURA 44	Cinética de repelência da formulação Gel de Carbopol® com DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	96
FIGURA 45	Cinética de repelência da formulação Gel de Natrosol® contendo lipossoma com DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .	96
FIGURA 46	Gráfico representativo do efeito das formulações aplicadas em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> t = 12 h	96

- FIGURA 47 Cinética de repelência da formulação Gel de Carbopol® com DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti* 97
- FIGURA 48 Cinética de repelência da formulação Gel de Natrosol® contendo lipossoma com DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti*. 97

ÍNDICE DE TABELAS

	Pg	
TABELA 1	Número de casos de malária ocorridos na Amazônia Legal	8
TABELA 2	Total de casos de malária ocorridos fora da região amazônica	9
TABELA 3	Distribuição de casos confirmados de dengue no Brasil, por Unidade Federada	10
TABELA 4	Distribuição de casos confirmados de febre amarela no Brasil, por Unidade Federada	10
TABELA 5	Propriedades físico-químicas do repelente de insetos DEET	14
TABELA 6	Parâmetros cromatográficos para a análise de DEET nas preparações	45
TABELA 7	Valores de Absorbância para a plotagem da Curva padrão de fósforo	54
TABELA 8	Resultado das análises do teor de fosfolipídios nas matérias-primas Phosal® e Phospholipon®	55
TABELA 9	Resultado das análises dos teores de fosfolipídios emitido pelo fabricante GmbH das matérias-primas Phospholipon® e Phosal®.	56
TABELA 10	Curva padrão de DEET	62
TABELA 11	Resultado das análises do teor de PC nas formulações manipuladas pelo método do pré-lipossoma	63
TABELA 12	Resultado das análises do teor de DEET nas formulações manipuladas pelo método do pré-lipossoma	63
TABELA 13	Resultado comparativo da incorporação de DEET em lipossoma 42 mM	64
TABELA 14	Resultado das análises das amostras de DEET por infravermelho	68
TABELA 15	Valores para o cálculo da Curva de calibração do DEET por CLAE	68
TABELA 16	TABELA 16 – Dados da regressão linear das curvas de calibração do DEET $y = ax + b$	74
TABELA 17	Precisão intracorrída para determinação de DEET na formulação gel com lipossoma 252 mM	75
TABELA 18	Teste da recuperação do método para determinação de DEET na formulação gel com lipossoma 252 mM (80%)	76
TABELA 19	Teste da recuperação do método para determinação de DEET na formulação gel com lipossoma 252 mM (100%)	77
TABELA 20	Teste da recuperação do método para determinação de DEET na formulação gel com lipossoma 252 mM (120%)	77
TABELA 21	Teste de robustez do método por CLAE – Tempo de retenção (Tr)	82
TABELA 22	Resultado da determinação do tamanho médio dos lipossomas manipulados com Phospholipon® por espectroscopia de espalhamento da luz laser	83
TABELA 23	Resultado da determinação do tamanho médio dos lipossomas manipulados com Phosal® por espectroscopia de espalhamento da luz laser	83
TABELA 24	Efeito de de uma formulação de lipossomos contendo DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> (tempo de 0 a 6 h)	86
TABELA 25	Efeito de de uma formulação de lipossomos contendo DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> (tempo de 7 a 9 h)	87

TABELA 26	Efeito das formulações contendo DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> (tempo de 10 a 12 h)	88
TABELA 27	Comparação do número de fêmeas alimentadas nas duas condições experimentais. Valores de P (bicaudal, $g1 = 1$)	93

RESUMO

Formulações repelentes para uso tópico visam a proteção pessoal contra picadas de insetos. As formulações contendo lipossomas possuem a grande vantagem de aumentar a concentração da substância ativa no sítio de ação, prolongando em alguns casos o seu tempo de permanência no local de aplicação, além de reduzir os efeitos colaterais.

Neste trabalho testou-se dois métodos de inclusão da substância repelente N-N-dietil-m-toluamida (DEET) em lipossomas, o método da hidratação do filme lipídico usando a matéria prima Phospholipon® que é um concentrado de fosfatidilcolina e o método do pré-lipossoma usando a matérias-prima Phosal® que é um preparado de fosfatidilcolina e colesterol. De posse da metodologia mais apropriada para a inclusão do DEET no lipossoma, foi definido o melhor percentual de DEET em relação aos lipídios totais para ser incorporado. Este foi de 42 mM de fosfatidilcolina (PC) para 8,4 mM de DEET e chegou-se a uma relação máxima de 252 mM de fosfatidilcolina para 20 % de DEET em relação aos lipídios totais.

Controlou-se a concentração de fosfatidilcolina pela determinação de fósforo nas amostras de lipossomas e a concentração de DEET pela determinação em espectrofotometria UV/VIS.

Avaliou-se o tamanho dos lipossomas produzidos por espectroscopia de espalhamento da luz laser (PCS) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Preparou-se um gel de Natrosol® a 1% para veicular os lipossomas produzidos nas proporções 252 mM de PC: 20% de DEET e desenvolveu-se uma metodologia de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para analisar o DEET nesta preparação.

Para as análises em CLAE, utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ ODS, com eluição isocrática e fase móvel composta de mistura de tampão acetato de amônio 0,03 M (pH = 4,5) e acetonitrila nas proporções 60:40 (v/v) com detecção em UV ($\lambda = 250$ nm). O tempo de retenção do DEET nestas condições foi de 8 minutos e determinou-se, também, os parâmetros de validação do método (especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez).

Avaliou-se a eficácia da formulação repelente através de teste *in vivo* com 9 voluntários humanos e mosquitos *Aedes aegypti* cepa Rockefeller. Aplicou-se o teste de Wilcoxon signed rank test para todos os horários testados e verificou-se que a formulação desenvolvida, aplicada na concentração 6,25 mg/cm², proporcionou uma cobertura de doze horas.

ABSTRACT

Repellent formulations for topical use provide personal protection against insect bites. The liposome formulations have the great advantage of increasing the concentration of the active substance in the action and/or application field, besides reducing collateral effects.

In this research two methods of inclusion of the repellent substance N-N-diethyl-m-toluamide (DEET) in liposomes were evaluated: the lipidic film hydration method using the raw material Phospholipon, which is concentrated phosphatidylcoline (PC), and the pre-liposome method using the raw material Phosal, which is a preparation of phosphatidylcoline and cholesterol. Having got the most appropriate methodology for the inclusion of DEET in the liposome, the best percentage of DEET to be incorporated in relation to total lipids was defined. This was 42mM of phosphatidylcoline (PC) to 8,4 mM of DEET, reaching a maximum relation of 252 mM of phosphatidylcoline to 20% of DEET in relation to total lipids.

The concentrations of phosphatidylcoline were controlled by determining the amount of phosphorus in the samples of liposomes whereas the incorporated concentrations of DEET were controlled by the spectrophotometric analysis.

The size of the liposomes produced by Photon Correlation of Spectrophotometric (PCS) and by Transmission Electron Microscopy (TEM) was also evaluated.

Natrosol jelly at 1% was prepared as a vehicle for the produced liposomes in the proportion 252 mM of PC: 20% of DEET and a methodology of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was developed in order to analyse DEET in this preparation.

The analyses were carried out in Shimadzu Chromatographs. A C18 ODS reversed phase column with isocratic elution and a mobile phase composed of a solution of ammonium acetate buffer 0,03 M (pH = 4,5) and acetonitrile in the proportion 60:40 (v/v) with a Ultraviolet detection ($\lambda = 250$ nm) was used. The retention time of DEET in these conditions was 8 minutes and the validation parameters of the method (specificity, linearity, precision, exactness and robustness) were also determined.

The efficiency of the repellent formulation was evaluated through “in vivo” test with 9 human volunteers and *Aedes aegypti* Rockefeller cepa mosquitoes. The Wilcoxon signed rank test was used all the time and it was concluded that the developed formulation, applied in the concentration $6,25 \text{ mg/cm}^2$, was effective for twelve hours.

1 INTRODUÇÃO

Os repelentes químicos sintéticos são substâncias com discreto odor que quando aplicadas topicamente têm a propriedade de modificar o comportamento dos insetos impedindo-os de picarem. Algumas espécies de mosquitos hematófagos transmitem avbviroses e parasitoses, já outros além do desconforto das picadas podem provocar reações alérgicas (WILKINSON, 1990; MARCONDES, 2001).

Este trabalho propõe-se a desenvolver uma formulação contendo lipossomas usando matérias-primas biocompatíveis na qual é veiculado o princípio ativo N,N-dietil-m-toluamida (DEET), um repelente químico de uso consagrado desde 1957 em formulações comerciais (WEINER, MARTIN & RIAZ, 1989; FRADIN, 2002). Para isso, utilizou-se de recursos instrumentais para a definição da metodologia de análise dos insumos e do lipossoma produzido, a partir da melhor relação entre a concentração de fosfatidilcolina (PC) e o percentual de DEET utilizado, bem como a metodologia de análise do produto acabado.

As metodologias usadas para a caracterização dos lipossomas foram: dosagem de PC por colorimetria, quantificação do DEET por espectrofotometria UV/VIS, determinação do tamanho médio dos lipossomas por espectroscopia de espalhamento da luz laser, visualização dos lipossomas por microscopia eletrônica de transmissão, quantificação do DEET nas formulações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e teste de eficácia *in vivo* utilizando militares voluntários (ACKERS, 1967; GREGORIADIS, 1973; WISCHNITZER, 1980; GROVES, 1984; NEW, 1990; BAYNES, YEATTS & RIVIERE, 2002).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A pele

A pele (FIGURA 1) é um órgão que tem dentre as várias funções a de barreira física, isto é, protege o organismo, de um lado impedindo a entrada de substâncias e corpos estranhos e, de outro, evitando a evaporação excessiva de água pelo corpo o que levaria à desidratação.

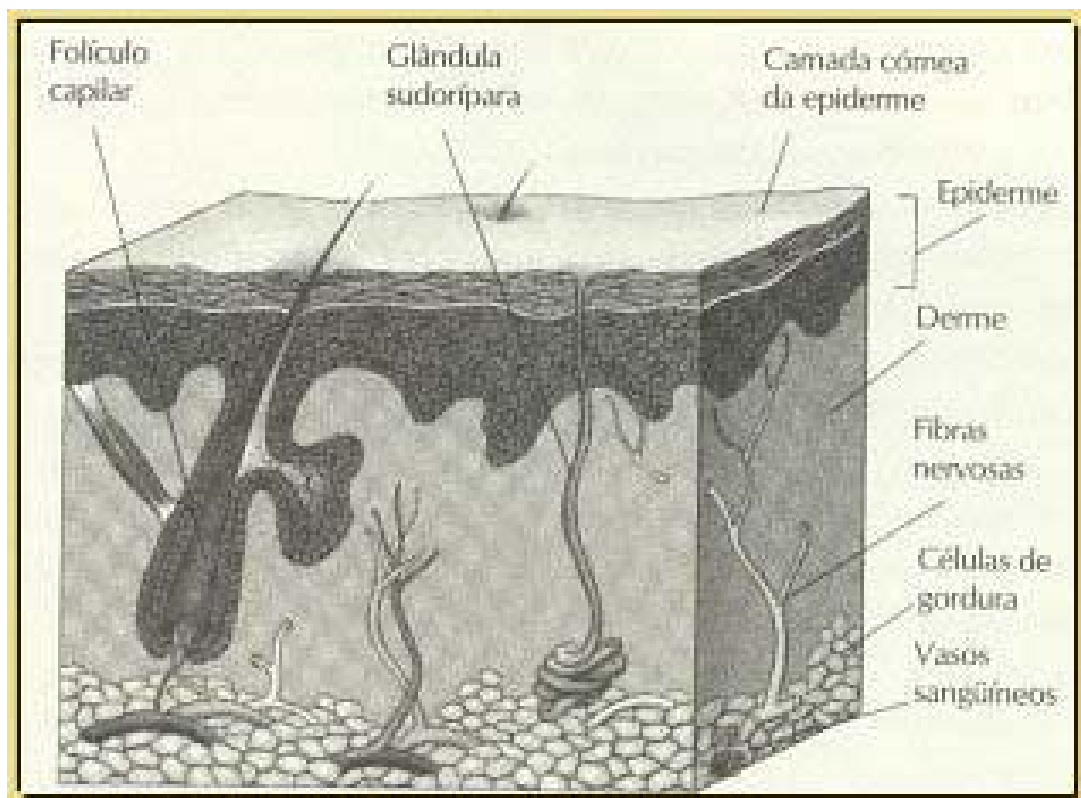


FIGURA 1 – Representação esquemática da pele, mostrando as camadas: epiderme e derme (http://www.peledeseda.com/estetica/frame_1.htm , capturado em 05/08/03).

É formada por duas camadas distintas, firmemente unidas entre si: a epiderme e a derme. A epiderme, formada por um arranjo de cinco estratos de células achatadas, é o local onde esta função de barreira cutânea é efetuada e está na razão direta da sua composição química em lipídios, principalmente na sua camada mais externa, o estrato córneo (HALLER, 1989).

O estrato córneo é composto de células chamadas (queratinócitos) e de lipídios livres, que se encontram principalmente nos espaços intercelulares, formando camadas

multilamelares. Estas camadas multilamelares são constituídas predominantemente de ceramidas, colesterol e de ácidos graxos livres que são responsáveis por impedir a saída de água do nosso organismo. Alguns lipídios são apolares enquanto que outros possuem uma parte polar (cabeça) e outra apolar (cauda), estes por sua vez são classificados como anfifílicos (LEHNINGER, NELSON & COX, 1995).

As células da camada basal contêm, principalmente, os fosfolipídios. Na camada granular a quantidade de fosfolipídios diminui à medida que se aproxima da camada mais externa, o estrato córneo. Nesta região, observa-se que as composições de colesterol, sulfato de colesterol e glicoceramidas vão aumentando (HALLER, 1989).

Esses lipídios são moléculas que podem ser essencialmente apolares, como os ácidos graxos de cadeias saturadas ou parcialmente apolares possuindo uma parte da molécula com grupos funcionais de características hidrofílicas, como os fosfolipídios (anfifílicos).

Os lipídios anfifílicos contêm um grupo hidrofílico (cabeça polar) e uma cadeia de hidrocarboneto (apolar) cauda hidrofóbica. Estas características lhes proporcionam a propriedade de quando misturados à soluções aquosas formarem agregados microscópicos nos quais as suas metades hidrofóbicas interagem umas com as outras (cauda-cauda) e os grupos hidrofílicos interagem com a água que os envolvem (LEHNINGER, NELSON & COX, 1995).

2.2 Os mosquitos

2.2.1 Taxonomia dos Mosquitos

Para classificarmos os organismos, fazemos uso de categorias taxonômicas: Reino, filo, classe, ordem, família, Gênero e Espécie. Podem ainda existir subdivisões, como subfamília, subespécie etc.

O filo Arthropoda inclui cerca de 85% das espécies animais conhecidas e se supõe que existam mais de 30 milhões de espécies de insetos, algumas destas espécies têm grande interesse epidemiológico, pois podem causar doenças ao homem, seja por sua ação direta ou pela transmissão de agentes patogênicos de vários tipos (MARCONDES, 2001).

A classe Insecta compreende milhares de espécies muito diferentes, tais como mosquitos, moscas, pulgas, piolhos, besouros, baratas, percevejos, abelhas, etc. Algumas espécies transmitem doenças (específicas para cada espécie), outras podem provocar reações alérgicas. O controle de insetos, pragas ou vetores pode ser feito com diferentes substâncias químicas (larvicidas, adulticidas e repelentes).

Com a ocupação urbana descontrolada, o desmatamento e a conseqüente redução de seus predadores, alguns insetos aumentaram sua população descontroladamente, principalmente nos meses quentes do ano (GOULART & LEITE, 1978 ; REY, 1992).

No Brasil, devido ao clima predominantemente tropical, ocorrem não só a multiplicação de inúmeros insetos como também a disseminação de muitas parasitoses em regiões consideradas endêmicas e eventualmente epidêmicas de grande importância sanitária e econômica (GOULART & LEITE, 1978).

A ordem Diptera é composta de insetos bem diferenciados, que possuem um único par de asas, dentre os quais os mosquitos, providos de aparelho bucal sugador. A importância epidemiológica deste grupo de artrópodes deve-se ao fato de algumas espécies, na sua fase adulta, alimentarem-se de sangue (insetos hematófagos) e serem hospedeiros intermediários e transmissores de doenças causadas por vírus, protozoários e helmintos (REY, 1992).

A predisposição a picadas de insetos tem variação individual e é decorrente do efeito atrativo que substâncias exaladas pela pele exercem. O mecanismo de atração de mosquitos pelos seres vivos é bastante complexo, e decorre de vários estímulos, entre eles os estímulos

visuais, principalmente para insetos de hábitos diurnos, o calor e o olfato ou uma associação desses estímulos.

É sabido que vestimentas escuras, calor, umidade, odor de substâncias como CO₂, ácido láctico, suor e aromas exalados pela pele são fatores que predispõem a atração de insetos hematófagos (DAVIS & BOWEN, 1994; SCHRECK, KLINE & CARLSON, 1990). Os mosquitos possuem quimiorreceptores em suas antenas, responsáveis, entre outros, por sua orientação (RIDGWAY, 1990).

A ordem Diptera é dividida em três subordens: Nematocera, na qual os adultos apresentam antenas longas com seis artículos, Brachycera, cujos adultos têm antenas curtas formadas por três ou quatro artículos e Cyclorrapha, que compreende insetos que possuem antenas com três artículos.

Os Nematocera possuem várias famílias de interesse médico:

- família Psychodidae, composta pelos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyi*, transmissores da leishmaniose.
- família Simuliidae, cujos espécimes são conhecidos como “barrachudos”, transmissores da oncocercose.
- família Ceratopogonidae, gênero *Culicoide*, conhecido como “pium”, transmissor da manssonelose.
- família Culicidae, composta pelas sub-famílias Anopheinae e Culicinae (FIGURA 2), conhecidos como “mosquitos”, transmissores de malária, filariose linfática, febre amarela e dengue, entre outros (REY, 1992).

Na atualidade, conhece-se cerca de trinta milhões de espécies de insetos distribuídas em todo o mundo. Os Culicidae são dípteros de corpo delgado e pernas longas, cujo desenvolvimento pós-embriônico se faz por holometabolismo, ou seja, inclui metamorfose completa.

Assim sendo, apresentam vários estágios que se sucedem, a saber: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto (FIGURA 3). Os três primeiros estágios são aquáticos e o último é terrestre (FORATTINI, 2002).

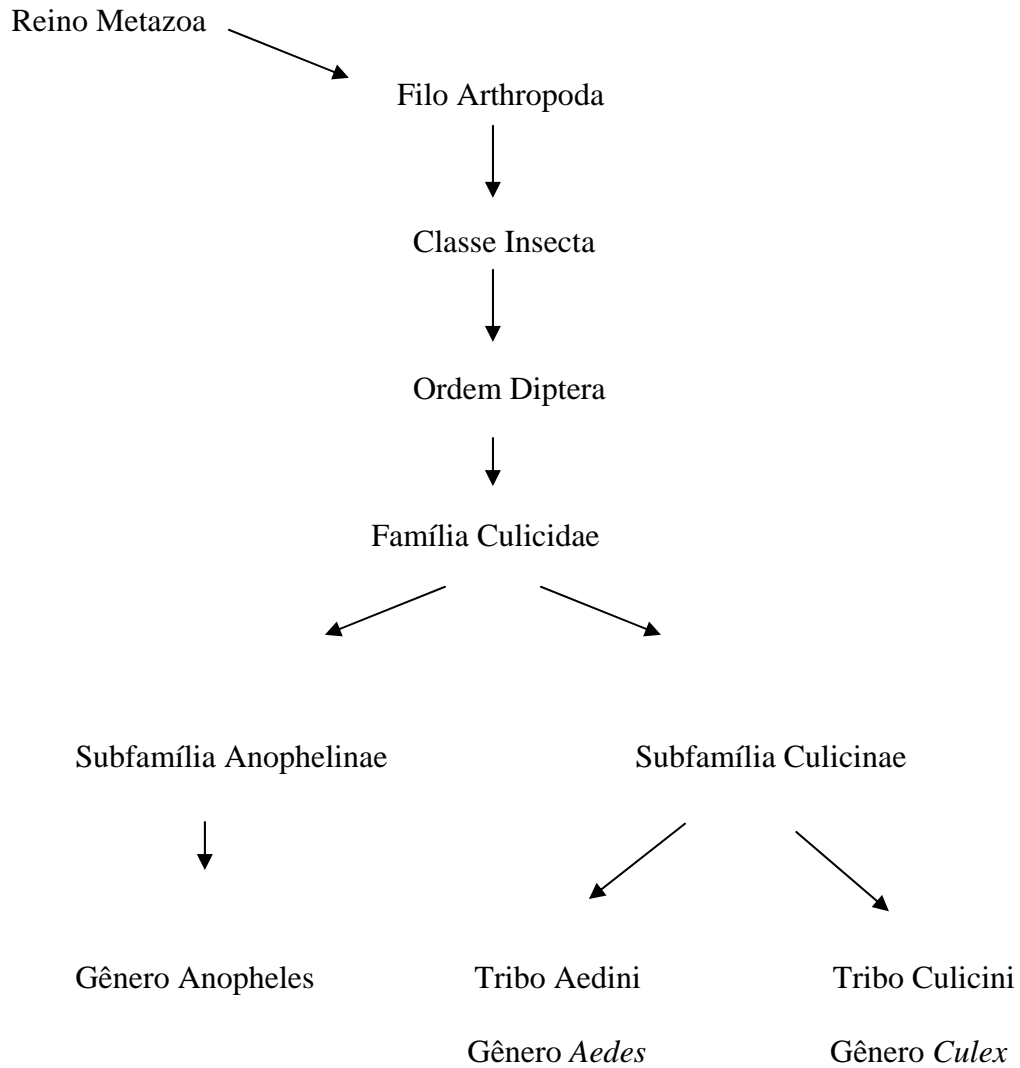


FIGURA 2 – Representação esquemática da classificação resumida dos mosquitos, evidenciando os gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, de interesse em entomologia médica (FORATTINI, 2002).

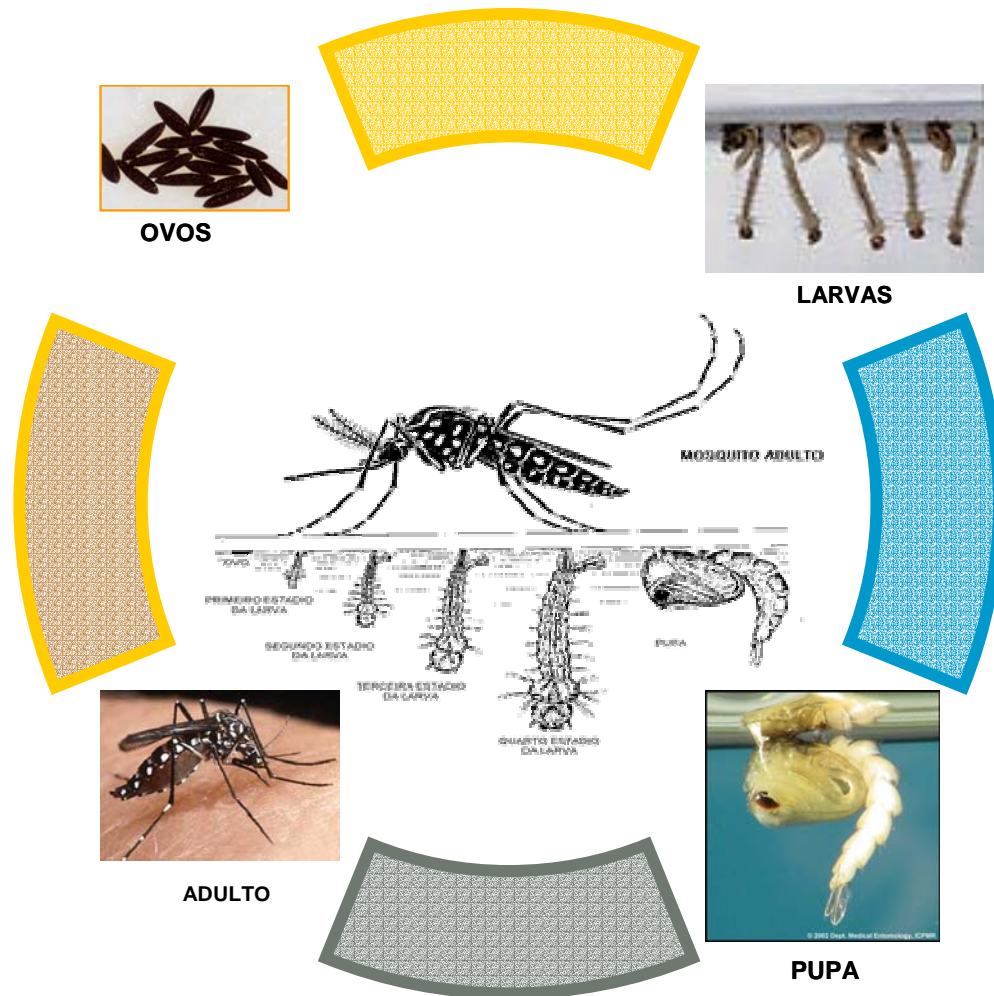


FIGURA 3 – Representação esquemática do ciclo de vida dos mosquitos, mostrando as fases ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto.

Os ovos são postos isoladamente ou aglomerados e quando eclodem podem gerar larvas de ambiente aquático (MARCONDES, *op. cit*). Os mosquitos adultos alimentam-se de néctar e somente as fêmeas se alimentam do sangue, necessário para a maturação de seus ovos.

2.3 Algumas doenças transmitidas por mosquitos

As doenças transmitidas por mosquitos no Brasil, a exemplo do que ocorre em muitos outros países, continuam a ser um problema de saúde pública.

Arboviroses e parasitoses continuam a emergir em regiões endêmicas com alguns episódios de epidemia, o que tem merecido por parte do Ministério da Saúde, programas específicos de controle, como é o caso da dengue e da malária.

2.3.1 Malária

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Quatro espécies podem ocasionar a doença em suas várias formas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. Os parasitas são transmitidos de uma pessoa para outra pela fêmea das espécies do mosquito do gênero *Anopheles*. Estes insetos possuem hábito crepuscular e noturno, e as fêmeas depositam seus ovos em ambientes naturais, em coleções de água de tamanho variado. Esta doença, segundo dados da Organização Mundial de Saúde, afasta aproximadamente 3 milhões de pessoas a cada ano sendo que, em muitos casos ocorre o óbito dos pacientes (FRADIN, 2002). Os casos de malária na Amazônia legal têm aumentado (TABELA 1), embora as ações de controle no Brasil tenham sido intensificadas com a diminuição do número de municípios de alto risco, das internações e dos óbitos.

TABELA 1 - Número de casos de malária ocorridos na Amazônia Legal

Ano	2002	2003	2004
Total de casos notificados	348.259	407.995	459.013

Fonte: SISMAL, SIVEP-Malária, SVS/MS. Disponível em: <<http://funasa.gov.br>> Acesso em 28 abr. 2005.

Os casos de malária ocorridos fora da região amazônica alertam para o problema do êxodo de pessoas infectadas e a possibilidade de novos surtos epidêmicos, como aquele ocorrido no estado do Ceará em 2002 (TABELA 2).

TABELA 2 – Total de casos de malária ocorridos fora da região amazônica

Estados	2002	2003	2004
Piauí	9	38	89
Ceará	402	4	29
Bahia	12	71	3
Paraná	106	5	42
Mato Grosso do Sul	38	0	12
Minas Gerais	1	31	13
Espírito Santo	0	0	81
Goiás	5	0	13
Rio de Janeiro	1	19	8
São Paulo	4	29	11
Pernambuco	0	0	19
Total	580	188	320

Fonte: SISMAL e SINAM/SVS/MS. Disponível em:< <http://funasa.gov.br>> Acesso em 28 abr. 2005.

2.3.2 Dengue e Febre amarela

No Brasil, a dengue é uma doença transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*. Existem quatro sorotipos virais, designados por I, II, III e IV, do gênero *Flavivirus*. Surge sob a forma de grandes epidemias, com grande número de casos. A forma clínica conhecida como dengue hemorrágica envolve vários fatores, como o tipo de vírus, a idade do paciente, o estado imunológico e a predisposição genética da pessoa infectada. Os mosquitos do gênero *Aedes* são responsáveis, ainda, pela transmissão de outra arbovirose, a Febre Amarela.

Os vírus destas duas doenças são transmitidos de uma pessoa para outra pela fêmea das espécies do gênero *Aedes* que depositam seus ovos em locais de água parada (FORATTINI, 2002).

TABELA 3 - Distribuição de casos confirmados de dengue no Brasil, por Unidade Federada.

Região	2002	2003	2004
NORTE	28.816	40.632	31.240
NORDESTE	301.375	170.845	34.772
SUDESTE	387.106	86.160	31.091
SUL	7.665	9.879	387
CENTRO-OESTE	69.257	34.260	15.428
Total	794.219	341.776	112.918

Fonte: SISMAL e SINAM/SVS/MS.

Disponível em: < <http://funasa.gov.br> > Acesso em 28 abr. 2005.

As tabelas 3 e 4 mostram o total de casos de dengue, nos anos 2002-2004, e de febre amarela nos anos de 2002 e 2003, no Brasil, respectivamente.

TABELA 4 - Distribuição de casos confirmados de febre amarela no Brasil, por Unidade Federada.

Região	2002	2003
NORTE	9	1
NORDESTE	0	0
SUDESTE	8	58
SUL	0	0
CENTRO-OESTE	0	4
Total	17	63

Fonte: SISMAL e SINAM/SVS/MS.

Disponível em: < <http://funasa.gov.br> > Acesso em 28 abr. 2005.

2.3.3 Filariose linfática

A filariose linfática ou bancroftiana é uma enfermidade debilitante que causa várias manifestações clínicas no ser humano, sendo a mais conhecida aquela que provoca alteração no seu aspecto físico, como a dilatação de membros inferiores (elefantíase). No Brasil é causada pelo parasitismo de nematódeos da espécie *Wuchereria bancrofti*. Os vermes adultos ficam albergados nos vasos linfáticos e as formas embrionárias (microfilárias), na circulação sanguínea. Sua principal característica, que é aproveitada para o diagnóstico laboratorial, é o

passeio noturno das microfilárias no sangue periférico. O mosquito *Culex quinquefasciatus*, cosmopolita, de hábitos noturnos é comumente encontrado nas regiões tropicais e subtropicais, sendo o principal vetor desta doença (FORATTINI, 2002).

Em algumas partes do Brasil a filariose bancroftiana (Elefantíase) despontou e vem constituindo um sério problema em saúde pública (ALBUQUERQUE et al, 1995). Estima-se que 49 mil pessoas estejam infectadas pela *Wuchereria bancrofti* e que três milhões de indivíduos residam em áreas consideradas de risco, nos estados de Alagoas, Pará e Pernambuco (MEDEIROS, 2004).

As doenças transmitidas por insetos representam um grande desafio e são responsáveis por uma porcentagem significativa de mortes por todo o mundo, principalmente nos países de clima tropical. As campanhas de controle de vetores no Brasil têm conseguido diminuir os casos de dengue, mas não têm sido tão efetivas contra a Malária ou a Filariose, por exemplo. Outras por serem doenças características de, respectivamente, ambientes de florestas e de regiões endêmicas negligenciadas, necessitam de medidas de proteção diferenciadas, que objetivem evitar o contato com o mosquito.

Essa proteção pode ser alcançada tomando-se as seguintes medidas:

- evitando locais infestados pelas espécies transmissoras da doença;
- protegendo as casas com telas;
- usando roupas protetoras;
- usando repelentes de insetos nas áreas descobertas do corpo.

Em muitos casos a aplicação de repelente na pele pode ser o único modo para proteger-se das picadas dos mosquitos, como no caso de pessoas que necessitam estar em zonas endêmicas. Vale lembrar que, em muitas situações, uma única picada de um inseto infectivo pode provocar contaminação (ROZENDAAL, 1997).

2.4 Os Repelentes de mosquitos

Os repelentes são substâncias ou métodos utilizados para afastar os insetos e evitar suas picadas. Normalmente, são usadas substâncias com discreto odor, veiculadas em preparações cosméticas convencionais, como: cremes, loções, soluções, géis e óleos. Os repelentes de aplicação tópica são substâncias empregadas para afastá-los ou modificar o comportamento, impedindo-os de picarem. Podem ser divididos em duas categorias: os óleos (voláteis e fixos) derivados de plantas e as substâncias químicas sintéticas. Dentre os derivados de plantas, podemos citar: óleo de citronela, óleo de andiroba e os piretróides. Os repelentes químicos mais comuns são: indalona, dimetilftalato, hexanodiol e DEET.

Um repelente de uso tópico ideal deve ser eficiente contra os artrópodes hematófagos em geral, deve possuir as seguintes características: não ser tóxico e nem irritante para o homem, não ser plastificante, isto é, não deve ficar aderido à pele dando um aspecto oclusivo, e possuir um tempo de proteção o mais prolongado possível (HALL, GREEN & BEROZA, 1957; SHERMAN, 1966).

Segundo Smith (1966) não existe um repelente ideal, pois nenhum candidato a repelente é totalmente inodoro. Além disso, em geral os repelentes possuem relativa substantividade, sendo dificilmente removidos da pele devido a sua natureza física oleosa ou plastificante (SMITH, 1966).

Os repelentes para uso tópico e aqueles aplicados em vestimentas, cortinas e mosquiteiros, constituem as medidas de proteção pessoal mais comumente empregados contra picadas de insetos. Consequentemente, um importante método de prevenção de doenças transmitidas por estes vetores, principalmente no caso de pessoas que precisam proteger-se por curtos períodos, em áreas onde não é possível utilizar outros métodos de controle (FRADIN, 1998).

Várias preparações contendo permetrina, dimetilftalato, óleo de citronela e DEET estão disponíveis no comércio, oferecendo proteção por algumas horas. Estas preparações podem ter sua eficiência diminuída por absorção, evaporação ou suor. Os repelentes mais eficazes que se conhece até hoje têm como princípio ativo o DEET e a permetrina. Este último produto é um inseticida mas, quando aplicado em vestimentas, atua como repelente de contato. Estudos “duplos cegos” realizados com voluntários das Forças Armadas dos Estados Unidos da América demonstraram que as formulações associando DEET e permetrina, são bastante eficazes (YOUNG & EVANS, 1998).

Os repelentes podem ser associados a substâncias que têm função sinergista. Estas substâncias geralmente não são tóxicas para os insetos, mas podem contribuir com a atividade inseticida dos piretróides sintéticos (como no caso do butóxido de piperonila, que inibe as monooxigenases, capazes de detoxificar substâncias exógenas) ou facilitar a volatilização do repelente, aumentando o seu raio de ação.

A maioria dos repelentes é solubilizada em solvente apropriado (em geral álcool) e aplicado sob a forma de spray sobre a área a ser protegida, que pode ser a pele, um tecido ou outra superfície.

O DEET é uma substância orgânica líquida, volátil sob pressão normal e à temperatura ambiente, sendo praticamente insolúvel em água, embora solúvel em solventes orgânicos. Esta substância possui algumas características que são consideradas indesejáveis para o seu uso como repelente: polimerizável (efeito plastificante), possui odor desagradável e está associada a alguns efeitos tóxicos, quando empregada em concentrações superiores às aquelas recomendadas e/ou aplicações sucessivas (GRYBOSKI WEINSTEIN & ORDWAY, 1961; MILLER, 1982).

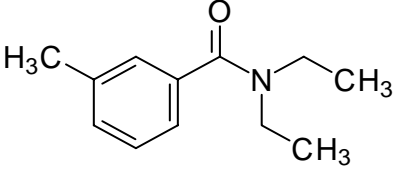
O DEET tem sido extensivamente usado nos países da Europa e das Américas desde a sua descoberta, por um cientista do Departamento Norte-Americano de Agricultura.

Esta substância foi patenteada pelo exército americano em 1946, sendo liberada para uso geral em 1957 (FRADIN, 1998).

2.4.1 Estrutura e propriedades físico-químicas do DEET

A substância N-N-dietil-m-toluamida, um derivado da benzamida, é bastante conhecida por seu amplo espectro de repelência contra artrópodes e é amplamente utilizada em várias formulações encontradas no mercado (TABELA 5).

TABELA 5 - Propriedades físicoquímicas do repelente de insetos DEET

PROPRIEDADE	DESCRIÇÃO
Fórmula estrutural	
Formula molecular	C ₁₂ H ₁₇ NO
Peso molecular	191,30
Aspectos físicos	Líquido oleoso de cor âmbar
Ponto de ebulição	111 °C (1 atm)
Densidade	0,990-1,000 g/cm ³ a 25 °C.
Pressão de vapor	1,67 x 10 ⁻³ mm Hg a 25 °C.
Solubilidade	Insolúvel em água. Miscível em solventes orgânicos

Em ratos, a dose letal (LD50) oral é 2-4 g/KG de DEET (AMBROSE & YOST, 1965). Com relação ao homem, o relato mais completo de casos de toxicidade devido ao uso citado na literatura, foram realizados por Veltri e colaboradores, quando foram analisadas 3.098 ocorrências de possível envenenamento por exposição ao DEET entre os anos de 1985 e 1994. São citados desde ingestão oral até aplicações tópicas e contaminações acidentais das mucosas dos olhos. De todas, somente 44 ocorrências resultaram em internações e destas,

cinco resultaram em reações ditas graves, associadas à inalação e ao contato com as mucosas dos olhos, não tendo sido relatados, nos acidentes, as concentrações envolvidas. Muitos casos de toxicidade por repelentes envolvem ingestão oral por crianças, sendo que dos casos graves relatados, nenhum resultou em morte por envenenamento (VELTRI et al, 1994; GOODYER & BEHRENS, 1998).

Estudos relacionados a farmacocinética do DEET com voluntários foram realizados por Selim e colaboradores, utilizando marcadores radioativos em preparações de uso tópico, com bases próprias para absorção sistêmica. Foi observado que somente 8% da quantidade aplicada foi absorvida e que tanto o DEET quanto os seu metabólitos foram totalmente eliminados num prazo máximo de 4 horas (SELIM et al, 1995).

De todos os grupos estruturais estudados, certos diois e as N,N-dialquilamidas, em especial as dietilamidas, revelaram ter melhor atividade repelente. Três dietilamidas foram extensivamente estudadas para uso nas Forças Armadas americanas, propil-N,N-dietilsuccinamato, o-cloro-N,N-dietilbenzamida e o-etoxi-N,N-dietilbenzamida. Em estudo realizado por McCabe, foram preparadas várias dietilamidas a partir de ácidos aromáticos, quando se verificou que as amidas de anéis aromáticos substituídos demonstravam melhor efeito repelente (McCABE, 1953).

2.4.2 Mecanismo de ação dos repelentes e a relação estrutura x atividade

O mecanismo de ação repelente tanto das substâncias químicas naturais e sintéticas ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que a repelência está associada ao comportamento dos artrópodes. Algumas substâncias são inibidoras da aproximação como alguns óleos essenciais e o DEET. Já outras substâncias são fagorrepeleentes como, por exemplo, as lactonas sesquiterpênicas e diterpenos.

Os repelentes agem por evaporação em pequenas quantidades, criando um microambiente na área de aplicação e impedindo a aproximação dos insetos hematófagos que, são atraídos pelo calor da pele e por substâncias exaladas pelo tecido cutâneo.

Os insetos produzem feromônios, que são substâncias de baixo peso ou substâncias voláteis, que quando liberadas por um organismo induzem uma ou mais reações específicas em um outro organismo da mesma espécie. Feromônios podem ser sintetizados pelo organismo emissor ou obtidos da comida ou de outras fontes do meio ambiente. Os feromônios são capazes de influenciar o comportamento intra-espécies dos artrópodes, sendo responsáveis por algumas ações como agregação, dispersão, atração do sexo oposto, reações de alarme e orientação.

As antenas dos mosquitos são providas de receptores capazes de discriminar o tipo de feromônio e de estimular o sistema nervoso central. Algumas terminações nervosa das antenas de insetos hematófagos devem ser próprias para identificar o calor de animais de sangue quente e os produtos por eles exalados através da pele como o suor, o ácido láctico e o CO₂ (SONENSHINE, 1985; RIDGWAY, 1990).

As formulações comerciais géis, cremes, soluções alcoólicas e outras, podem variar em sua concentração de DEET de 10 até 50 % e o tempo de cobertura dessas preparações pode variar em torno de uma até oito horas. Ocorrem situações em que se faz necessária uma proteção mais duradoura, quando as condições ambientais facilitam a degradação ou a retirada da substância do local de aplicação.

Algumas formulações empregando microencapsulamento dos repelentes para prolongar o tempo de proteção foram propostas na literatura (GUPTA & RUTLEDGE, 1991; DOMB et al, 1995).

2.4.3 Os métodos de análise do DEET

Vários métodos analíticos têm sido propostos para a identificação e quantificação do DEET e seus metabólitos (m-toluamida e ácido m-toluico) em estudos de metabolismo e eliminação após a aplicação tópica (SMALWOOD, DE BOR & LOWRY, 1992; EL-DIN & ABERIRJIU, 1992; SCHOENIG, 1996). Recentemente, Abu-Qare e colaboradores (2001) desenvolveram um método para estudar as interações farmacocinéticas do DEET associado ao inseticida permetrina no qual foram utilizadas extrações em fase sólida acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa (ABU-QARE & ABOU-DONIA, 2001).

As Farmacopéias estrangeiras utilizam para a identificação e quantificação, métodos por espectroscopia no infravermelho (USP XXVII) e Titulometria (BP 1993).

Segundo Markovic e colaboradores (2001), as técnicas de CLAE e de cromatografia gasosa (CG) apresentaram menos interferentes durante as análises (MARKOVIC, 1999). Abu-Qare & Abou-Doniae, analisaram os metabólicos do DEET na urina e no plasma por CLAE, empregando o cromatógrafo Waters modelo 510 com detetor de diodo UV/VIS. Nos seus trabalhos utilizaram coluna Sep Pack[®] C₁₈ 3,9x150 mm; fase móvel: água (ajustando-se ao pH 3,5 com ácido acético 1 N): acetonitrila em condições gradiente. O sistema detetor utilizado foi UV no $\lambda_{\text{máx.}}$ de 210 nm (ABU-QARE & ABOU-DONIA, 2001).

2.5 Os lipossomas

Os lipossomas são vesículas, nas quais o veículo aquoso é totalmente cercado pela membrana composta de moléculas lipídicas. As vesículas são formadas quando esses lipídios são dispersos em meio aquoso.

Bangham e colaboradores (1965), foram os primeiros a descrever o comportamento de fosfolípidios quando colocados soluções aquosas formando lipossomas a partir da agregação espontânea das moléculas (BARGHAM et al,1965).

Os lipossomas passaram a serem reconhecidos como transportadores de compostos biologicamente ativos e fármacos, inclusive tendo a capacidade de potencializar e/ou modificar a atividade dos compostos com os quais eles estão associados. Este efeito é dependente da composição química e da estrutura fosfolipídica.

Estas vesículas artificiais são desenvolvidas para distribuir substâncias ativas em locais específicos e nos últimos anos passaram a assumir um papel importante nas áreas da dermatologia e da cosmetologia (SUZUKI & SAKON, 1990).

As moléculas de fosfolípidios assumem um arranjo de bicamadas que quando estão na temperatura de transição líquido-cristalino-gel, espontaneamente formam vesículas aprisionando uma quantidade de água na parte interna oca. Dependendo da temperatura e do fosfolípido usado, as bicamadas assumem ora um estado gel, em que as cadeias de hidrocarbonetos da molécula ficam em posição bem orientadas, ora um estado líquido cristalino, em que as cadeias se posicionam de forma desorientada (FIGURA 4) (SILVIUS, 1982; TALSMA et al, 1992).

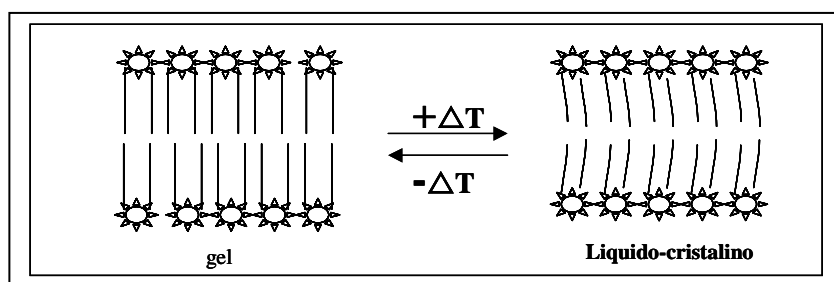


FIGURA 4 – Esquema representando o modelo da orientação das moléculas de fosfolípidios dependente da Temperatura de transição de fase gel -líquido cristalino

A forma e o tamanho dos lipossomas depende do método de preparação, da composição em lípidios, da força iônica do meio e do pH. As vesículas podem encapsular

drogas hidrossolúveis nos espaços aquosos e as drogas lipossolúveis na parede da membrana (ANSEL, ALLEN & POPOVICH, 1999).

Inicialmente, os lipossomas tiveram um grande interesse como carreadores de princípios ativos para administração intravenosa, com o objetivo de localizar o fármaco no sítio de ação específico. Entretanto, a meia-vida dessas substâncias foi encurtada devido aos mecanismos de defesa do sistema mononuclear fagocitário retirando rapidamente da circulação os lipossomas.

Hoje em dia, não foi abandonada a idéia de localizar o fármaco em sítios específicos, por via injetável, mas outras formas de aplicação tiveram um maior interesse como no tratamento de células tumorais, imunoterapia e lipossomas para uso tópico (SCHMID & KORTING, 1996).

No ano de 1982, Mezei e Gulakharam publicaram os resultados de suas pesquisas com animais referentes as alterações farmacocinéticas da triancinolona encapsulada em lipossomas comparando com preparações de uso tópico convencionais (MEZEI & GULASEKHARAM, 1982)

Outros estudos foram conduzidos com a aplicação de retinóides, para tratamento de acne em voluntários veiculados em formulações convencionais e em preparações lipossomais (SCHÄFER-KORTING et al, 1994). Estudos clínicos demonstram a eficácia aumentada de fármacos incorporados aos lipossomas quando comparado a formulações convencionais. (SCHIMID & KORTING, 1996)

Puglia e colaboradores (2004) realizaram testes de estímulo a ação eritematosa por radiações UV com voluntários aplicando um gel para uso tópico, do antiinflamatório indometacina incorporado ao lipossoma e o mesmo gel sem lipossoma. Com os resultados, concluíram que o gel com lipossomas atribuiu um efeito de ação prolongada, e que esta ação

estaria relacionada às interações das vesículas com os lipídios do estrato córneo (PUGLIA et al, 2004).

Um estudo de permeação em célula de difusão de Franz utilizando mucosa vaginal de coelhas mostrou que há um aumento da concentração do antifúngico veiculado em lipossomas no local de aplicação (NING et al, 2005).

Estes estudos vieram ratificar os resultados observados com respeito a diminuição de efeitos adversos, bem como redução das concentrações dos ativos nas formulações lipossomais para a obtenção do mesmo efeito (SCHÄFER-KORTING et al, 1994).

Este sistema e outros sistemas carreadores de fármacos são extensivamente descritos na literatura (MÜLLER et al, 2004), porém os lipossomas são os mais estudados devido as propriedades de biodegradabilidade e atoxicidade conferida pelos fosfolipídios que os constituem (WEINER MARTIN & RIAZ, 1989). Temos como principais vantagens para a utilização de lipossomas como carreadores de fármacos, a sua reduzida toxicidade e a eficácia terapêutica apresentada e a sua biodegradabilidade.

Dentre os diferentes lipídios que podem tomar parte na formação das bicamadas das vesículas lipossomais podemos citar: fosfatidilcolina (de ovo ou de soja), fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina hidrogenada, 1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), colesterol, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) (MELO et al, 2003). Os lipossomas são acrescentados de colesterol e eventualmente de agentes indutores de carga com o objetivo de facilitar a interação com as bicamadas na formação das vesículas e/ou estabilizar os lipossomas evitando o processo de fusão/agregação das vesículas e o esvaziamento do material incorporado. O uso de colesterol na formulação tem por objetivo aumentar a estabilidade bem como se aproximar da composição das membranas biológicas, contribuindo

também para aumentar a resistência pela diminuição da fluidez da membrana lipossomal (TALSMA et al, 1992a).

Embora o colesterol não seja essencial para a formação dos lipossomas, ele traz outros benefícios não citados, como o aumento da retenção de substâncias hidrossolúveis e resistência à biodegradação “in vivo” (KIRBY, CLARKE & GREGORIADIS, 1980).

Os lipossomas são divididos em três classes: (LASIC, 1988)

- Vesículas multilamelares:

Tamanho: de 400 a 3500 nm de diâmetro.

Vantagens: fácil preparação com um mínimo de equipamentos

Principal desvantagem: baixa capacidade de encapsulamento

- Vesículas unilamelares pequenas:

Tamanho: 25-50 nm de diâmetro.

Principal vantagem: população relativamente homogênea.

Desvantagens: baixa eficiência no encapsulamento, distribuição assimétrica dos lipídios entre as monocamadas interna e externa.

- Vesículas unilamelares grandes:

Tamanho: 200-1000 nm de diâmetro.

Vantagens: alta capacidade de encapsulamento de ativos hidrossolúveis, mínimo de fosfolipídios.

Desvantagem: heterogeneidade.

A inclusão de substâncias ativas nos lipossomas tem por objetivo melhorar os efeitos farmacocinéticos buscando dessa forma uma melhor eficácia e redução da toxicidade da droga que está sendo administrada. Dentre as várias propriedades das preparações de lipossomas busca-se, ainda:

- Liberar o ativo no sítio de ação na forma desejada

- Alteração na absorção e biodisponibilidade
- Potencializar a resistência à metabolização
- Alterar o tempo de liberação da droga no sítio ativo
- Prolongar a ação e diminuir o tempo de administração

Para tanto irá depender da droga e das propriedades do lipossoma.

O estrato córneo tem a propriedade de reter na sua estrutura substâncias ativas exercendo um “efeito reservatório” e a liberação progressiva desta reserva conduz a efeitos prolongados, o que é favorável às ações locais. Numerosas substâncias podem assim se acumular na pele em diferentes níveis (RIVIERE, 1993).

Os lipossomas atraíram a atenção dos pesquisadores como uma nova estratégia para liberação de fármacos, de uso interno e de uso tópico, em sítios de ação específicos ou de liberação controlada. Eles têm sido empregados tanto para substâncias de alto peso molecular como substâncias de baixo peso molecular (SCHIMID & KORTING, 1996).

2.5.1 Preparação dos lipossomas

A técnica inicialmente descrita para a formação de lipossomas foi o método de hidratação do filme de lipídios (BANGHAM et al, 1965). A partir desta foram feitas várias modificações com o objetivo de aumentar a capacidade de encapsulamento. Foram desenvolvidas técnicas como a ultracentrifugação dos fosfolipídios dissolvidos em solvente orgânico com posterior liofilização e suspensão da mistura liofilizada em tampão (BARENHOLZ et al, 1977), injeção dos fosfolipídios dissolvidos em solvente orgânico na solução tampão com a temperatura suficiente para evaporar o solvente orgânico (SCHIEREN et al, 1978) técnicas de sonicação, remoção de detergentes, homogeneização em agitação de alta velocidade, técnica de injeção de uma fase lipossolúvel em uma fase aquosa em constante agitação com borbulhamento de um gás inerte e extrusão (SZOKA &

PAPAHADJOPOULOS, 1980 ; LICHTENBERG & BARENHOLZ 1988 ; TALSMA et al, 1992a ; WAGNER, VORAUER-UHL & KATINGER, 2000).

Os seguintes parâmetros devem ser levados em consideração quando se formula uma aplicação tópica com lipossomas: composição química, propriedades físicas, estabilidade química e física, local de aprisionamento da substância ativa, capacidade de armazenamento, homogeneidade, compatibilidade com outros excipientes, efeito cosmético, tolerância, comparação com formulações clássicas e demonstração da eficácia (GARCIA, 1998).

Todos os métodos de preparação de lipossomas envolvem uma etapa de hidratação da mistura lipídica. A presença de agentes indutores de carga, bem como a geometria estrutural dos fosfolipídios exerce uma forte influência na morfologia das estruturas que serão formadas. (ISRAELACHVILI MARCELJA & HORN, 1980). Em trabalho realizado por Zhang e colaboradores (2004), as vesículas unilamelares foram produzidas partindo-se de dispersão lipossomal multilamelar através de sucessivas filtrações em membrana de policarbonato de celulose com poros de calibres desejados (HOPE et al, 1985; MAYER et al, 1985; CASTILE & TAYLOR, 1999; ZHANG et al, 2004).

Rieger (1981) empregou técnica semelhante para produzir vesículas multilamelares na qual utilizou a temperatura de evaporação do solvente acima da temperatura de transição de fase do componente de ponto de fusão mais alto presente na mistura de lipídios (RIEGER, 1981).

Outro método utiliza um prélipossoma, que é uma mistura trifásica de lipídio:etanol:água, é citado como a melhor técnica para aumentar-se a capacidade de encapsulamento de fármacos hidrossolúveis (PERRET, GOLDING & WILLIAMS, 1991).

Com o objetivo de se obter vesículas uniformes procede-se a um processo de filtração em membrana de carbonato de celulose, porém tem o inconveniente de ocorrer perda do

material encapsulado devido ao entupimento dos poros da membrana. Já o método que emprega microfluidização reduz a perda do material aprisionado (MAYHEN et al, 1984).

A facilidade de uma substância interagir hidrofobicamente com os lipídios ou eletrostaticamente com as porções polares do lipossoma é que irá determinar os vários tipos de interações existentes entre o lipossoma e o material a incorporar. Com relação a estas interações podemos classificar 4 tipos de fármacos:

- Fármacos que não interagem com as bicamadas, são as substâncias hidrossolúveis.
- Fármacos que interagem com a região hidrofóbica da bicamada, são as substâncias lipossolúveis.
- Fármacos que estão associados às bicamadas por interação eletrostática com a porção polar (cabeça do fosfolípido, por exemplo).
- Fármacos que não são hidrossolúveis e não estão associados às bicamadas.

2.5.2 Caracterização dos lipossomas

Alguns parâmetros devem estar bem definidos quando se utiliza lipossomas como carreadores de princípios ativos, tais como: tamanho da partícula lipossomal, mecanismos que dêem boa estabilidade à vesícula lipossomal (temperatura, viscosidade e pH), relação bem estabelecida entre a quantidade de princípio ativo e a quantidade de fosfolípidios na vesícula formada (capacidade de encapsulamento) e o estudo da liberação do princípio ativo no sítio de ação.

A análise das matérias-primas (fosfolípido e colesterol) que irão compor os lipossomas é de fundamental importância para a formação das vesículas e incorporação das substâncias

Existem vários métodos citados na literatura para a separação e a quantificação de fosfolípidios em preparações lipossomais, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

com as mais variadas composições de fase móvel, modo de fluxo (isocrático ou gradiente) e tipos de detectores (HOX et al, 1977 ; SINGH et al, 2005). A quantificação dos fosfolipídios pode ser feita, também, por cromatografia de camada delgada, dosando-se o fosfolipídio por um método enzimático-colorimétrico ou por método colorimétrico indireto, através da dosagem de fósforo inorgânico (BARTLETT, 1959; STEWART, 1980).

A cromatografia de camada delgada seguida pela análise do teor de fósforo inorgânico após mineralização tem sido uma das mais precisas técnicas para a quantificação de fosfolipídios. Entretanto é um procedimento que demanda tempo e que está na razão direta de uma aplicação precisa do analito e tem um inconveniente de ser de difícil automatização quando da necessidade de se quantificar várias amostras (CHRISTIE, 1982).

Grit e colaboradores (1991) desenvolveram um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de fase reversa e como eluente uma mistura de acetonitrila: metanol e tampão fosfato de amônio 10 mM (pH=4,8) nas proporções 64:28:8 (v/v/v) com fluxo isocrático. No método empregou detector de UV em 206 nm e detector de Índice de refração, comparando os dois tipos de detectores, concluindo ser uma técnica de alta sensibilidade, preciso, de boa resolução (GRIT et al, 1991).

Para a determinação da quantidade de colesterol em preparações lipossomais, variadas técnicas foram desenvolvidas utilizando desde a cromatografia de camada delgada, reações colorimétricas, cromatografia gasosa após derivatização e mais recentemente a cromatografia líquida de alta eficiência. Esta última é a que mais se adequou às formulações por ser apropriado para matrizes líquidas, não requerer o processo de derivatização e por ser um método rápido e seletivo (LANG, 1990).

2.5.3 A estabilidade dos lipossomas

O tempo de prateleira determina a estabilidade química e física. Em relação aos lipossomas a estabilidade química pode ser avaliada pela formação da lisofosfatidilcolina e do

ácido fosfatídico ou pela oxidação dos ácidos graxos insaturados que estão presentes nos fosfolípidios.

Já a estabilidade física pode estar relacionada ao rompimento das vesículas com o concomitante extravasamento do material encapsulado ou a agregação das partículas menores formando vesículas multilamelares grandes (TALSMA et al, 1993b).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Propor uma formulação de lipossoma com repelente de forma a prolongar o seu tempo de ação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar qual a melhor metodologia de preparação de lipossoma incorporando a substância repelente.
- Propor uma metodologia de análise da substância repelente no lipossoma e na preparação.
- Avaliar a formulação desenvolvida contendo a substância repelente, com a finalidade de contribuir para a oferta de um produto que tenha o seu tempo de ação prolongado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instituições envolvidas

Trata-se de uma dissertação com caráter multidisciplinar, portanto, os experimentos foram realizados em vários laboratórios de diferentes instituições.

4.1.1 Faculdade de Farmácia da UFRJ/Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LabCQ) - pesquisa bibliográfica sobre os assuntos abordados na dissertação e as preparações e as análises das matérias-primas e das preparações lipossomais.

4.1.2 Faculdade de Farmácia/ Laboratório de desenvolvimento Galênico - manipulação em escala piloto de um dos métodos de preparação do lipossoma e preparação do gel de Natrosol®.

4.1.3 Instituto de Macromoléculas e colóides/ UFRJ - experimentos para a determinação do tamanho das vesículas lipossomais.

4.1.4 Laboratório de Microscopia Eletrônica, PEMN, COPPE/UFRJ - comprovação visual das vesículas e determinação de tamanho por microscopia eletrônica.

4.1.5 Laboratório Químico Farmacêutico do Exército - manipulação em escala piloto do gel de Carbopol® com DEET usado nos testes comparativos de eficácia das formulações estudadas.

4.1.6 Laboratório de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército convênio com o Instituto Osvaldo Cruz - testes de eficácia do produto, projeto aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de biologia do Exército e enviado para o Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

4.2 Materiais

4.2.1 Equipamentos.

- Cromatógrafo líquido de Alta eficiência – SHIMADZU composto por módulo de mistura e dispensação de fase móvel multicanal – LC-10 A D vp, degaseificador on-line DGU-12A, Auto injetor – SIL-10 A D vp, sistema controlador SCL-10 A vp, compartimento de aclimatação da coluna – CTO-10 Avp, detector de fotodiodos UV/VIS – SPD-M10 Avp e programa computacional CLASS-VP™ VERSÃO 6.1.
- Sistema de filtração MILLIPORE mod 142 WW
- Espectrofotômetro UV-VIS SHIMADZU CORPORATION mod UV-2401 PC com Software UV PC
- Espectrômetro de Infravermelho FTIR – 8300 Perkin Elmer com programa computacional Hyper - IR
- Agitador de tubos – Phoenix – AP56
- Evaporador rotatório R - 114 Buchi®
- Balança analítica – AB 204 – Metler Toledo
- Filtro 142 WW MILLIPORE CORPORATION
- Destilador Quimis
- Placa aquecedora com agitação CORNING
- Ultra-som THORNTRON-14
- Potenciômetro Mettler Toledo MPC 227
- Coluna D-10 com Sephadex G-25 M – Pharmacia Biotech
- Membrana de policarbonato a 0,4 e 0,2 μ m (Nuclepore®)
- Caixas de acrílico teladas, construídas de acordo com o manual da ASTM E 951 – 94 (revalidado em 2000)
- Aparelho Malvern System ZETASIZER 3000HS

- Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL-200 FX a 80 Kv. Utilizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica, PEMN, COPPE/UFRJ.

4.2.2 Reagentes

- Etanol P.A. (VETEC)
- Metanol P.A. (VETEC)
- Metanol para CLAE (TEDIA)
- Ácido sulfúrico P.A.(VETEC)
- Molibdato de amônio (Merck)
- Ácido ascórbico (Roche)
- Peróxido de hidrogênio (VETEC)
- Solução padrão de Fósforo a 20 µg / mL (SIGMA)
- Clorofórmio P.A. (VETEC)
- Acetonitrila para CLAE (TEDIA)
- Acetato de amônio (VETEC)
- Ácido clorídrico (VETEC)
- Bacitracina padrão (USP-PHARMACOPEA)
- Ácido fosfotúngstico (SIGMA)
- Ácido acético glacial (VETEC)

4.2.3 Matérias-primas

- Hidroximetil celulose Natrosol ®
- Colesterol (SIGMA)
- Phospholipon® 90NG (GmbH)
- Phosal® 75 SA (GmbH)
- TRIS – Tris[hidroximetil]aminometano (SIGMA)
- Metilparabeno (RJR Roche)

4.3 Preparação das soluções de uso

4.3.1 Preparação da solução de tampão TRIS pH 6-8.

Foram pesados 2,42 g de Tris[hidroximetil] aminometano grau analítico, transferidos para balão volumétrico de 100 ml, acrescentado água recentemente destilada completando o volume. Ajustado o pH para 6,8 com HCl P.A. A solução foi guardada em frasco de vidro de cor âmbar, sob refrigeração. A solução tem um prazo de validade de quatro semanas.

4.3.2 Preparação da solução de tampão Acetato de amônio (0,03M) pH = 4,5.

Foram pesados 2,30 g de Acetato de amônio. Transferidos para balão volumétrico de 1.000 mL. Completado o volume com água recentemente destilada e ajustado o pH para 4,5 com ácido acético glacial. A solução obtida foi filtrada em membrana de 0,45 µm e armazenada em frasco de vidro de cor âmbar, sob refrigeração. A solução tem um prazo de quatro semanas.

4.3.3 Preparação do reagente Molibdato de amônio.

Foram pesados 2,2 g de Molibdato de amônio grau analítico, transferidos para balão volumétrico de 1.000,0 mL com água recentemente destilada. Em um becher foram acrescentados 400,0 mL de água recentemente destilada. O becher foi colocado em banho de gelo e foram adicionados, lentamente, 7 mL de solução de H₂SO₄ 36 N. O balão com Molibdato de amônio foi colocado em banho de gelo e adicionou-se, lentamente, a solução de H₂SO₄ preparada. Completou-se o volume do balão volumétrico com água recentemente destilada. A solução foi guardada em frasco de polietileno sob refrigeração. A solução tem um prazo de quatro semanas.

4.3.4 Preparação da Solução de H₂SO₄ 10 N

Foram adicionados cerca de 50 mL de água recentemente destilada em um balão volumétrico de 100,0 mL. Este balão foi colocado em um banho de gelo e adicionou-se,

lentamente, 30 mL de H₂SO₄ concentrado, com o auxílio de uma proveta. O volume foi completado com água recentemente destilada.

4.3.5 Preparação da Solução de H₂O₂ 10% (v/v)

Foram medidos com pipeta automática 3,4 mL de Peróxido de hidrogênio e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se o volume com água recentemente destilada. A solução deve ser preparada na hora do uso.

4.3.6 Preparação da Solução de ácido ascórbico 10% (p/v)

Foram pesados 1 g de Ácido ascórbico e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se o volume com água recentemente destilada. A solução deve ser preparada na hora do uso.

4.4 Análise das Matérias-primas

4.4.1 Análise do teor de fosfatidilcolina no Phosal® e Phospholipon®

Duas fontes de fosfatidilcolina de soja: Phospholipon® 90 NG e Phosal® 75 SA foram utilizadas na preparação dos lipossomas. Foi realizada a determinação quantitativa indireta da concentração de fosfolipídios, avaliando-se o conteúdo de fósforo na amostra, pelo Método de Bartlett (BARTLETT, 1959). Iniciamos com a construção de uma curva padrão de fósforo utilizando um método colorimétrico de dosagem em que se estabelece uma relação entre a quantidade de fósforo e a quantidade de fosfolipídio existente na matéria-prima. Neste método, o fosfolipídio sofre primeiramente uma hidrólise ácida, transformando-o em fosfato inorgânico que ao reagir com molibdato de amônio forma o ácido fosfo-molibdico. Este por sua vez forma o complexo azul, utilizando o ácido ascórbico como agente redutor. A intensidade da cor azul desenvolvida é medida espectrofotometricamente.

Foram preparados 3 tubos para o branco, 3 tubos contendo as amostras (Phosal®, Phospholipon®) e 4 tubos contendo padrões em concentrações 50, 100, 150 e 200 µL de uma

solução de fósforo a 20 µg/mL. O mesmo procedimento foi usado para determinação do teor de fosfatidilcolina nos lipossomas.

Esquema do procedimento técnico usado para a dosagem de fósforo das matérias-primas e dos lipossomas formados.

	BRANCO	TESTE	PADRÃO
Etanol p.a.(B1, B2, B3)	1,0 mL	-	-
Amostras (A1, A2, A3)	-	1,0 mL	-
Padrão	-	-	50, 100, 150, 200 µL
H ₂ SO ₄	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL

Misturar e colocar em placa de aquecimento de tubos na temperatura entre 185 – 200°

C. Deixar sob digestão por 30 minutos. Resfriar os tubos de adicionar:

	BRANCO	TESTE	PADRÃO
H ₂ O ₂ 10 %	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL

Misturar e colocar em placa de aquecimento entre 185 – 195 °C. Deixar por 30 minutos. Após este tempo verificar se a solução no fundo do tubo apresenta-se límpida e incolor, caso contrário acrescentar 200 µL de H₂O₂ 10% e repetir o procedimento por mais 30 minutos. Resfriar os tubos e acrescentar na seqüência:

	BRANCO	TESTE	PADRÃO
Molibdato de amônio	4,6 mL	4,6 mL	4,6 mL

Misturar e adicionar:

	BRANCO	TESTE	PADRÃO
Acido ascórbico 10 %	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Misturar e colocar os tubos em placa de aquecimento na temperatura de 90 °C por 20 minutos. Determinar as absorvâncias do branco, da amostra do teste e dos padrões (4 pontos) em 800 nm acertando o zero do espectrofotômetro com água destilada. Determinar as concentrações da amostra através da equação da reta construída.

As amostras de Phosal® e Phospholipon® foram analisadas em triplicata para determinação do teor de fósforo para ser utilizado nos cálculos da quantidade de fosfolípidos adicionados para formação dos lipossomas (FIGURA 5).

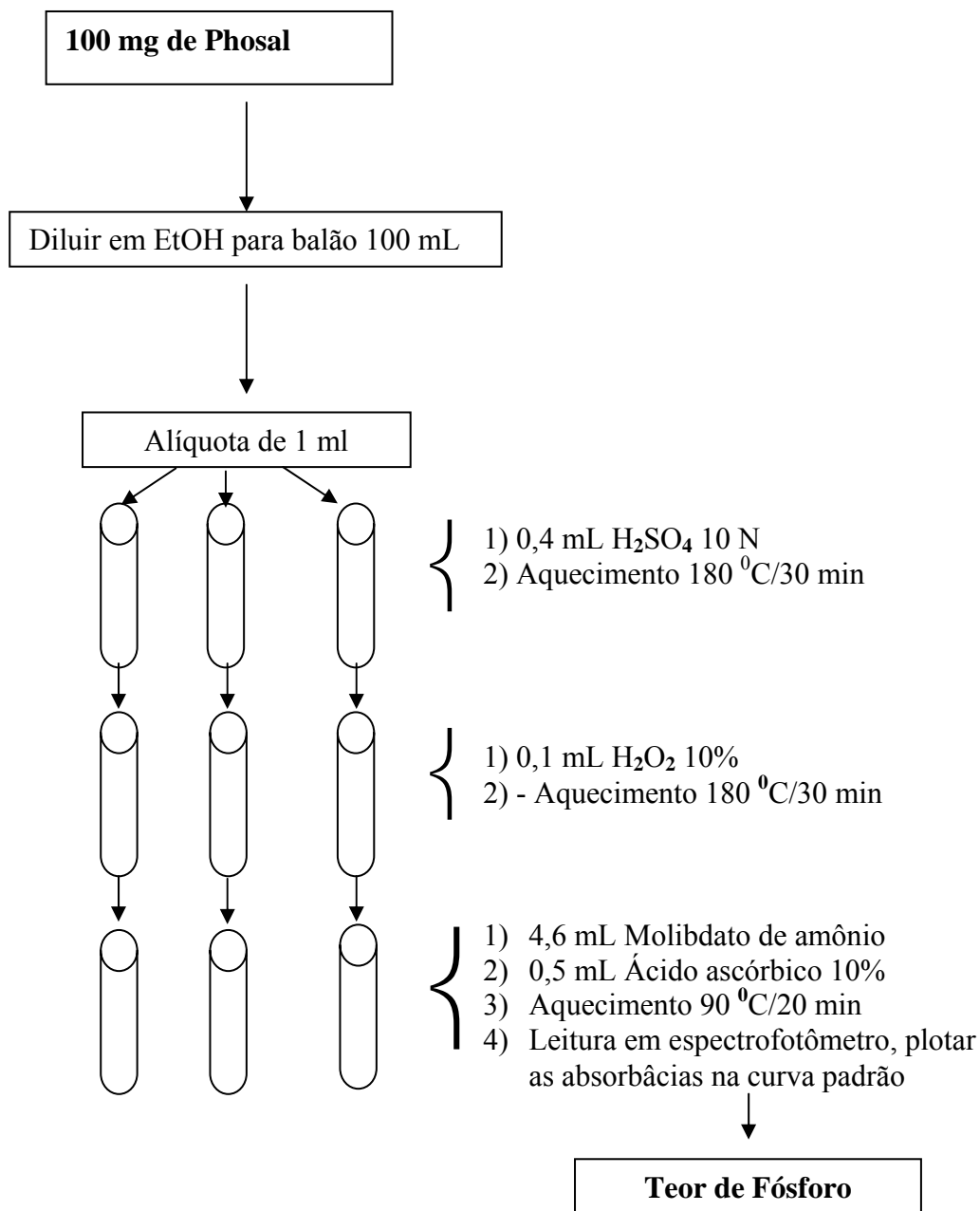


FIGURA 5 - Representação esquemática da Metodologia de análise das matérias-primas Phosal® e Phospholipon® pelo método de Bartlett.

4.4.2 Análise do teor de DEET

Foram feitas as análises das três amostras do DEET (DEET padrão USP, DEET sintetizado no Lasape e DEET comercial). Foi utilizado o padrão primário USP com teor declarado de 98,1% e padrão secundário DEET sintetizado no Lasape (NERY et al, 2003).

O DEET usado como padrão secundário foi testado através da comparação do espectro de infravermelho (IV). Foram feitos os espectros de infravermelho em pastilha de KBr e em filme líquido para o DEET sintetizado pelo Lasape, bem como para o DEET comercial que foi utilizado para produzir os lipossomas.

Todas as amostras do DEET foram analisadas quantitativamente pela monografia da farmacopéia americana (USP 2000).

Foram pesados cerca de 200 mg de DEET em balões de 10,0 mL e diluídas com dissulfeto de carbono P.A. Os balões foram colocados no ultra-som por 15 minutos, obtendo as soluções para as análises. Foram feitos os espectros de Infravermelho em células de 1 mm nos comprimentos de onda compreendidos entre 14,0 e 14,4 μm , usando dissulfeto de carbono como branco.

Os espectros de varredura no UV/VIS das amostras DEET sintetizado no Lasape e DEET comercial, foram realizados no espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2401, na região compreendida entre 300 e 200 nm com o objetivo de determinarmos o λ máximo a ser utilizado no momento de monitorar a porcentagem de ativo encapsulada.

Foram feitos espectros de varredura das soluções ácida e básica para se verificar se havia alguma modificação nos espectros que contribuíssem com as análises por UV.

4.4.3 Análise do DEET nas preparações.

Com a finalidade de determinar o teor de DEET nos lipossomas formados e nas diversas etapas de seu preparo, foi construída uma Curva de Ringbom para a amostra do

DEET (Lasape) para definir as concentrações onde poderia ser traçada a curva de calibração, utilizando o comprimento de onda onde a Lei de Beer fosse seguida.

Foi construída uma curva de calibração de 5 pontos e determinada a equação da reta que será utilizada para o cálculo das quantidades incorporadas.

4.5 Preparação dos lipossomas.

Os métodos de hidratação do filme lipídico e agitação mecânica de um pré-lipossoma foram usados para a preparação dos lipossomas contendo DEET.

Buscou-se associar o DEET de caráter lipofílico ao lipossoma aproveitando as características da vesícula lipossomal, que possui na sua membrana uma parte lipídica (fosfatidilcolina e colesterol).

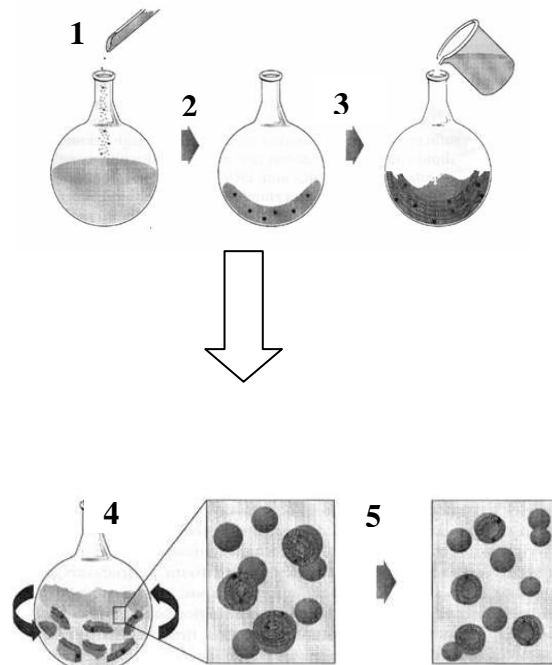
4.5.1 Método de hidratação do filme lipídico.

Os lipossomas 42 mM de PC e 8,4 mM de DEET foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico (Bargham et al 1974). Foram pesados 1,266 g de Phospholipon® 90 NG, 0,243 g de colesterol e 0,070 g de DEET em um balão de fundo redondo com capacidade para 500 mL. Foram adicionados aproximadamente 10 mL de clorofórmio para solubilização das substâncias. O balão foi levado ao evaporador rotatório a 90 rpm, sob vácuo, por duas horas, em banho-maria a 60° C. Após este tempo o balão foi deixado em refrigerador por 24 horas, sendo colocado no evaporador rotatório por mais 15 minutos para retirar qualquer vestígio do solvente utilizado.

Adicionou-se ao balão 50 mL de tampão TRIS (pH = 6,8) e levou-se a agitação em agitador de tubos. Após agitação, deixou-se por mais 24 horas no refrigerador para que o filme lipídico formado ficasse totalmente hidratado. O balão foi agitado com perolas de vidro por mais 15 minutos com auxílio de um agitador de tubos.

A suspensão lipossomal obtida foi submetida a normalização das vesículas formadas em membranas de policarbonato (0,4 μ m e 0,2 μ m) e determinação do pH (FIGURA 6).

Para o preparo dos lipossomas usados como branco nas dosagens de DEET e testes de eficácia foi seguido o mesmo procedimento, porém sem a adição do DEET. Os lipossomas assim preparados foram mantidos sob refrigeração a 4° C até os ensaios de caracterização.



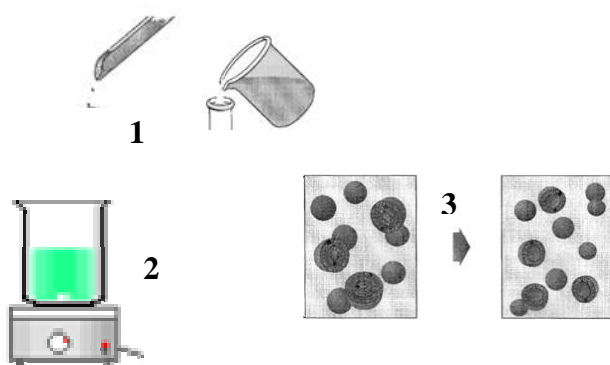
- 1- Adição das matérias primas (fosfatidilcolina, colesterol e DEET) solubilizar em CHCl_3 .
 - 2- Evaporação em do solvente em evaporador rotatório (2 horas) – formação do filme lipídico.
 - 3 - Hidratação do filme lipídico com tampão TRIS (pH= 6,8).
 - 4 – Agitação com pérolas de vidro em agitador de tubos.
 - 5 – Normalização em membranas de policarbonato.
- FIGURA 6 – Representação esquemática da formação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico.

4.5.2 Método do pré-lipossoma.

Preparou-se o lipossoma a partir de uma mistura pronta de fosfolipídios com outros adjuvantes (Phosal®) na concentração de 42 mM, que já havia sido determinada com a melhor proporção para a obtenção de vesículas uniformes e determinação da taxa de incorporação (GARCIA, 1998). Foram pesados 1,030 g de Phosal® e a essa mistura foi adicionado DEET nas proporções de 2,1 mM até 14,7 mM, que correspondem a 5% e 35% de DEET em relação ao total de fosfolipídios da preparação. O material de hidratação utilizado foi o tampão TRIS pH = 6,8.

Pesou-se a quantidade de PHOSAL ® em um becher, a este foi acrescentado a quantidade de DEET de acordo com a proporção estabelecida PC:DEET e misturou-se com um bastão de vidro por 15 minutos, foi adicionado tampão TRIS (pH = 6,8) até completar 25 mL e o becher foi deixado sob agitação mecânica por 2 horas (FIGURA 7).

Para o preparo dos lipossomas usados como branco, seguiu-se o mesmo procedimento, porém sem a adição de DEET. Os lipossomas assim preparados foram mantidos sob refrigeração a 4° C até os ensaios de caracterização.



- 1 – Adição da matéria prima (pré-lipossoma), DEET e tampão TRIS (pH = 6,8).
- 2 - Agitação em agitador magnético (2 horas).
- 3 - Normalização em membrana de polycarbonato de 0,4 µm e 0,2 µm.

FIGURA 7 – Representação esquemática da formação de lipossomas pelo método do pré-lipossoma.

4.5.3 Separação das frações de ambos os métodos para análise

A suspensão lipossomal formada foi separada (FIGURA 8):

1ª fração – solução original.

2ª fração – filtrada por membrana de polycarbonato com poro de 0,4 µm.

3ª fração – filtrada por membrana de 0,2 µm.

4ª fração – 2,5 ml do material da terceira fração foram normalizados em coluna PD-10 contendo Sephadex® G-25 ou G-50, dependendo da concentração do fosfolípido usado.

As Colunas PD-10 pré-compactadas com Sephadex® foram tratadas previamente com 25,0 mL do tampão TRIS, depois foram adicionados 2,5 mL da amostra da terceira fração e eluídos com 3,5 mL do tampão TRIS. Foram recolhidos 2,5 mL da suspensão eluída para análise dos teores de fósforo e DEET.

As quatro frações foram analisadas quanto ao teor de fósforo, pelo método de Bartlett; teor de DEET por espectrofotometria no U.V. no comprimento de onda de 270 nm; determinado o tamanho das partículas por espalhamento da luz laser e somente para a quarta fração foi realizada a microscopia eletrônica por coloração negativa.

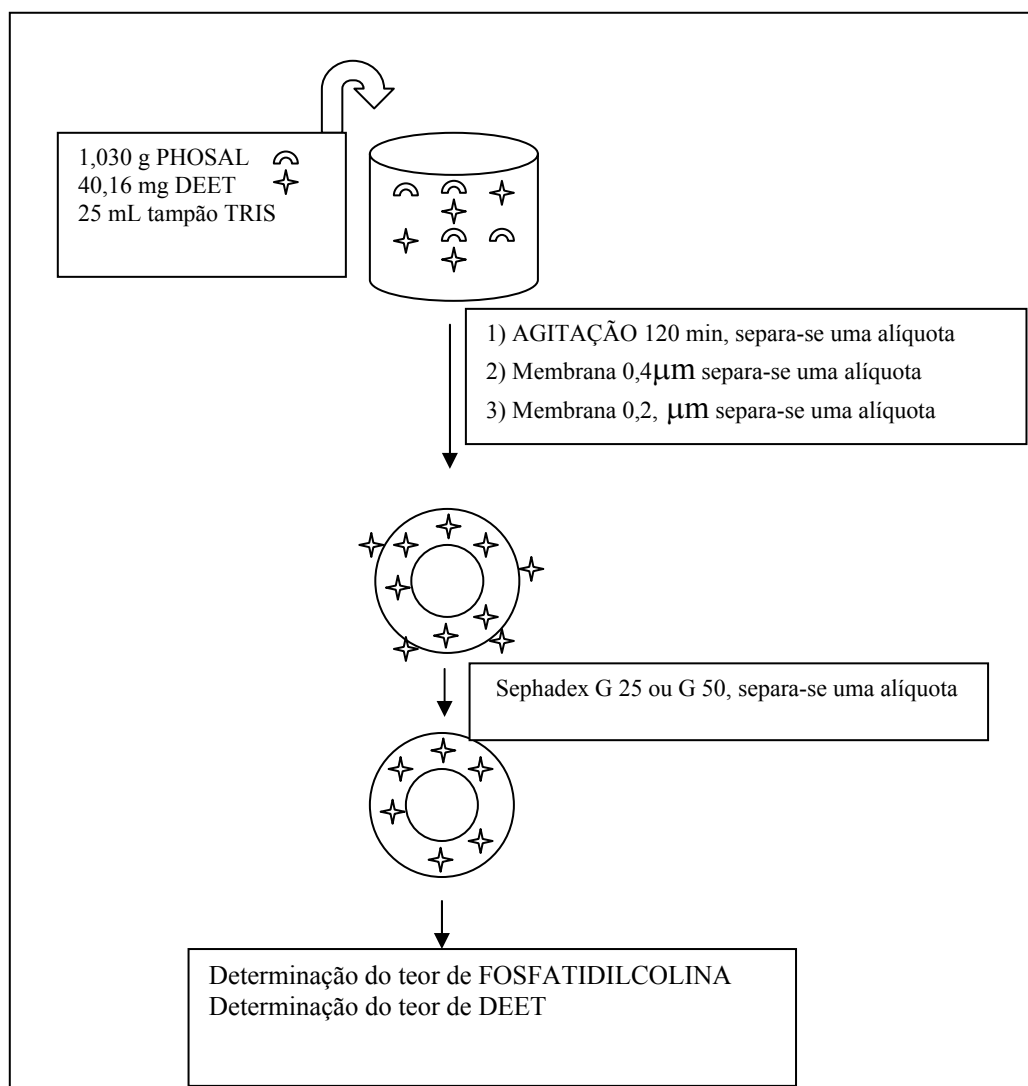


FIGURA 8 – Representação esquemática dos processos de manipulação e análise do fosfolípido e DEET nos lipossomas (42mM PC; 8,4 mM DEET) produzidos.

4.5.4 Formulas testadas para verificação da % de incorporação do DEET.

FORMULA A		
Phosal 75 S A	42,00	mM
DEET.....	2,10	mM
Tampão TRIS .q.s.p.....	25,00	mL
FORMULA B		
Phosal 75 S A	42,00	mM
DEET.....	4,20	mM
Tampão TRIS .q.s.p.....	25,00	mL
FORMULA C		
Phosal 75 S A	42,00	mM
DEET.....	6,30	mM
Tampão TRIS .q.s.p.....	25,00	mL
FORMULA D		
Phosal 75 S A	42,00	mM
DEET.....	8,40	mM
Tampão TRIS .q.s.p.....	25,00	mL
FORMULA E		
Phosal 75 S A	42,00	mM
DEET.....	10,50	mM
Tampão TRIS .q.s.p.....	25,00	mL
FORMULA F		
Phosal 75 S A	42,00	mM
DEET.....	12,60	mM
Tampão TRIS .q.s.p.....	25,00	mL
FORMULA G		
Phosal 75 S A	42,00	mM
DEET.....	14,70	mM
Tampão TRIS q.s.p.....	25,00	mL

As formulas A, B, C, D, E, F, e G tiveram as concentrações de fosfolipídios mantidas, variou-se a concentração de DEET em 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% e 35% em relação ao conteúdo de fosfatidilcolina, respectivamente. Assim foi possível definir a melhor relação entre fosfolipídio: DEET (PC:DEET).

O experimento teve continuidade aumentando-se a concentração de fosfolípido e aumentando a concentração de DEET, mantendo-se sempre a relação de 20% de DEET em relação ao total de lipídios. O máximo de concentração de fosfolípidios na formação das vesículas que se conseguiu atingir foi de 252 mM, nesta concentração só foi possível passar pela membrana de policarbonato utilizando-se um filtro sob pressão do gás N₂.

Foi manipulada uma preparação com as mesmas proporções de fosfatidilcolina, DEET e tampão, utilizando a técnica de hidratação do filme lipídico empregando o Phospholipon® que é a fosfatidilcolina de soja pura.

Os dois lipossomas foram comparados quanto a melhor capacidade de incorporação.

4.6 Preparação das formulações

4.6.1 Preparação do gel de Carbopol®

A metodologia de análise do produto acabado e o teste de eficácia foram realizados nas quatro formulações a seguir:

FORMULA 1

Carbopol®	1,50 g
Metilparabeno	0,20 g
Propilparabeno.....	0,20 g
Propilenoglicol	10,00 g
Etanol.....	31,00 g
Trietanolamina	0,07 g
Silicone.....	4,25 g
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Colocar em contato, por 24 horas, o Carbopol, em água contendo metilparabeno que foi dissolvido á quente. Após 24 horas, colocar a mistura sob agitação e acrescentar o etanol, o propilparabeno, o propilenoglicol, o silicone e por último a trietanolamina. O gel preparado foi mantido sob refrigeração a 4° C até a realização dos testes de eficácia.

4.6.2 Preparação do gel creme de Carbopol® contendo DEET

FORMULA 2

Fase A

Carbopol®	1,50 g
Metilparabeno	0,20 g
Etanol.....	31,00 g
Trietanolamina	0,07 g
Silicone.....	4,25 g
Água destilada q.s.p.....	70,00 mL

Colocar em contato, por 24 horas, o Carbopol, metilparabeno. Após 24 horas, colocar a mistura sob agitação e acrescentar o etanol, o silicone e por último a trietanolamina.

Fase B

Propilparabeno.....	0,20 g
Propilenoglicol	10,00 g
DEET.....	20,00 g

Adicionar a fase B na fase A sob agitação leve, até completa homogeneização. O gel creme assim preparado foi mantido sob refrigeração a 4° C até os testes de eficácia.

4.6.3 Preparação do gel de Natrosol®

FORMULA 3

Natrosol®	1,00 g
Metilparabeno	0,20 g
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

Em banho-maria, aquecer a água com o metilparabeno. Após solubilização do metilparabeno, adicionar o Natrosol®, manter sob agitação constante até formação do gel. Ao atingir o ponto de gel retirar do aquecimento, resfriar até 40 °C, mantendo a agitação até completa homogeneização. O gel assim preparado foi mantido sob refrigeração a 4° C até os ensaios de dosagem em CLAE e testes de eficácia, para ser usado como placebo.

4.6.4 Preparação do gel de Natrosol® contendo lipossomas com DEET

FORMULA 4

Fase A

Natrosol®	1,00 g
Metilparabeno	0,20 g
Água destilada q.s.p.....	39,00 mL

Em banho-maria, aquecer a água com o metilparabeno. Após solubilização do metilparabeno, adicionar o Natrosol®, manter sob agitação constante até formação do gel.

Fase B

Lipossoma 252 mM:20% DEET.....	50,00 g
DEET	9,86 g

Adicionar a fase B na fase A sob agitação leve quando a temperatura estiver em torno de 40° C, deixar esfriar mantendo a agitação, até completa homogeneização. O gel com lipossomas, assim preparado, foi mantido sob refrigeração a 4° C até os ensaios de dosagem do DEET na preparação por CLAE e testes de eficácia.

4.7 Caracterização

Para assegurar a uniformidade das formulações, os lipossomas acrescidos de DEET foram caracterizados nos seguintes parâmetros: tamanho das vesículas, pH e teor de substância ativa.

Para a determinação do teor de DEET nos lipossomas e nas etapas de filtração a que foram submetidos, utilizou-se a espectrofotometria determinando-se a equação da reta, usando etanol P.A. como solvente, no comprimento de onda de 270 nm.

4.7.1 Preparação da curva-padrão do DEET

Para a elaboração da curva-padrão selecionou-se o intervalo do espectro de varredura que melhor seguia a Lei de Lambert-Beer.

Foram feitas leituras dos espectros de varredura, na faixa de 200 – 300 nm, de uma solução, usando o valor de $A 1\% 1\text{cm}$, para verificar o melhor comprimento de onda. Para estes experimentos foi utilizado o DEET sintetizada pelo Laboratório Lasape devido ao grau de pureza. O mesmo procedimento foi utilizado para soluções alcoólicas das matérias primas e para o DEET usado na produção dos lipossomas.

Os lipossomas produzidos foram submetidos a diluições com etanol e foram lidos no comprimento de onda selecionado para a determinação da melhor relação (PC:DEET).

Os lipossomas sem DEET foram diluídos em igual volume de etanol para a determinação do espectro de varredura no UV.

4.7.2 Determinação do tamanho médio dos lipossomas

O tamanho médio dos lipossomas foi determinado por espectroscopia de espalhamento da luz laser com o auxílio do Aparelho ZETASIZER® 3000 HS da Malvem Instruments Ltd. Foram feitas diluições das preparações lipossomais de Phospholipon® e de Phosal® na proporção de 42 mM PC : 8,4 mM de DEET, na concentração aproximada de 1 g/L sendo determinadas em temperatura de 25° C com ângulo de detecção de 90 ° e 290,4 kCps.

4.7.3 Visualização dos lipossomas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a execução da técnica de coloração negativa foi utilizado o método da gota em tela de cobre com filme suporte de pariódio e carbono, solução aquosa de bacitracina 0,1 mg/mL e corante ácido fosfotúngstico, solução aquosa a 2 %, (p/v) neutralizado com solução de KOH 1 M.

Usou-se uma gota de solução de bacitracina para eliminar as cargas negativas depositadas sobre o filme de carbono. A gota foi seca com papel de filtro por capilaridade, após 2 minutos. Logo após, uma gota da preparação do lipossoma diluído foi colocado sobre o suporte. Foi feita uma tela para cada amostra, ou seja, lipossoma 42 mM feito com Phosal® e Lipossoma 42 mM com Phospholipon® ambos com 20 % de DEET em relação aos lipídios

totais. O tempo de deposição do material foi de 2 minutos. Procedeu-se a secagem com papel de filtro e foi adicionado 1 gota do corante fosfotuntstato de potássio, sendo deixado em contato por 2 minutos e secagem com papel de filtro. Essas telas foram deixadas no dessecador até o momento de serem levadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) que foi operado a 80 Kv. As fotografias foram obtidas com aumento próprio para cada amostra.

4.7.4 Análise do DEET nas preparações gel com lipossoma por CLAE

Na análise por CLAE foi usado o método em fase reversa adaptado para dosar DEET em células de Franz (BAYNES, 2002). A metodologia sugerida seguiu os seguintes parâmetros:

TABELA 6 – Parâmetros cromatográficos para a análise de DEET nas preparações.

Coluna cromatográfica	Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 µm
Vazão	1,0 mL/minuto
Temperatura	Temperatura ambiente (24 °C)
Volume de injeção	20 µL
Deteção	250 nm
Fase móvel	Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5): acetonitrila (60: 40) (v/v)

DEET padrão de referência USP foi usado na elaboração da curva de calibração de cinco pontos, a partir de uma solução estoque contendo 1 mg/mL em metanol P.A. Foram pesados 25 mg do DEET padrão e diluídos em balão volumétrico de 25 mL de metanol P.A.

As curvas de calibração foram preparadas com cinco pontos de concentração, compreendidos entre 320 a 480 µg/mL, tendo seu ponto intermediário de 400 µg/mL,

determinando-se a melhor curva de calibração. Cada concentração foi analisada em triplicata e as curvas foram construídas, considerando a média das áreas das duas injeções contra a concentração de cada nível de concentração. Foram calculados os desvios padrão e o coeficiente de correlação.

Para a determinação quantitativa por CLAE optou-se pela metodologia do padrão externo. Foi preparada uma curva de calibração com o ponto central correspondendo a 400 $\mu\text{g/mL}$, que é a concentração média da curva e a de escolha para se determinar a preparação gel com lipossomas contendo DEET e comparamos as áreas dos cromatogramas das preparações com as áreas dos cromatogramas da curva de calibração, através da equação da reta.

As amostras para análise por CLAE foram diluídas a partir das formulações, com metanol P.A. Foram pesadas cerca de 100 mg das preparações, transferidas para balões volumétricos de 50,0 mL para cada análise em CLAE, o que corresponde a concentração média de 400 $\mu\text{g/mL}$, o volume foi completado com metanol P.A. As amostras depois de diluídas foram filtradas em filtro descartável Millex® de 0,45 μ para os suportes de injeção.

O equipamento usado para as análises cromatográficas foi o SHIMADZU com bomba peristáltica programável para mistura de até 4 solventes para fase móvel, um módulo detector programável para detecção em vários comprimentos de onda, no nosso caso fixamos as corridas cromatográficas em três comprimentos de onda: 220, 250 e 270 nm.

As análises cromatográficas foram realizadas em coluna Shimpack C18 CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de cinco micrômetros. A temperatura da coluna utilizada durante o processo foi a temperatura ambiente.

Os componentes da fase móvel foram filtrados em membrana Millipore® de 0,45 μm , separadamente, e a mistura nas proporções desejadas foi realizada pelo módulo de mistura e

dispensação de fase móvel multicanal. Os dados foram armazenados em um programa computacional da SHIMADZU.

As concentrações do DEET nas amostras testadas foram calculadas através das áreas dos picos utilizando uma curva de calibração do padrão primário.

4.7.5 Parâmetros de validação das análises por CLAE, segundo a Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

4.7.5.1 Especificidade

A especificidade foi determinada analisando-se diversas amostras ($n = 6$) da matriz (placebo) para que fosse investigado qualquer composto que interferisse nas análises.

4.7.5.2 Precisão

A precisão foi analisada injetando-se várias amostras na mesma concentração ($n = 6$).

4.7.5.3 Exatidão

A exatidão foi verificada através da determinação em triplicata de três amostras em que se avaliou a concordância entre o valor declarado e o valor encontrado.

4.7.5.4 Recuperação

A recuperação foi analisada através da determinação de diferentes amostras ($n = 6$) do placebo adicionado de uma quantidade conhecida do analito. Esta avaliação também serve como parâmetro de exatidão.

4.7.5.5 Robustez

A robustez foi determinada através da capacidade do método não sofrer interferências por pequenas e deliberadas modificações dos seus parâmetros. Foram avaliados os seguintes parâmetros: composição da fase móvel, força iônica do tampão (pH) e alteração na vazão.

4.8 Determinação da eficácia da preparação repelente.

Comparou-se o gel contendo lipossoma com DEET produzido com Phosal® (FÓRMULA 4) com produto comercial do Laboratório Químico Farmacêutico do Exército (FÓRMULA 2).

A avaliação da eficácia e da persistência da preparação desenvolvida foi realizada através de testes comparativos, pareados, em voluntários sadios, entre a formulação experimental e um produto comercial. Foram usados culicídeos mantidos em laboratório há várias décadas, livres de infecção, da espécie *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller, susceptível a inseticidas.

Esta cepa foi originalmente estabelecida no *Rockefeller Institute* (Nova York, NY) por D. W. Jenkins em 1959 e tem sido usada por laboratórios de todo o mundo como cepa de referência para fecundidade, vigor, uniformidade e susceptibilidade a inseticidas. Foram usados os mosquitos criados no Laboratório de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx), bem como suas instalações.

A manutenção das colônias dos Culicídeos, ou seja, as larvas e adultos de *Aedes aegypti* foram realizadas de acordo com procedimentos-padrão do laboratório. Este processo, de um modo geral, consiste em acompanhamento da eclosão de ovos, manutenção das larvas com água desclorada (FIGURA 9), alimentação das mesmas com ração para cobaia, transferência diária das pupas para gaiolas e alimentação dos adultos com água açucarada *ad libitum* (FIGURA 10).



FIGURA 9 – Representação esquemática do processo de eclosão dos ovos de mosquitos.

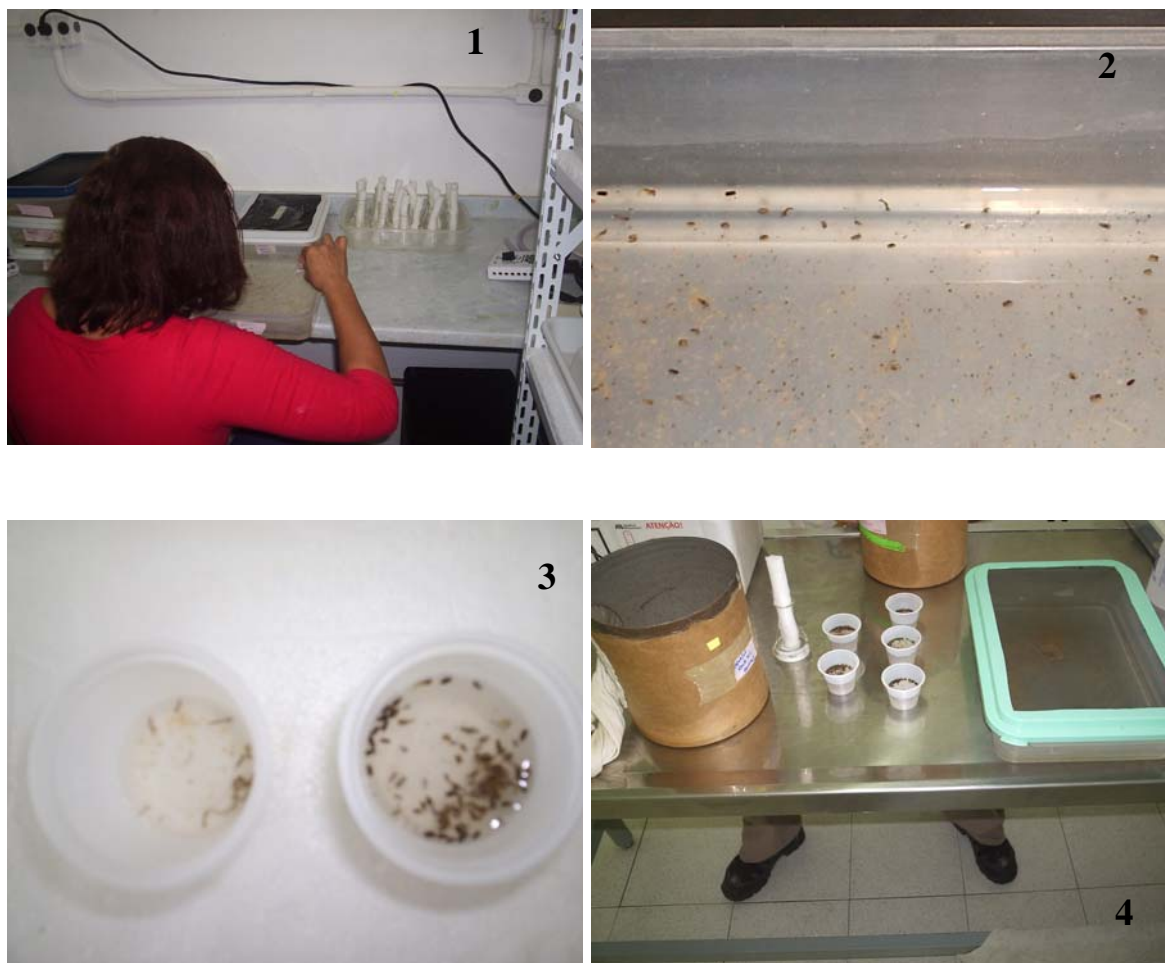


FIGURA 10 – Procedimentos operacionais de manutenção da colônia: manutenção das larvas (1), separação das pupas (2), colocação das pupas em recipientes próprios (3) e montagem das gaiolas para manutenção dos mosquitos adultos (4). Fonte: Autor

Para os testes foram usados nove voluntários sadios, com idades variando entre 18 e 50 anos. Todos os voluntários foram esclarecidos e orientados sobre os objetivos e métodos de pesquisa, assinando um termo de consentimento de ética médica. Os dados obtidos com os ensaios foram submetidos ao teste estatístico de Wilcoxon, não paramétrico, para a comparação de dados pareados.

Foram testadas, de cada vez, duas formulações, em dois dias diferentes. Apenas uma formulação foi testada em cada antebraço a cada vez. O braço esquerdo recebeu sempre uma das formulações-controle e o braço direito, uma das formulações contendo o repelente.

Antes da aplicação das formulações, procedeu-se à lavagem de todo o antebraço com água e sabão, seguida de secagem completa. As formulações foram aplicadas em área de 4 X 4 cm, previamente delimitada com uma caneta dermográfica. A quantidade de cada formulação foi pesada em balança analítica e espalhada na área delimitada com espátula de madeira (FIGURA 11). Os testes se iniciaram 15 minutos depois da aplicação, para garantir a secagem completa das formulações aplicadas.

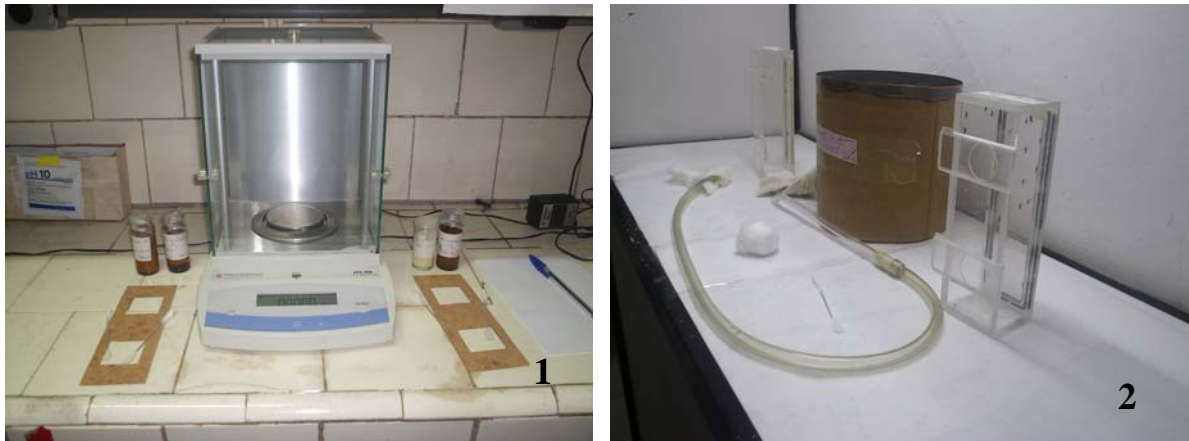


FIGURA 11 – Material usado nos testes de repelência em voluntários

1 – material para aplicação das formulações.

2 – material para coleta das fêmeas e aprisionamento nas caixas de acrílico (1 gaiola, 1 tubo aspirador e 2 caixas de acrílico). Fonte: Autor

Os testes de repelência foram feitos em diferentes momentos após a aplicação: 0 h (na prática, 15 minutos depois da aplicação), 3h, 6h, 7h, 8h e 9h. Estes tempos foram escolhidos de forma a atender a dois critérios: exposição dos voluntários ao menor número possível de *Culicídeos* e cobertura do período de repelência indicado para o produto comercial (de quatro a seis horas), com margem para avaliação de eventual extensão do período de proteção.

Em todos os testes de repelência, para cada um dos pontos experimentais (0, 3, 6, 7, 8 e 9h), foi fixada uma caixa acrílica em cada um dos antebraços, contendo 20 mosquitos adultos fêmea. O tamanho e a forma das caixas acrílicas foram construídas de acordo com o manual da ASTM E 951 – 94 (Re-approvado em 2000) e são teladas em uma das faces e

apresentam, na face oposta, duas aberturas distintas, de 2,9 cm de diâmetro cada (FIGURA 12). Em cada caixa, apenas uma das aberturas foi utilizada, de forma a expor aos mosquitos a área do antebraço contendo a formulação. Em cada ponto experimental, os mosquitos ficaram expostos às formulações por 15 minutos.

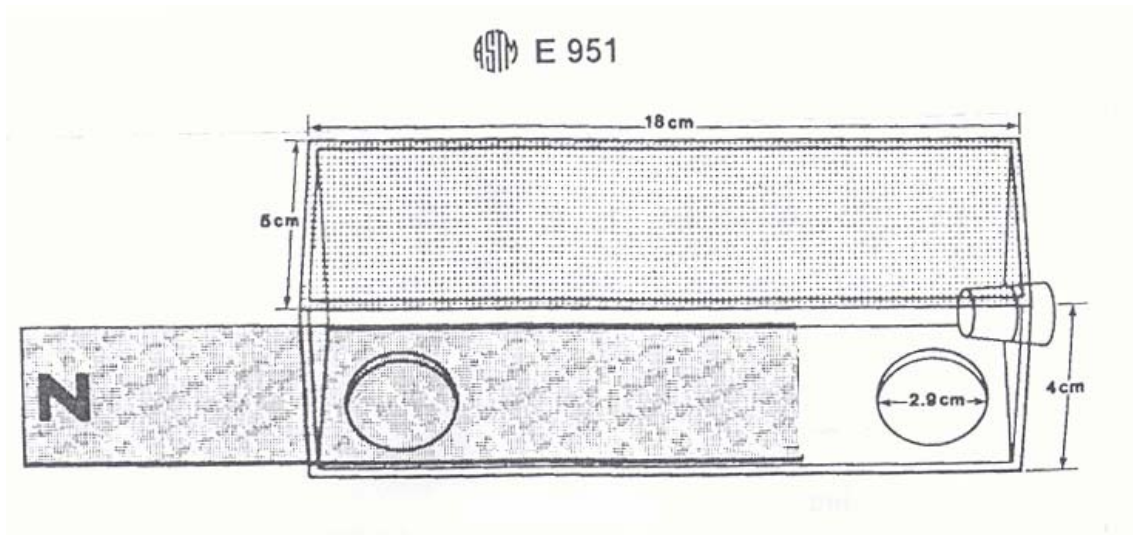


FIGURA 12 – Desenho do projeto para confecção da caixa de acrílico segundo a ASTM.

Foram usadas fêmeas adultas de três a sete dias de idade, não alimentadas com sangue e submetidas, antes do teste, a um jejum de água açucarada de 15-24 horas. Este procedimento, necessário para induzir e normalizar a avidez das fêmeas pelo repasto sangüíneo, é utilizado rotineiramente no laboratório para alimentação das fêmeas de culicídeos, durante a manutenção das colônias.

Em cada ponto experimental foram usados mosquitos diferentes, ou seja, cada mosquito foi usado apenas uma vez (FIGURA 13).



FIGURA 13 – Procedimentos operacionais do teste de repelência: captura das fêmeas de mosquitos com tubo aspirador e contagem dos espécimes (1), colocação dos mosquitos dentro da caixa de acrílico (2), aplicação das caixas nos antebraços (3) e detalhe da área exposta (4).
Fonte: Autor.

Ao final da exposição, foi contado o número de mosquitos que realizou o repasto, através da observação de seus abdomens. Em caso de dúvida, procedeu-se ao esmagamento do mosquito em papel de filtro, para confirmação (FIGURA 14). Outros parâmetros, como número de picadas ou número de vezes que os mosquitos pousaram, ou ainda, tempo de cada picada ou tempo entre uma picada e outra foram descartados: alguns são subjetivos; outros, de avaliação difícil, principalmente com 20 mosquitos de cada vez; outros ainda estariam sujeitos a ruídos experimentais, como seria o caso de quantificação do número de picadas (cada mosquito poderia picar mais de uma vez e, dependendo da quantidade de sangue ingerida a cada vez, sua avidez estaria modificada, ocasionando falta de homogeneidade entre os mosquitos).

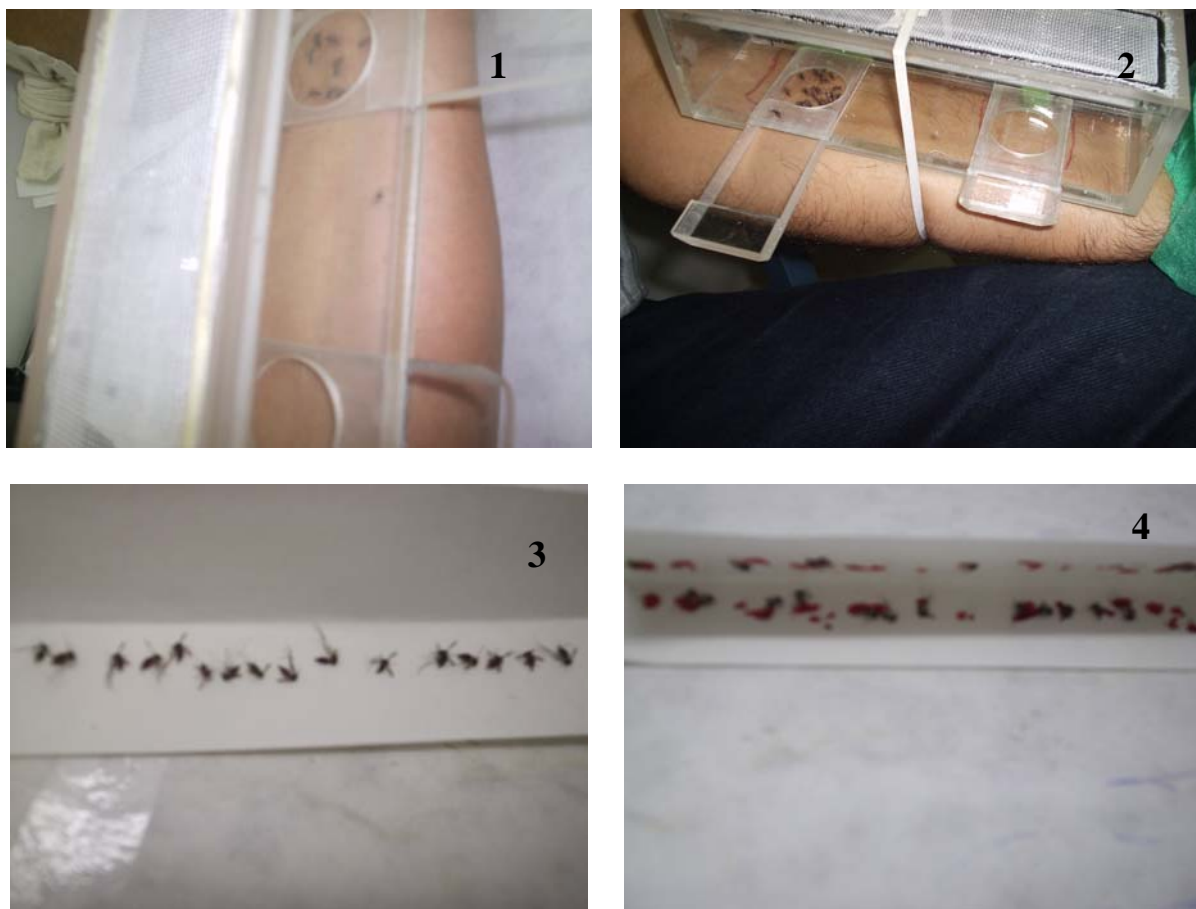


FIGURA 14 – Contagem do número de fêmeas alimentadas:
(1) e (2) número de picadas; (3) e (4) número de fêmeas com abdômen cheio de sangue.
Fonte: Autor.

A metodologia desenvolvida para os testes está descrita com mais detalhes no projeto que foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisas do IBEx e encaminhada ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os lipossomas produzidos foram analisados quanto ao seu teor de fosfolipídios, podendo desta forma avaliar se houve perda do material de membrana e o teor de substância ativa para determinar a quantidade de material incluso no lipossoma.

5.1 Resultado das análises dos teores de fósforo nas matérias-primas Phosal® e Phospholipon®

Para a determinação do teor de fosfolipídios nas matérias-primas e dos lipossomas, foi utilizada a curva de calibração partindo-se da Solução padrão de Fósforo a 20 µg P/mL (TABELA 7).

TABELA 7: Valores de Absorbância para a plotagem da Curva padrão de fósforo.

Concentração µg P/mL	Média das absorbâncias (n = 3)
0,9988	0,1665 ± 0,0562
1,9976	0,3245 ± 0,0284
2,9963	0,4875 ± 0,0142
3,9951	0,6335 ± 0,0223

Iniciou-se com a construção da curva padrão de fósforo utilizando um método colorimétrico de dosagem em que se estabelece a relação entre a quantidade de fósforo e a quantidade de fosfolipídio existente na matéria-prima. Os cálculos teóricos a princípio não estavam tendo boa reprodução na prática, obtendo-se valores aberrantes. Foram observadas algumas variantes que poderiam estar interferindo: tempo de aquecimento, temperatura adequada para a reação e limpeza de toda a vidraria com solução sulfocrômica para eliminar vestígios de fósforo já que o método é extremamente sensível.

Foram repetidas as análises da matéria-prima e para cada análise em triplicata era traçada uma curva de calibração. Após sucessivos doseamentos foi definida a melhor curva padrão com um coeficiente de correlação $r = 0,9997$ (FIGURA 15).

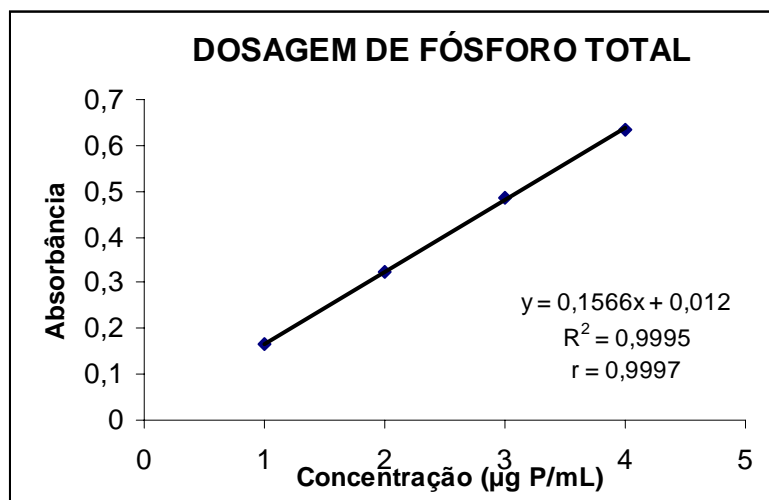


FIGURA 15 – Curva padrão de fósforo.

$y = ax + b$; onde $a = 0,1566$; $b = 0,012$ e $r = 0,9997$; onde: y = variável dependente (absorbância), x = variável independente (concentração em $\mu\text{g/mL}$), a = coeficiente angular da reta, b = coeficiente linear da reta e r = coeficiente de correlação.

Foram quantificados os fosfolipídios do Phosal® e do Phospholipon® pelo método de Bartlett (TABELA 8).

TABELA 8: Resultado das análises do teor de fosfolipídios nas matérias-primas Phosal® e Phospholipon®

Matéria-prima	Teor de fósforo (%)
Phosal®	$78,96 \pm 6,7$
Phospholipon®	$96,70 \pm 3,3$

A determinação da fosfatidilcolina foi feita indiretamente, na qual se mediu o conteúdo de fósforo na amostra, pois mantém uma relação direta com a quantidade de fosfolipídio existente nas matérias-primas, através da relação:

$$775 \text{ g de fosfatidil colina} = 30,97 \text{ g de Fósforo}$$

Neste método, como é mostrado na FIGURA 5 de Materiais e métodos, o fosfolipídio sofre previamente uma hidrólise ácida, transformando todo o fósforo em fosfato inorgânico que após reagir com o molibdato de amônio forma o ácido fosfo-molíbico. O ácido ascórbico adicionado posteriormente formou um complexo azul que foi medido no espectrofotômetro em 800 nm. A intensidade de cor azul corresponde a concentração de fósforo presente, determinado pela curva de calibração, e que corresponde ao conteúdo de fosfolipídios (fosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina).

O teor declarado pelo fabricante das matérias primas, consta da TABELA 9.

TABELA 9: Resultado das análises dos teores de fosfolipídios emitido pelo fabricante GmbH das matérias-primas Phospholipon® e Phosal®.

Matéria-prima	Teor de fosfatidilcolina (%)	Teor de lisofosfatidilcolina (%)	Teor de ácido fosfatídico (%)
Phospholipon®	95,5	2,2	0,0
Phosal®	77,3	1,9	0,0

Fonte: Certificado de análise Nr 15904 e 15881 da GmbH emitidos em 15/10/03 e 18/08/03, que acompanharam as amostras.

Podemos observar que o teor declarado na TABELA 9 e o encontrado na dosagem de fósforo total estão próximos, embora tenha sido usada uma metodologia diferente pelo fornecedor que é a CLAE. O fósforo total para as amostras é a soma de fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina e ácido fosfatídico. Para a amostra de Phospholipon® é de 97,7% o declarado e pelo método de Bartlett encontrou-se a média de 96,70 % e para o Phosal® , o teor declarado é de 79,2% e encontrou-se a média de 78,9 %. A pequena diferença pode ser explicada pelos métodos usados não serem os mesmos ou a possibilidade de interferentes no método de Bartlett, por mais que houvesse a preocupação em tratar os tubos com solução sulfocrômica, além do cuidado com o uso de água recentemente destilada. As análises das amostras, sempre foram em triplicata e o mesmo ocorreu com relação aos brancos no desenvolvimento da reação corada.

5.2 Resultado das análises dos teores de DEET nas amostras de DEET sintetizado e DEET comercial.

Ao iniciarmos os experimentos para incorporação do DEET nos lipossomas não tínhamos um padrão e a substância empregada para confecção da curva padrão foi gentilmente cedida pelo Prof Dr Claudio C. Lopes do Lasape, IQ – UFRJ que sintetizou o DEET, esta substância faz parte de um trabalho desenvolvido em seu Laboratório de Pesquisa empregando o reagente Pentacloreto de Niobium para promover a transformação de ácidos carboxílicos a carboxamidas. Dentre as carboxamidas de interesse estratégico, a dietil-toluamida (DEET) foi sintetizada em seu laboratório. Para verificação do grau de pureza foram feitos espectros de varredura em infravermelho comparando com o DEET comercial (FIGURA 16).

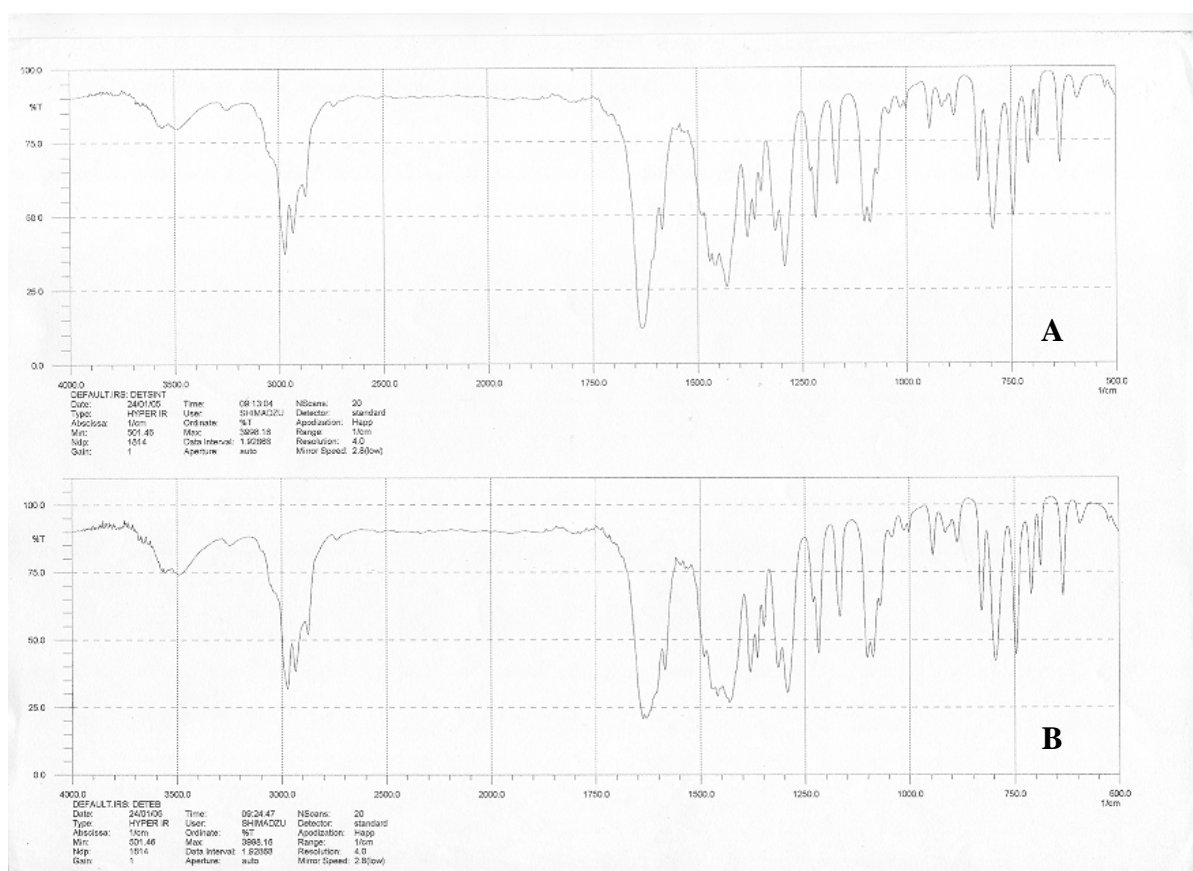


FIGURA 16 - Espectros de IV (filme líquido) das amostras usadas na incorporação de DEET em lipossomas: DEET sintetizado no Lasape (A); DEET comercial (B).

O DEET tem um espectro de absorção na região do UV, cujos comprimentos de onda mais significativos de acordo com o espectro de varredura (FIGURA 17) estão localizados em comprimentos de onda bem definidos, o seu comprimento de onda máximo encontram-se em 210 – 220 e tem uma região entre 260-270 nm que pode ser aproveitada para as análises.

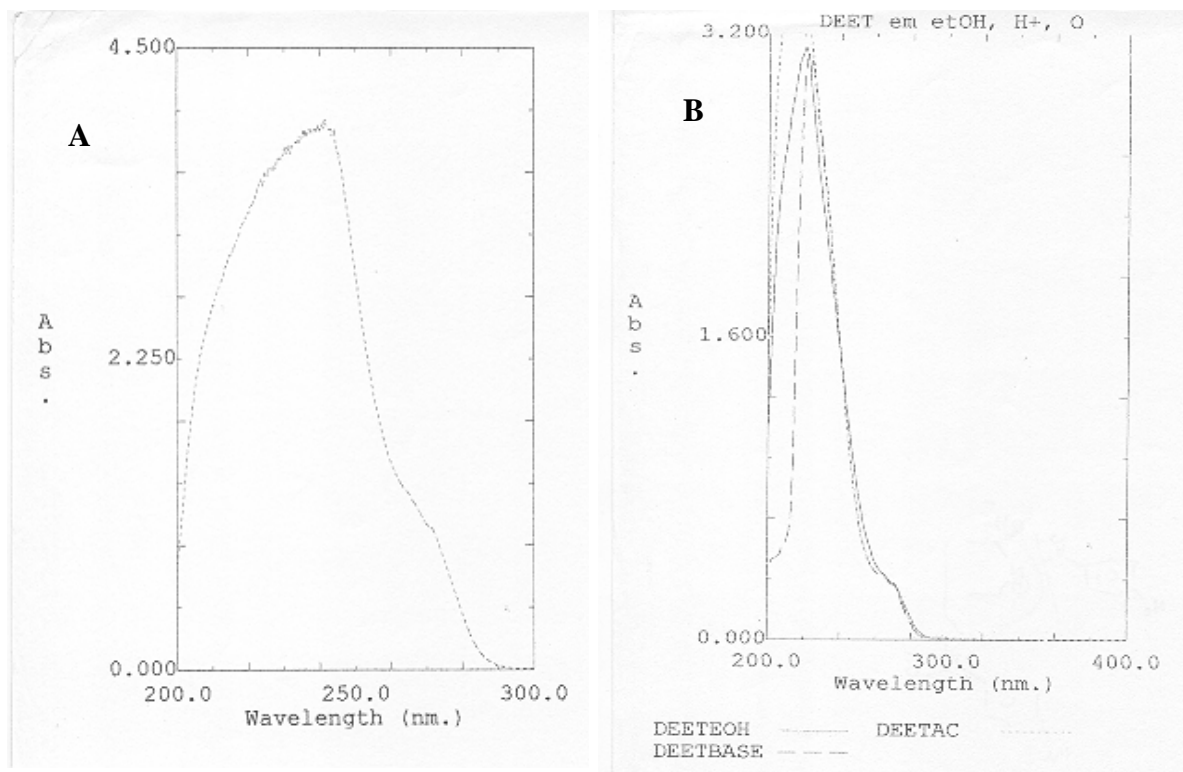


FIGURA 17 - Espectros de varredura no UV/VIS da amostras de DEET usadas como referência na incorporação de DEET em lipossomas. Solvente: etanol (A) e etanol puro, acidificado e alcalinizado (B).

Foi observado que em concentrações pequenas da ordem de 100 $\mu\text{g/mL}$ ou menores, os espectros tinham o comprimento de onda máximo deslocado para região próxima de 210 nm.(FIGURA 18). Esta região do espectro do UV pode sofrer interferência das impurezas presentes no solvente usado, pois no processo de purificação por destilação fracionada adiciona-se benzeno ao etanol com traços de água (azeótropo).

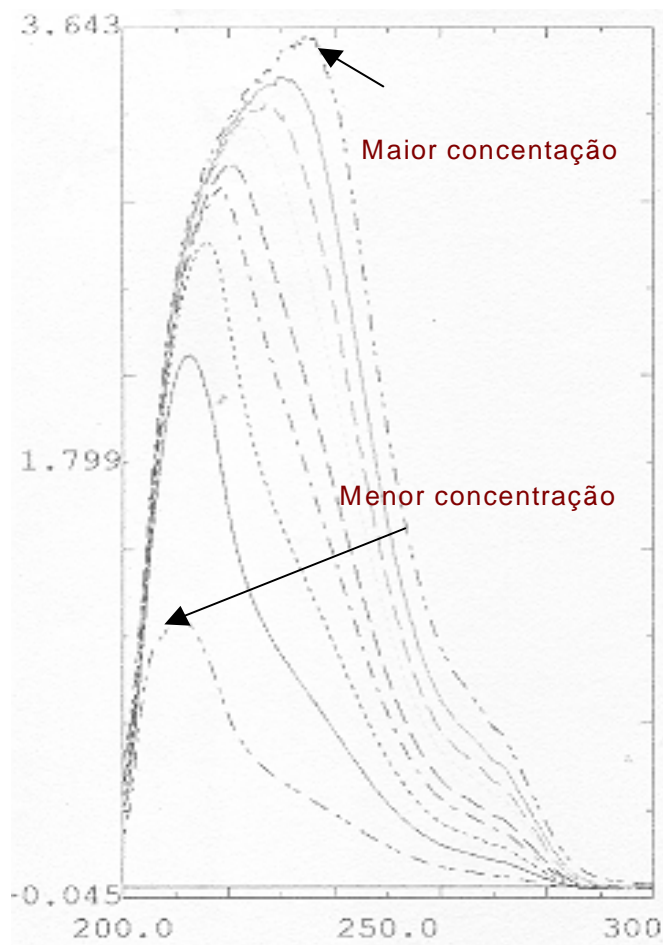


FIGURA 18 – Sobreposição dos Espectros de varredura no UV do DEET em concentrações variadas de 7 mg/ml a 0,1 mg/ml.

Foi realizada uma varredura em solução ácida e básica numa tentativa de contornar o deslocamento do comprimento de onda (FIGURA 17 B), entretanto seu resultado não foi o esperado. Também se tentou trabalhar no espectro de varredura utilizando o recurso da derivada do comprimento de onda (FIGURA 19), sendo que este recurso ficou de ser utilizado como uma metodologia mais simples, necessitando ser validada, visto que requer um software acoplado ao espectrofotômetro.

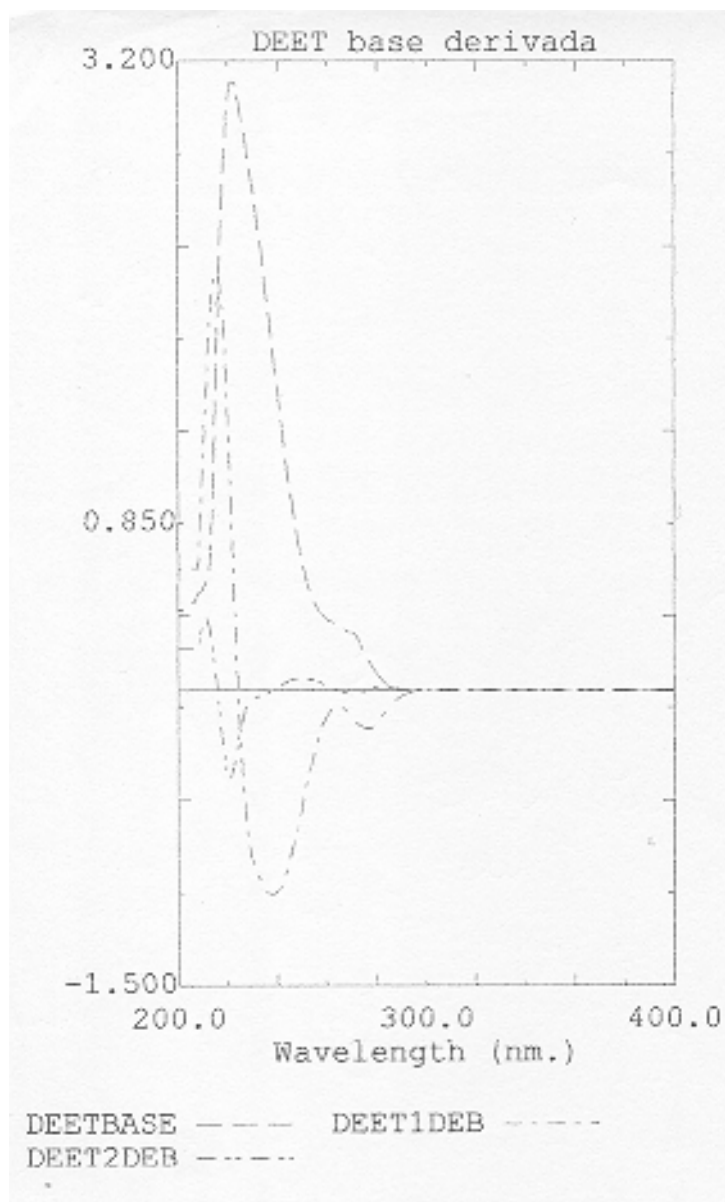


FIGURA 19 – Espectro de varredura no UV da 1ª e 2ª derivação.

Na região do espectro de varredura de 270 nm, foi verificado que ocorre uma relação linear entre absorbância e a concentração como é mostrado na FIGURA 20. Este comprimento de onda foi o escolhido para a construção da curva padrão do DEET para ser usada nos ensaios de incorporação nos lipossomas.

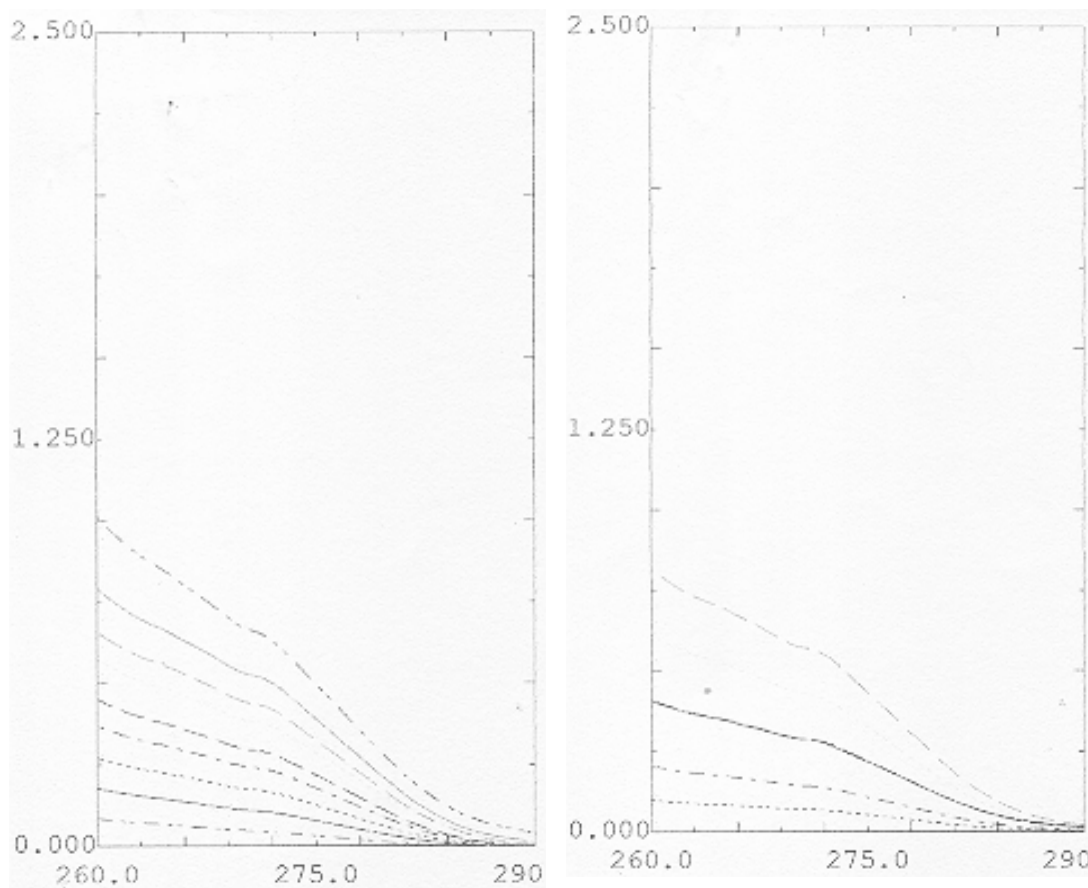


FIGURA 20 – Espectro de varredura do DEET no UV em diferentes concentrações na região entre 260 e 290 nm.

Foram feitas três curvas do padrão de DEET com 5 pontos de concentração no comprimento de onda de 270 nm. (TABELA 10). O ponto médio da curva de calibração do DEET ficou compreendido entre as concentrações de 5% de DEET em relação a concentração de fosfatidilcolina e 40% de DEET em relação a concentração de fosfatidilcolina, tomando como referência a relação 42 mM de PC, ou seja: 2,1 mM de DEET e 16,8 mM de DEET. Desta forma foi definida a melhor curva padrão com um coeficiente de correlação $r = 0,9997$ (FIGURA 21).

TABELA 10: Curva padrão de DEET.

Concentração mg/mL	Média das absorbâncias
0,0699	0,01128
0,1442	0,02255
0,2905	0,04510
0,4332	0,06765
0,5769	0,09020

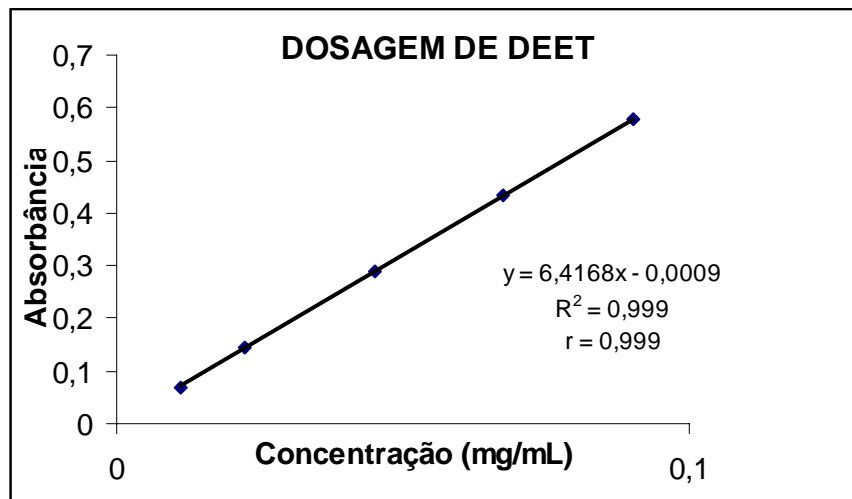


FIGURA 21 – Curva padrão de DEET.

$Y = ax + b$; onde $a = 6,4168$; $b = -0,0009$ e $r = 0,999$; onde: y = variável dependente (absorbância), x = variável independente (concentração em mg/mL), a = coeficiente angular da reta, b = coeficiente linear da reta e r = coeficiente de correlação.

5.3 Resultado das análises dos teores de PC e DEET nas formulações manipuladas para verificação do teor máximo de incorporação do DEET.

Foram feitas várias análises dos lipossomas manipulados para verificarmos o teor de fosfatidilcolina (PC) nas etapas da produção do lipossoma, bem como teor de DEET incorporado (TABELAS 11 e 12).

TABELA 11: Resultado das análises do teor de PC nas formulações manipuladas pelo método do pré-lipossoma.

% PC no lipossoma	RELAÇÃO PC:DEET						
	42 mM :2,1 mM	42 mM :4,2 mM	42 mM :6,3 mM	42 mM :8,4 mM	42 mM :10,5 mM	42 mM :12,6 mM	42 mM :14,7 mM
Antes de filtrar	87%	87%	86%	90%	91%	85%	75%
após memb 0,4 µm	90%	90%	82%	87%	89%	81%	75%
após memb 0,2 µm	94%	94%	81%	87%	91%	81%	75%
após sephadex G50	66%	66%	69%	75%	75%	75%	67%

TABELA 12: Resultado das análises do teor de DEET nas formulações manipuladas pelo método do pré-lipossoma.

% DEET no lipossoma	RELAÇÃO PC:DEET						
	42 mM :2,1 mM	42 mM :4,2 mM	42 mM :6,3 mM	42 mM :8,4 mM	42 mM :10,5 mM	42 mM :12,6 mM	42 mM :14,7 mM
antes de filtrar	88%	94%	85%	98%	84%	84%	83%
Após memb 0,4 µm	89%	93%	82%	94%	80%	80%	71%
Após memb 0,2 µm	89%	92%	82%	94%	83%	83%	66%
Após sephadex G50	27%	72%	71%	76%	60%	60%	51%

Ficou evidenciado que, nos experimentos realizados, a melhor relação PC : DEET foi 42 mM de PC para 8,4 mM de DEET (FIGURA 22).

Foram manipulados lipossomas nestas concentrações utilizando os dois métodos citados para verificar a melhor metodologia de incorporação para este ativo (TABELA 13).

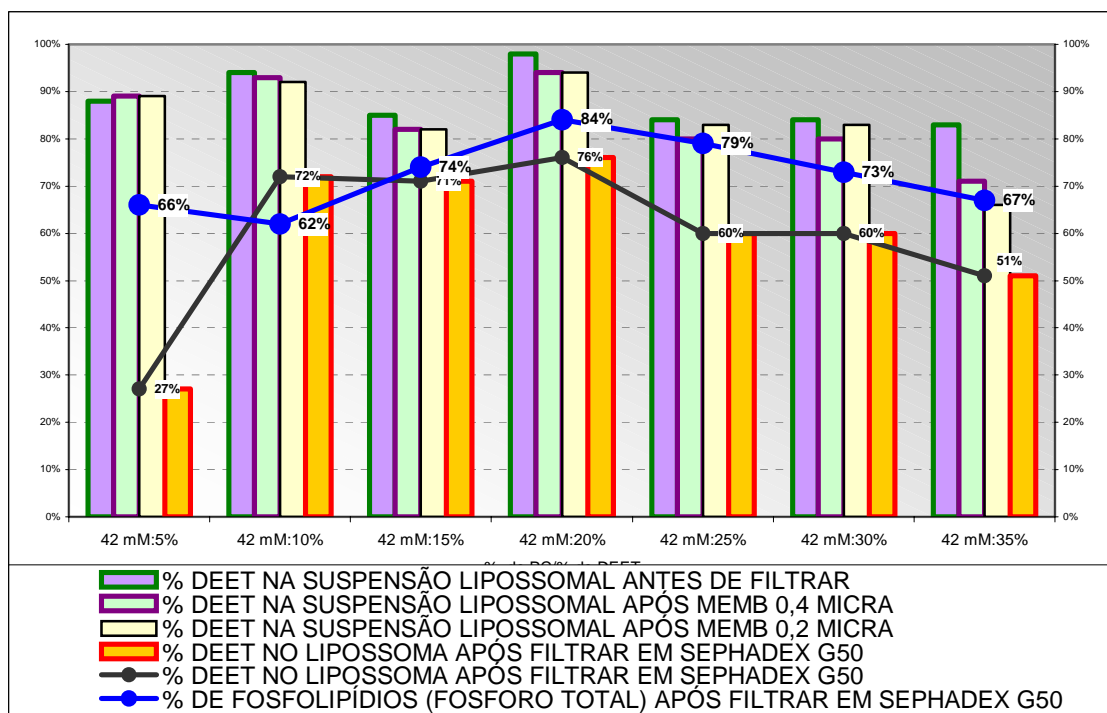


FIGURA 22 – Gráfico dos resultados das análises de PC e DEET nos lipossomas manipulados pelo método do pré-lipossoma (taxa de incorporação).

TABELA 13: Resultado comparativo da incorporação de DEET em lipossoma 42 mM.

LIPOSSOMA 42 mM		% fosfolípido	% DEET
Phospholipon® 90 NG *n = 2	Sem filtrar	93,6 ± 5,8	71,6 ± 2,1
	Membrana 0,2 µ	93,8 ± 2,6	67,1 ± 2,8
	Coluna sephadex® G50	78,6 ± 8,9	39,5 ± 5,2
Phosal® 75 S A *n = 3	Sem filtrar	93,5 ± 2,5	85,2 ± 9,2
	Membrana 0,2 µ	94,6 ± 1,6	83,5 ± 6,7
	Coluna sephadex® G50	73,8 ± 2,7	68,7 ± 11,4

No método do pré-lipossoma elimina-se a etapa de evaporação do solvente, indicando ser o ponto crítico na preparação com este ativo, este método se mostrou mais eficaz. Já no método de hidratação do filme lipídico supomos que possa ter ocorrido perdas durante o processo de incorporação.

A técnica de manipulação indicada pelo fabricante PHOSPHOLIPID GmbH® preconiza o uso de água destilada para ressuspender o filme lipídico, no caso do Phospholipon® ou mistura com água seguido de agitação por 15 minutos, no caso do Phosal®. Entretanto, foram introduzidas algumas modificações: o uso de tampão TRIS pH 6,8 por aumentar a estabilidade de incorporação do ativo nas vesículas formadas pela hidratação do filme lipídico, por 24 horas em refrigeração seguida de agitação no agitador de tubos com pérolas de vidro para a matéria-prima Phospholipon® e hidratação com tampão TRIS pH 6,8 seguida de agitação por 2 horas em agitador magnético.

As metodologias empregadas para monitorar o teor de DEET no lipossoma por espectrofotometria UV/VIS e do teor de PC por colorimetria se mostram bem apropriadas e de fácil execução. No caso da espectrofotometria UV/VIS (FIGURA 23), podemos verificar que no comprimento de onda escolhido, isto é, 270 nm se mostrou bastante adequado. O mesmo não se pode dizer de outros comprimentos de onda próximos do λ máximo (220 nm) uma região de muitos interferentes.

O DEET é uma substância lipossolúvel e o modelo proposto por Ho e colaboradores (1985), com relação à incorporação, é de substâncias lipossolúveis interagirem com as moléculas lipofílicas que compõem a membrana do lipossoma. Ao contrário de outras substâncias que são incorporados no compartimento interno e que são hidrossolúveis, os métodos propostos para a análise desta substância requer solubilização do lipossoma com um surfactante ou um solvente adequado. No caso da análise empregada para determinar a concentração do DEET, o solvente utilizado foi o etanol que tanto serviu para desintegrar as

vesículas lipossomais como para extrair a substância encapsulada, eliminando a etapa de múltiplas extrações necessárias para recuperar o ativo com a formação de uma solução límpida. Os procedimentos de extração consomem tempo durante a análise, podem introduzir erros por perda de ativo e muitas das vezes formam produtos instáveis que se tornam incompatíveis com a análise.

Através de um simples processo de solubilização, em que foram pipetados 500 μL da suspensão lipossomal, diluídos com etanol P. A. para balão volumétrico de 10 mL seguido de leitura em 270 nm, foi possível a determinação da taxa de incorporação. Um método de fácil execução, rápido e relativamente barato.

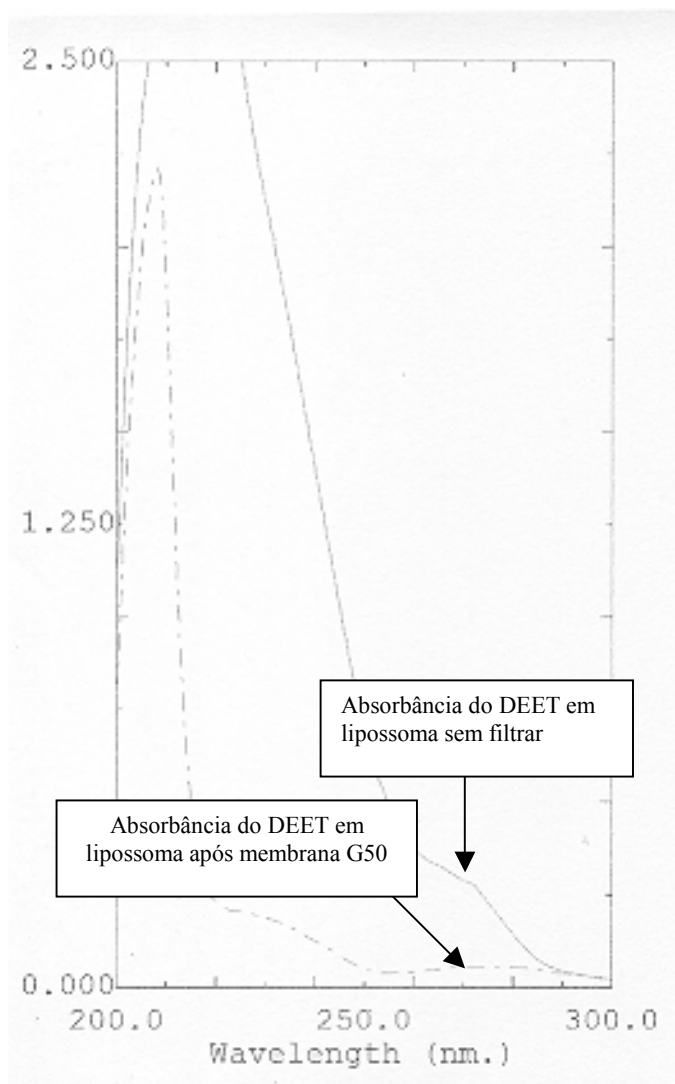


FIGURA 23 – Espectro de varredura da diluição em etanol empregada para analisar a concentração de DEET nos lipossomas 42 mM PC : 4,8 mM DEET.

5.4 Análise das preparações gel contendo lipossoma com DEET

Para a análise das preparações manipuladas com a Fórmula 4, ou seja, lipossoma 252 mM PC contendo DEET a 20% veiculados em gel de Natrosol® a 1%, foi usado o método de CLAE, partindo-se da técnica desenvolvida por Baynes (2002), com pequenas modificações.

Para a construção da curva de calibração foi usado o DEET padrão USP com o teor declarado de 98,1%. O mesmo padrão foi usado para quantificação das duas amostras de DEET empregadas para incorporação e determinação dos teores nos lipossomas 42 mM PC.

Foram feitos espectros infravermelho (IV) quantitativos de DEET de acordo com a monografia da USP 27, das 3 amostras, no intervalo entre 500 – 4000 cm^{-1} . Foi escolhida a região do espectro entre 14,1 μm e 14,4 μm que tivesse um pico mais homogêneo para aplicar a Lei de Beer (FIGURA 24).

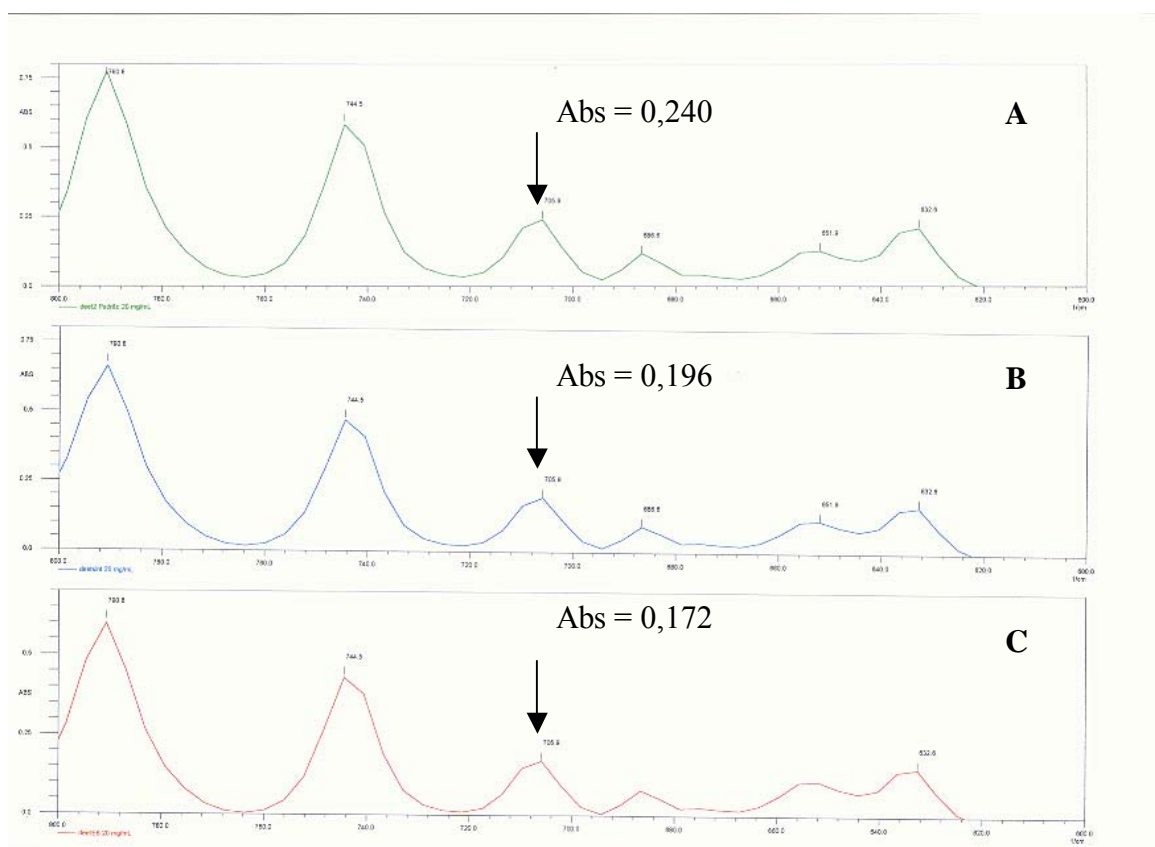


FIGURA 24 – Espectro de infravermelho das amostras de DEET: padrão USP (A) DEET do Lasape (B) e DEET comercial (C), ampliado no intervalo entre 600 – 800 cm^{-1} . Solvente: dissulfeto de carbono.

Os resultados das análises das amostras de DEET por infravermelho, encontram-se na TABELA 14 e os resultados da curva de calibração por CLAE (FIGURA 25), encontram-se na TABELA 15.

TABELA 14: Resultado das análises das amostras de DEET por infravermelho.

Amostra	Concentração mg/mL	Absorbância 705,89 cm ⁻¹	Grau de pureza (%)
Padrão DEET USP	19,44	0,240	98,1
DEET sintetizado	15,88	0,196	80,1
DEET comercial	13,93	0,172	70,3

TABELA 15: Valores para o cálculo da Curva de calibração do DEET por CLAE.

Concentração µg/mL	Média das áreas (n = 6)
320,000	2910566 ± 20578
360,000	3090149 ± 14906
400,000	3762574 ± 74851
440,000	4187495 ± 79182
480,000	4658640 ± 38005

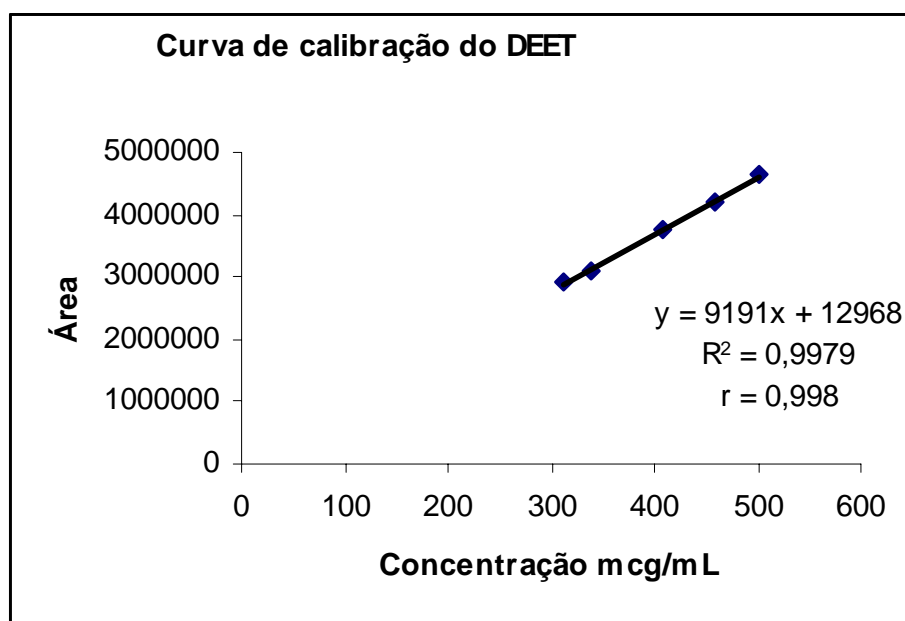


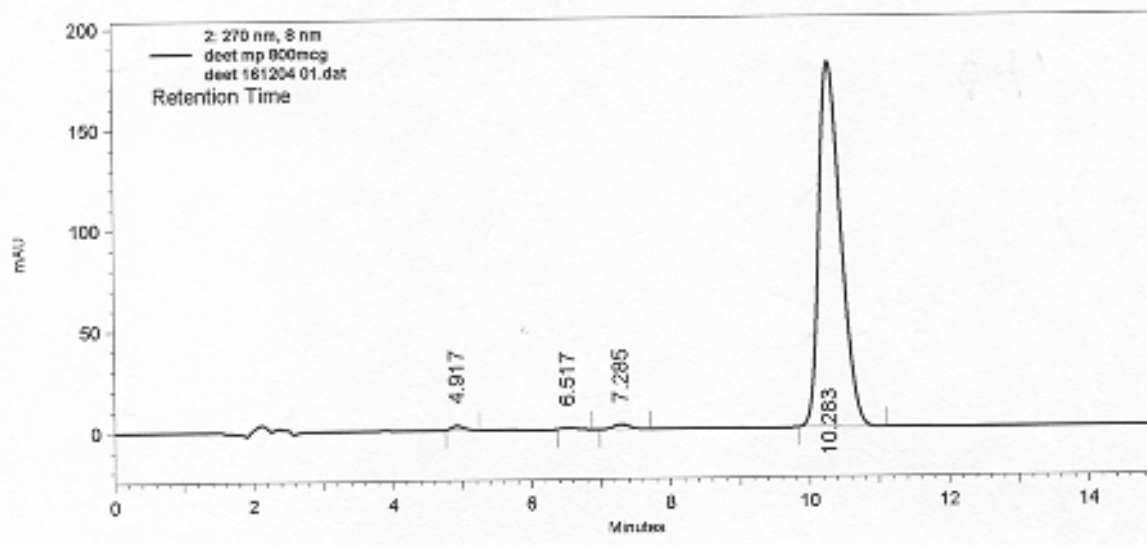
FIGURA 25 – Curva de calibração do DEET por CLAE.

$y = ax + b$; onde $a = 9191$; $b = 12968$ e $r = 0,998$; onde: y = variável dependente (absorbância), x = variável independente (concentração em $\mu\text{g/mL}$), a = coeficiente angular da reta, b = coeficiente linear da reta e r = coeficiente de correlação.

No desenvolvimento da metodologia de análise das preparações contendo lipossomas com DEET por CLAE, inicialmente buscou-se na literatura trabalhos sobre a determinação do teor de DEET em matrizes semelhantes às nossas preparações e encontrou-se dois artigos. Em um dos artigos foi utilizado o método de eluição isocrático (BAYNES, 2002) e no outro o método de eluição gradiente (ABU-QARE, 2001).

Partindo-se da técnica desenvolvida por Baynes (2002) introduziu-se pequenas modificações alterando-se os parâmetros como o do tratamento das amostras antes das análises e estudando-se o o perfil cromatográfico em outros comprimentos de onda. A FIGURA 26 mostra o cromatograma obtido com a amostra de DEET do Lasape, em que o tempo de retenção conseguido com as condições de trabalho foi de 10 minutos.

DEET - Matéria-prima - 800mcg/mL



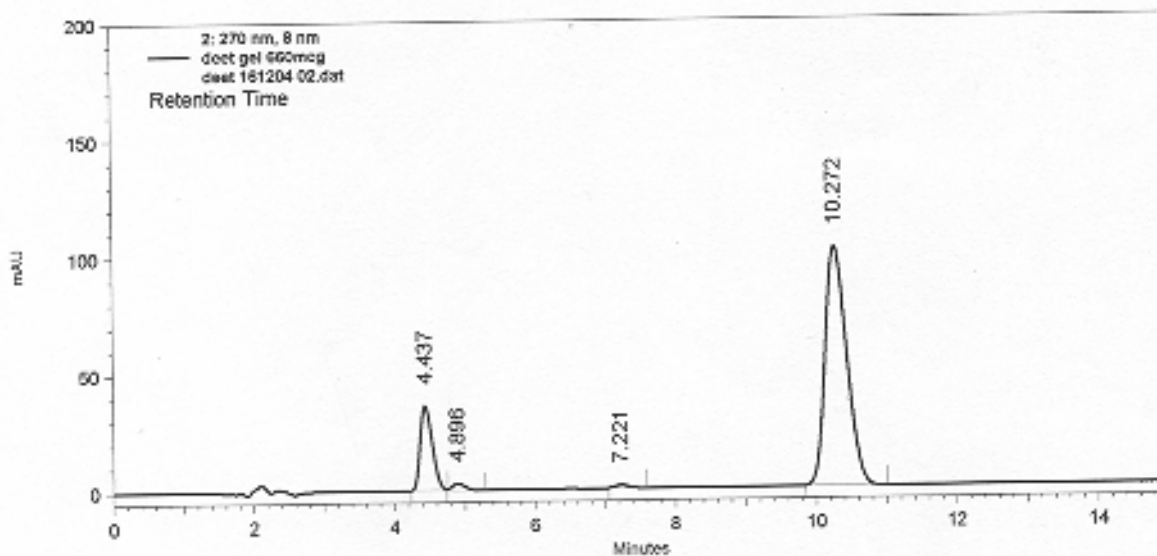
Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 μ m
Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 64:36
Modo: isocrático
Vazão: 1 mL/min
Detetor: fotodiodos UV/VIS, $\lambda = 270$ nm

FIGURA 26 – Cromatograma do DEET matéria-prima na concentração 800 μ g/mL.

A partir dos dados da corrida cromatográfica com a amostra do DEET, procedeu-se da mesma forma com a preparação gel com lipossoma contendo DEET.

Para proceder as análises, as amostras de gel de Natrosol® com lipossomas contendo DEET, foram pesadas e diluídas em MeOH P. A. Foram pesados 100 mg da preparação gel com lipossoma contendo DEET e diluiu-se em balão volumétrico de 50,0 mL ou pesaram-se 1,0 g da preparação e após a diluição em balão volumétrico de 50,0 mL, retirou-se uma alíquota de 1,0 mL desta solução e diluiu-se com MeOH para balão volumétrico de 10 mL. Após ser filtrada para o porta amostra, esta foi injetada no cromatógrafo (FIGURA 27).

DEET - Gel com Lipossoma - 660mcg/mL de DEET



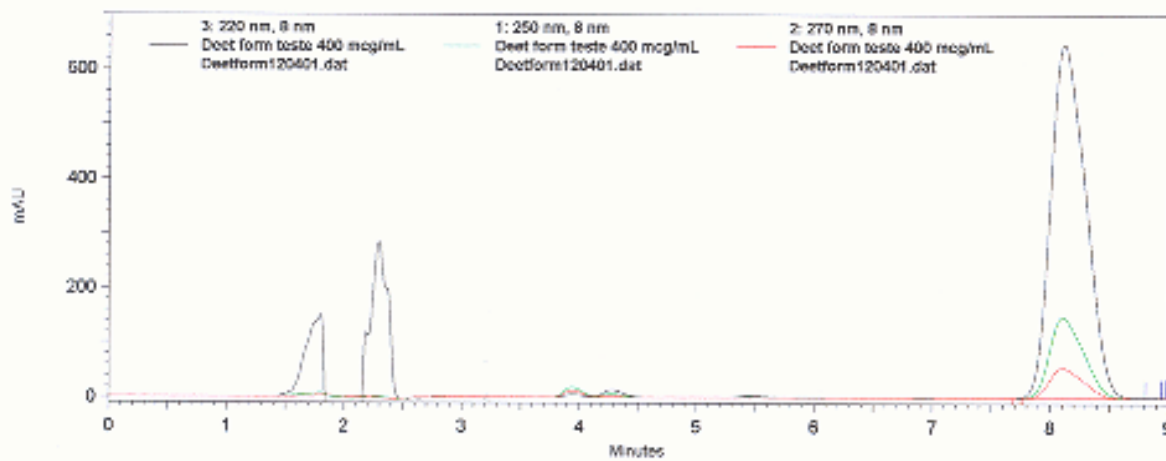
Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 μ m
Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 64:36
Modo: isocrático
Vazão: 1 mL/min
Detetor: fotodiodos UV/VIS, $\lambda = 270$ nm

FIGURA 27 – Cromatograma do gel com lipossoma e DEET concentração 600 μ g/mL.

Procedeu-se à análise do DEET em diferentes comprimentos de onda, a fim de se verificar a relação área do cromatograma x concentração. Desta vez foi testada também a modificação da composição da fase móvel passando-se a realização das corridas com as proporções da fase móvel acetato de amônio (pH = 4,5): acetonitrila em 60 : 40 (v/v), com o objetivo de diminuir o tempo de retenção do DEET e conseqüentemente o tempo de análise (FIGURA 28).

FASE MÓVEL: Tampão AcOH3N (pH 4,5) : CH3CN (60:40)
 FLUXO: 1mL/min VOL INJE.: 20mcL

DEET - Formulação - 400 mcg/mL



Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 μ m
 Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 60:40
 Modo: isocrático
 Vazão: 1 mL/min

Detetor: fotodiodos UV/VIS, $\lambda = 220$ nm, 250 nm e 270 nm

FIGURA 28 – Sobreposição dos picos em diferentes comprimentos de onda (220, 250 e 270 nm) no cromatograma do gel com lipossoma e DEET concentração 400 μ g/mL.

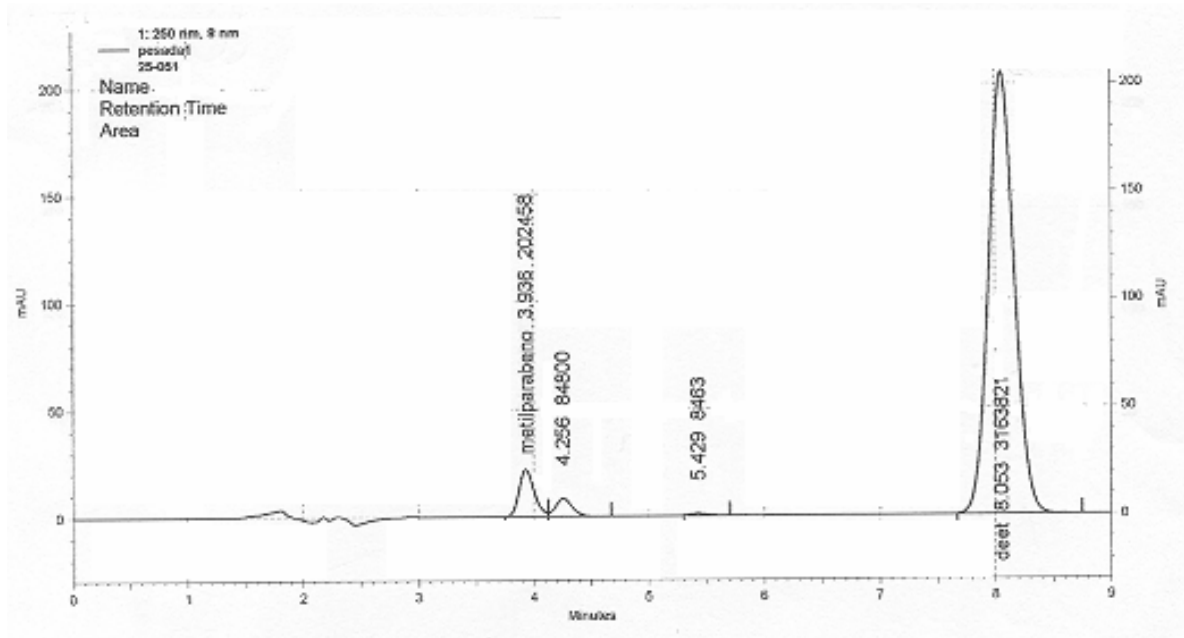
A otimização da composição da fase móvel que inicialmente era tampão acetato de amônio 0,3 M (pH=4,5) e acetonitrila nas proporções 64:36 (v/v) passando para 60:40 (v/v) não provocou uma modificação na detecção dos picos eluidos tendo em vista que o detetor empregado de UV/VIS não se mostrou sensível a variações na fase móvel. Optou-se por modificar a composição da fase móvel ao invés de modificar a vazão para que a corrida cromatográfica tivesse o seu tempo reduzido, o que ocorreu encurtando o tempo de retenção do pico do DEET para 8 minutos.

5.5 Análise do comportamento das corridas cromatográficas com a modificação de alguns parâmetros do método

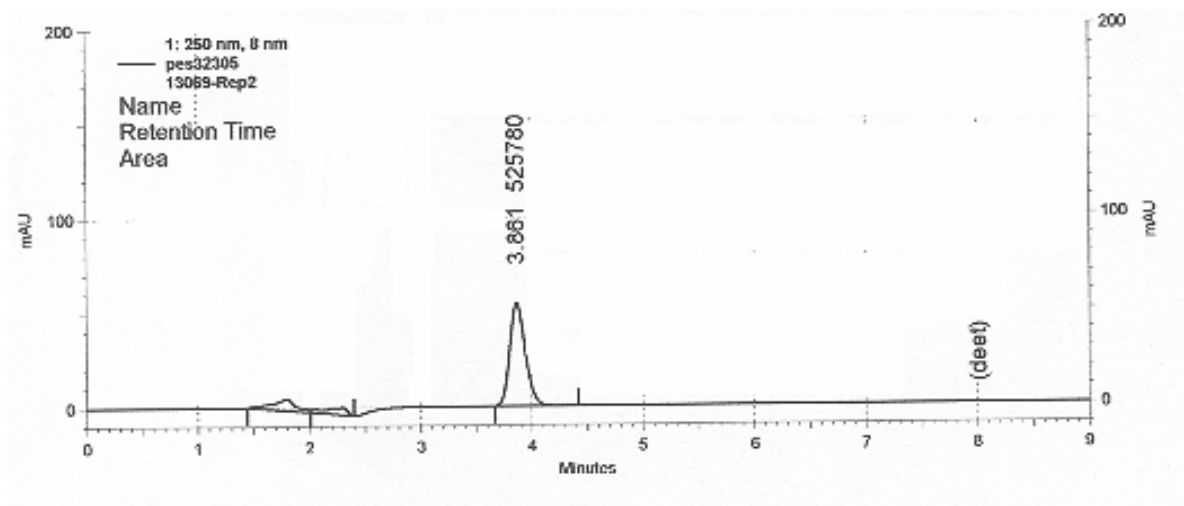
5.5.1 Especificidade

O estudo da influência dos excipientes foi verificado através da aplicação do método do placebo contaminado com amostra padrão.

Os cromatogramas obtidos com a análise da matriz sem a adição de DEET (branco), não apresentaram interferentes na região de retenção, nas condições empregadas, como pode ser visto pela comparação entre os cromatogramas FIGURA 29.



Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 μ m
 Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 60:40
 Modo: isocrático
 Vazão: 1 mL/min
 Detetor: fotodiodos UV/VIS, $\lambda = 250$ nm



Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 μ m
 Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 60:40
 Modo: isocrático
 Vazão: 1 mL/min
 Detetor: fotodiodos UV/VIS, $\lambda = 250$ nm

FIGURA 29 – Comparação entre os cromatogramas do gel com lipossoma contendo DEET na concentração 400 μ g/mL e gel com lipossoma sem DEET.

Os cromatogramas do placebo, não apresentam nenhum pico durante os 9 minutos da corrida cromatográfica, logo podemos concluir que não há interferência no método dos excipientes da preparação sendo o método específico.

5.5.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da curva de calibração com padrão de referência USP, na qual foi verificada a proporcionalidade entre as diferentes concentrações do padrão e as áreas obtidas nos cromatogramas (TABELA 16).

TABELA 16: Dados da regressão linear das curvas de calibração do DEET $y = ax + b$

Analise	Coefficiente angular (inclinação) – (a)	Coefficiente linear (intercepto) – (b)	Coefficiente de correlação (r)	Coefficiente de determinação (R^2)
Curva padrão 1	9632,6	- 154059	0,998	0,996
Curva padrão 2	9589,7	- 185400	0,996	0,992
Curva padrão 3	8811,7	+ 158807	0,998	0,996

O coeficiente de correlação foi de 0,99, demonstrando que a solução padrão de DEET apresentou boa correlação linear. Esta correlação foi verificada na faixa de concentração de 320 a 480 $\mu\text{g/mL}$ de DEET.

5.5.3 Precisão

A avaliação da precisão consistiu em verificar se o método reproduz o mesmo resultado, sempre que o procedimento é executado. Foi verificada através da repetibilidade (precisão intracorrída) em que foram realizadas 6 determinações a 100 % da concentração do teste (TABELA 17).

TABELA 17: Precisão intracorrída para determinação de DEET na formulação gel com lipossoma 252 mM

Formula 4 (g)	Concentração teórica	Concentração encontrada	Recuperação %
1,0169	325,40	361,38	111
1,0079	322,50	367,24	113
1,0214	326,80	362,07	110
1,0208	326,60	368,43	114
1,0073	322,30	366,58	113
1,0152	324,80	349,24	107

Concentração média = $362,49 \pm 9,3374$

Desvio padrão = $\pm 9,3374$

Desvio padrão relativo = 2,57 %

Intervalo de confiança = $362,49 \pm 17,30$

Como pode ser verificado na TABELA 17, de acordo com a proximidade dos resultados obtidos na série de seis determinações, o método se mostrou preciso. Avaliou-se somente a precisão intra-corrída, verificando-se a concordância entre os resultados dentro de um período curto de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação (RE nº 899).

Deixou-se de analisar a precisão intermediária e a reprodutibilidade do método.

A precisão do método foi expressa com o desvio padrão relativo, cujo valor máximo aceitável pela RE nº 899 é de 5%.

5.5.4 Exatidão

A exatidão do método pode ser definida como a proximidade dos resultados experimentais obtidos com os valores declarados. A exatidão do método foi verificada através do teste de recuperação das amostras acrescentadas de quantidade conhecida de DEET seguida da determinação de nove replicatas contemplando as concentrações de 80 a 120 % do valor teórico.

$$\text{EXATIDÃO} = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \times 100\%$$

Para o teste de recuperação (R%), foram feitas 3 pesadas nas concentrações 80, 100 e 120 % do teor de DEET (TABELAS 18, 19 e 20).

TABELA 18: Teste da recuperação do método para determinação de DEET na formulação gel com lipossoma 252 mM (80%)

Nível	Concentração teórica (µg/mL)	Média (µ)	Concentração encontrada (µg/mL)	Média (x)	DP	R%	t, α = 0,05 gl = 2
	312,0		333,4			106	
80%	323,0	324,0	362,6	351,5	15,80	112	2,458
	337,0		358,5			106	

Teste t (0,05; 2)

$H_0 \rightarrow \mu = x = 324,0$ Para $n = 3$, $x = 351,5$ DP = 15,80

t crítico = 4,303

t 0,05; 2 = 2,458

TABELA 19: Teste da recuperação do método para determinação de DEET na formulação gel com lipossoma 252 mM (100%)

Nível	Concentração teórica (µg/mL)	Média	Concentração encontrada (µg/mL)	Média	DP	R%	$t, \alpha = 0,05$ gl = 2
	390,0		418,0			107	
100%	404,0	405,3	430,9	434,5	18,61	106	2,21
	422,0		454,7			107	

Teste t (0,05; 2)

$H_0 \rightarrow \mu = x = 405,3$ Para $n = 3$, $x = 434,5$ DP = 18,61

t crítico = 4,303

t 0,05; 2 = 2,21

TABELA 20: Teste da recuperação do método para determinação de DEET na formulação gel com lipossoma 252 mM (120%)

Nível	Concentração teórica (µg/mL)	Média	Concentração encontrada (µg/mL)	Média	DP	R%	$t, \alpha = 0,05$ gl = 2
	468,0		453,7			98	
120 %	485,0	486,3	499,7	480,4	23,89	103	0,35
	506,0		487,9			98	

Teste t (0,05; 2)

$H_0 \rightarrow \mu = x = 486,3$ Para $n = 3$, $x = 480,4$ DP = 23,89

t crítico = 4,303

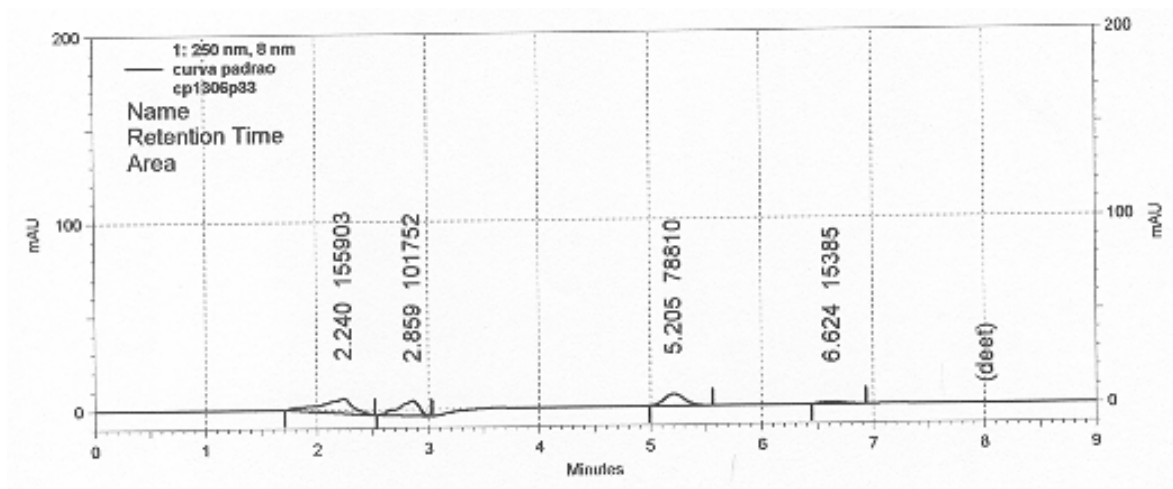
t 0,05; 2 = 0,35

Nos três níveis de concentração, t experimental < t crítico $\rightarrow H_0$ é aceita, ou seja, não existe evidência de erro sistemático no método e as médias encontradas são estatisticamente iguais.

5.5.5 Parâmetros de resistência e robustez

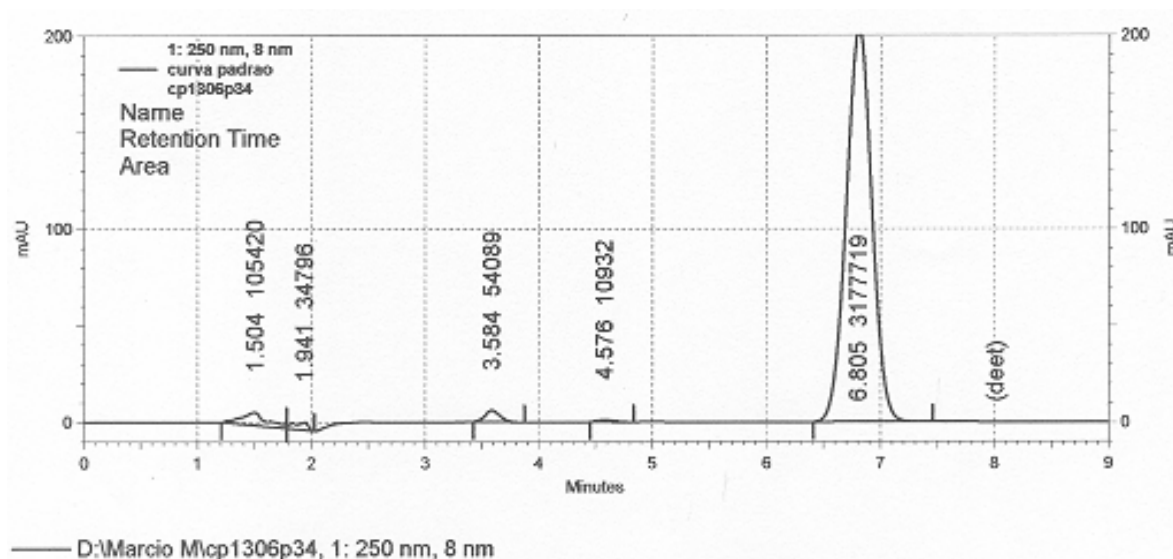
5.5.5.1 Teste de vazão

Para o teste de vazão foram feitas 2 corridas cromatográfica modificando-se a vazão para 0,8 mL/min e 1,2 mL/min, respectivamente as FIGURAS 30 e 31.



Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 µm
 Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 60:40
 Modo: isocrático
 Vazão: 0,8 mL/min
 Detetor: fotodiodos UV/VIS, λ = 250 nm

FIGURA 30 – Cromatograma do DEET padrão (400 µg/mL), vazão de 0,8 mL/min

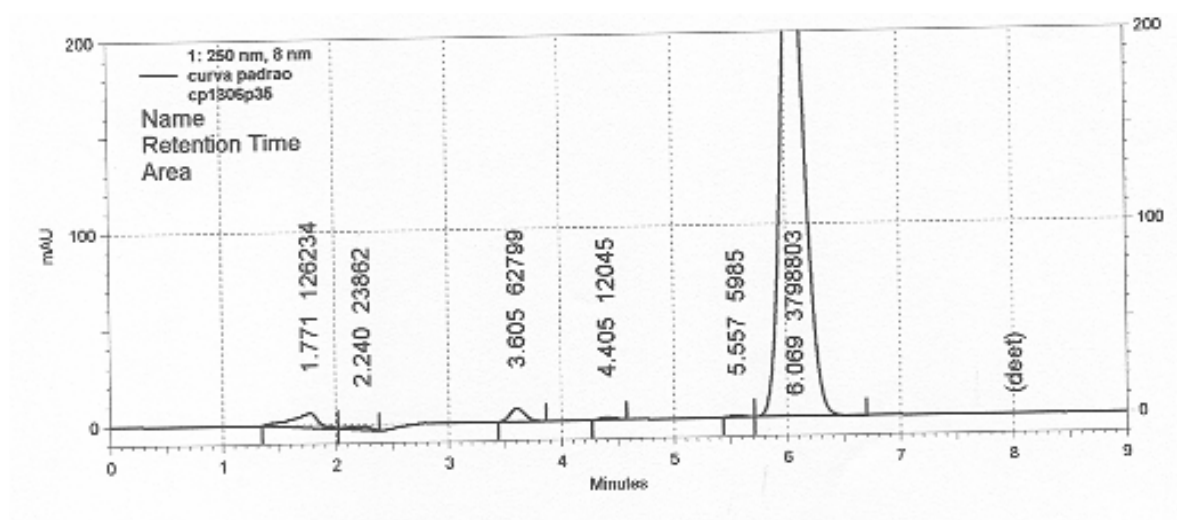


Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 µm
 Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 60:40
 Modo: isocrático
 Vazão: 1,2 mL/min
 Detetor: fotodiodos UV/VIS, λ = 250 nm

FIGURA 31 – Cromatograma do DEET padrão na concentração = 320 µg/mL

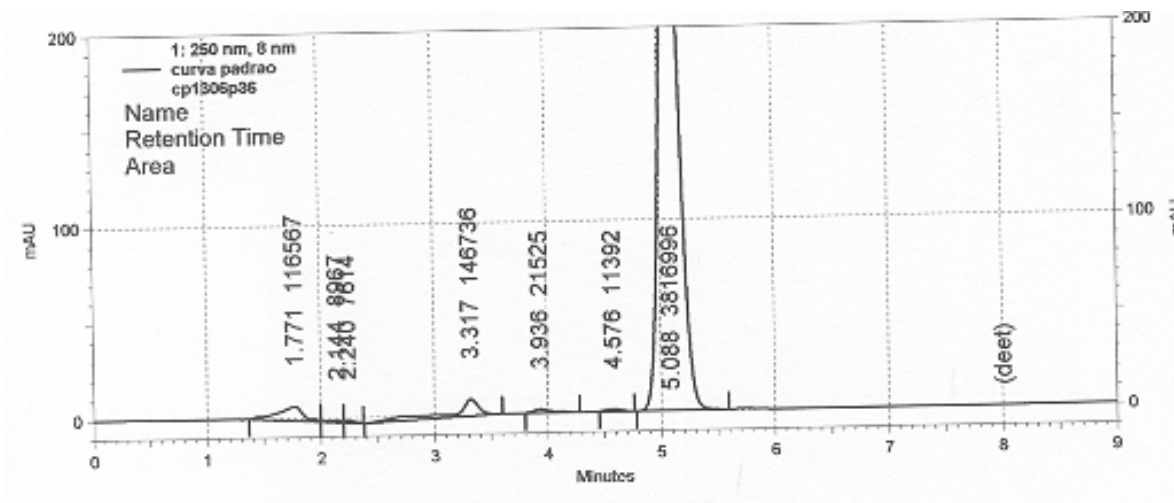
5.5.5.1 Teste de variação da composição da fase móvel

Apesar da diminuição do tempo de retenção de 10 minutos para 8 minutos com a modificação das quantidades de acetato de amônio e acetonitrila, testou-se, também, a mudança nas proporções dos solventes passando-se de 60:40 para 55:45 e 50:50 (v/v), ocorrendo diminuição dos tempos de retenção para 6 minutos e 5 minutos, respectivamente (FIGURAS 32 e 33).



Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 µm
Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 55:45
Modo: isocrático
Vazão: 1 mL/min
Detetor: fotodiodos UV/VIS, $\lambda = 250$ nm

FIGURA 32 – Cromatograma do DEET padrão na concentração 400 µg/mL.

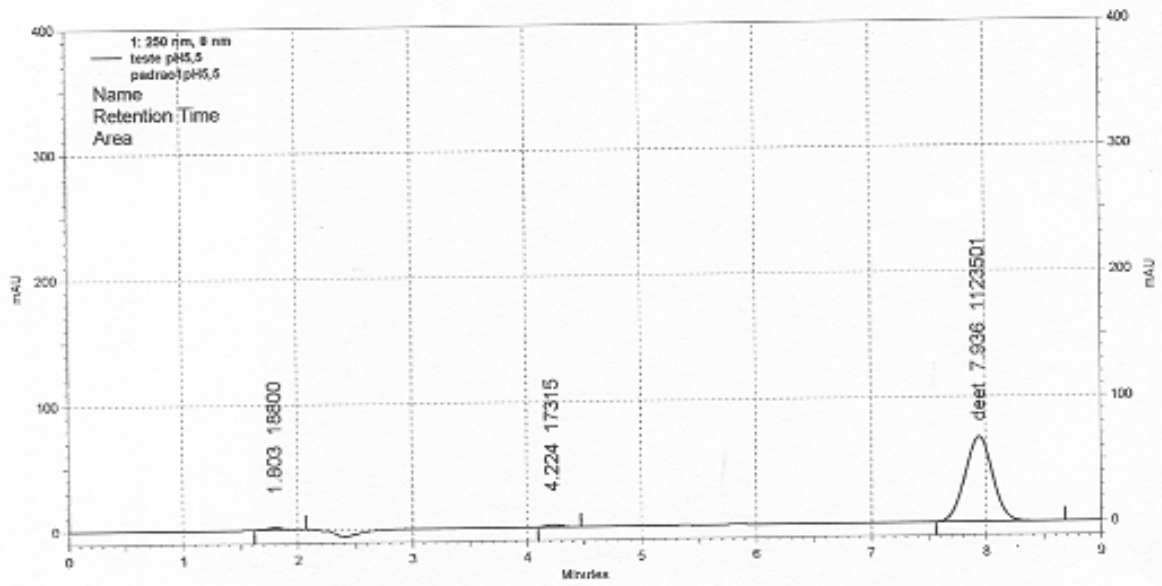


Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 µm
 Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 4,5) e acetonitrila 50:50
 Modo: isocrático
 Vazão: 1 mL/min
 Detetor: fotodiodos UV/VIS, $\lambda = 250$ nm

FIGURA 33 – Cromatograma do DEET padrão na concentração 400 µg/mL

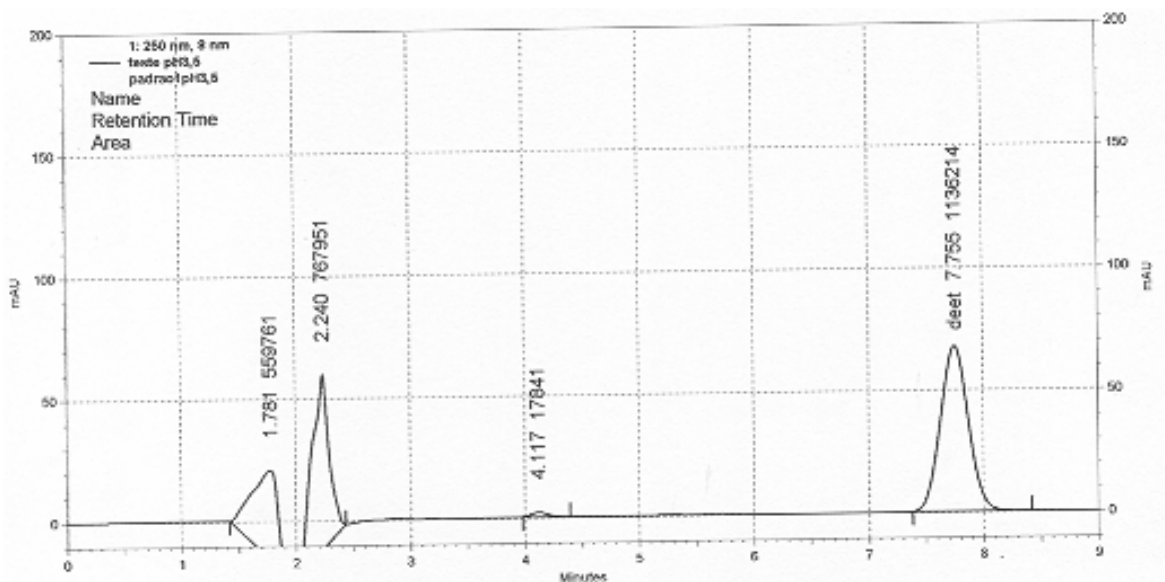
5.5.5.1 Teste da modificação de pH da fase móvel

Mesmo não tendo o valor de pKa do DEET, o que poderia prever o comportamento do analito em condições extremas de pH, foi tentada a mudança da força iônica para verificar os parâmetros de robustez, modificando o pH em $\pm 1,0$, ou seja 5,5 e 3,5, não tendo sido notado nenhuma modificação no tempo de retenção da solução padrão de DEET, obtendo-se os tempos de retenção de 7,93 minutos e 7,75 minutos, respectivamente (FIGURAS 34 e 35). Para o tempo de retenção da solução padrão no pH 4,5 que foi de 8,0 minutos, a variação é muito pequena com a mudança de pH.



Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 µm
 Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 5,5) e acetonitrila 60:40
 Modo: isocrático
 Vazão: 1 mL/min
 Detector: fotodiodos UV/VIS, λ = 250 nm

FIGURA 34 – Cromatograma do gel com lipossoma e DEET na concentração 320 µg/mL
 Fase móvel com pH = 5,5



Coluna: Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm) partículas de 5 µm
 Fase móvel: Tampão acetato de amônio 0,03 M (pH 3,5) e acetonitrila 60:40
 Modo: isocrático
 Vazão: 1 mL/min
 Detector: fotodiodos UV/VIS, λ = 250 nm

FIGURA 35 – Cromatograma do gel com lipossoma e DEET na concentração 320 µg/mL
 Fase móvel com pH = 3,5

TABELA 21: Teste de robustez do método por CLAE – Tempo de retenção (Tr)

Parâmetro	Tempo de retenção (Tr)	
Vazão (mL/min)	0,8	Tr > 9 minutos
	1,0	Tr = 8 minutos
	1,2	Tr = 7 minutos
Fase móvel (acetato de amônio: acetonitrila)	60:40	Tr = 8 minutos
	55:45	Tr = 6 minutos
	50:50	Tr = 5 minutos
Força iônica (pH) da fase móvel	3,5	Tr = 7,9 minutos
	4,5	Tr = 8 minutos
	5,5	Tr = 7,7 minutos

Os dados de performance do método diante de pequenas alterações nos parâmetros estão consolidados na TABELA 21. Os tempos de retenção para o DEET padrão e nas formulações sofreram algumas alterações como já era previsto. Houve uma diminuição do Tr com o aumento da vazão, devido às interações entre o DEET e a coluna que possui caráter apolar em relação a fase móvel. Com o aumento da vazão ocorre uma interação menor entre o analita de característica lipofílicas e a fase estacionária.

Quando houve o aumento da concentração de acetonitrila na composição da fase móvel houve uma diminuição das interações do analita de natureza apolar com a fase estacionária, ocorrendo uma diminuição do Tr do mesmo.

Com a modificação na força iônica de $\pm 1,0$ não foi verificada uma alteração bem pronunciada do Tr do DEET. Não foi verificado em nossos testes a modificação mais brusca do pH da fase móvel por causa da possibilidade de se aproximar do pH crítico para colunas de sílica, ou seja em torno de $\text{pH} = 2,0$ correndo-se o risco de danificar a coluna.

5.6 Determinação do tamanho médio dos lipossomas com DEET

Foram produzidos lipossomas multilamelares pelos dois métodos usando as matérias-primas Phospholipon® e Phosal® nas concentrações 42 mM PC : 8,4 mM DEET e os tamanhos médios foram determinados pelas análises por espalhamento da luz laser nas diluições 1:1000 em tampão TRIS pH = 6,8. Os resultados constam das TABELAS 22 e 23.

TABELA 22: Resultado da determinação do tamanho médio dos lipossomas manipulados com Phospholipon® por espectroscopia de espalhamento da luz laser.

LIPOSSOMA 42 mM PC : 8,4 DEET Phospholipon®	Kcps	Tamanho por número (nm)	Polidispersão
Amostra 1	271,0	294,6 ± 0,491	0,491
Amostra 2	272,0	279,8 ± 0,640	0,640
Amostra 3	274,0	289,9 ± 0,447	0,447

TABELA 23: Resultado da determinação do tamanho médio dos lipossomas manipulados com Phosal® por espectroscopia de espalhamento da luz laser.

LIPOSSOMA 42 mM PC : 8,4 DEET Phosal®	Kcps	Tamanho por número (nm)	Polidispersão
Amostra 1	261,1	253,0 ± 0,220	0,220
Amostra 2	260,8	260,8 ± 0,180	0,180
Amostra 3	258,1	252,8 ± 0,191	0,191

Os valores médios das vesículas dos lipossomas para o método do pré-lipossoma encontrados foram $255,5 \pm 0,197$ (FIGURA 36), tendo também apresentado valores de polidispersão menor.

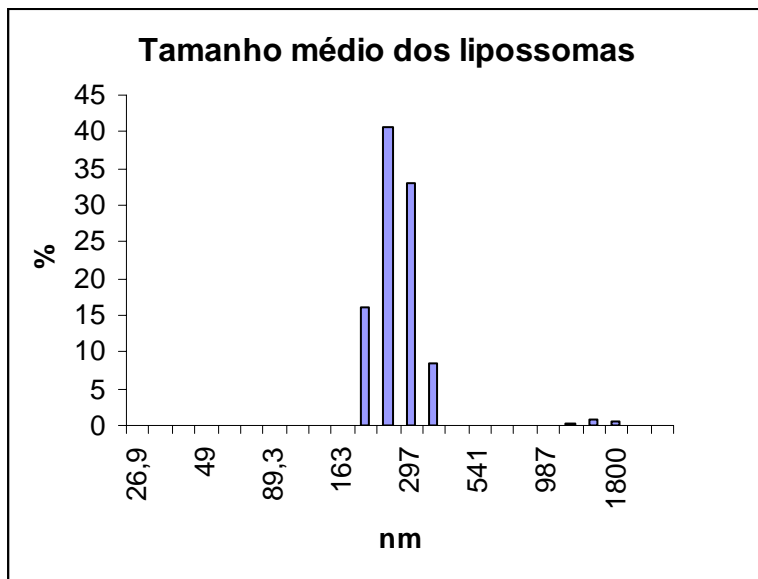


FIGURA 36 – Gráfico de distribuição de tamanho do lipossoma preparado pelo Método do pré-lipossoma (42 mM: 8,4 mM DEET), filtrado em coluna de Sephadex®.

Os valores médios das vesículas dos lipossomas para o método da hidratação do filme lipídico encontrados foram $288,1 \pm 0,526$ (FIGURA 37).

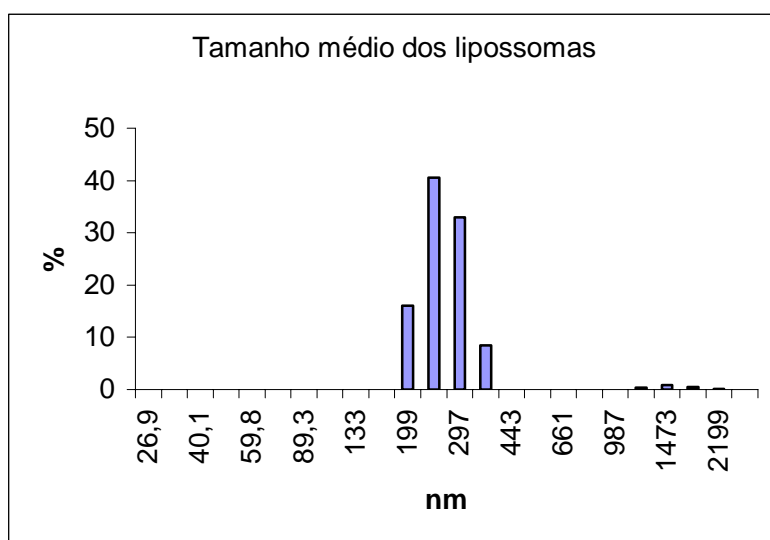


FIGURA 37 – Gráfico de distribuição de tamanho do lipossoma preparado pelo Método da hidratação do filme lipídico (42 mM: 8,4 mM DEET), filtrado em coluna de Sephadex®.

Os valores de K_{cps} estão compreendidos entre os valores 50 – 350, o que significa que a diluição usada para as amostras foi adequada, isto é, permitiu que o feixe da luz laser percorresse todo o caminho das amostras para a contagem das vesículas em suspensão.

5.7 Visualização dos lipossomas por Microscopia eletrônica de transmissão

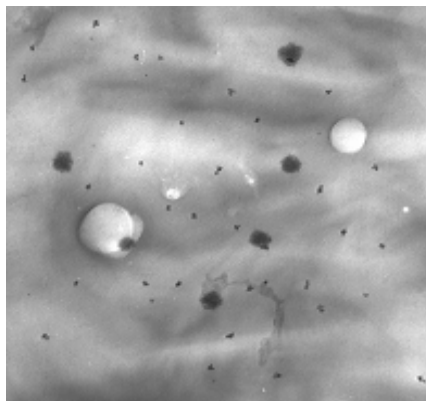


FIGURA 38 – Fotomicrografia eletrônica dos lipossomas preparados com Phosal preparado pelo método da gota (aumento de 50 mil vezes).

5.8 Determinação da eficácia da preparação gel com lipossoma contendo DEET

Determinou-se a atividade de repelência da preparação em relação aos mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, avaliando-se o efeito no comportamento dos mosquitos. Em todos os experimentos foi utilizada a proporção de $6,25 \text{ mg/cm}^2$ das preparações. Comparou-se o gel contendo lipossoma com DEET produzido com Phosal® (FÓRMULA 4) com produto comercial do Laboratório Químico Farmacêutico do Exército (FÓRMULA 2).

Os testes foram realizados em dois dias para cada voluntário, sendo que em um dos dias testou-se a preparação da FORMULA 2 e no dia seguinte testou-se a FORMULA 4. O protocolo preenchido em cada visita do voluntário consta do modelo que se segue. Optou-se por padronizar o braço esquerdo com preparação placebo e o braço direito para aplicação do produto contendo DEET.

Nove voluntários submetidos aos testes de nove horas e quatro destes foram submetidos ao teste de doze horas (TABELAS 24, 25 e 26).

TABELA 24: Efeito de de uma formulação de lipossomos contendo DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti* (tempo de 0 a 6 h)

Tempo (horas)	Voluntários								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tempo 0 h									
Gel Carbopol placebo	9/15	20/24	15/20	18/22	18/20	24/24	17/20	20/21	16/19
Gel lipossoma placebo	18/19	11/21	19/19	2/15	6/13	3/18	10/16	21/23	18/21
Gel + DEET	0/21	0/18	0/22	0/16	0/21	0/24	0/22	0/22	0/27
Gel+lipossoma+DEET	0/28	0/20	0/21	0/19	0/14	0/20	0/22	0/24	0/17
Tempo 3 h									
Gel Carbopol placebo	20/22	13/15	15/15	19/22	22/22	20/21	19/19	-	-
Gel lipossoma placebo	20/20	21/24	17/20	6/18	18/20	19/21	19/20	-	-
Gel + DEET	0/22	0/21	0/20	0/20	0/24	0/25	0/26	-	-
Gel+lipossoma+DEET	0/28	0/23	0/20	0/20	0/22	0/21	0/25	-	-
Tempo 6 h									
Gel Carbopol placebo	16/16	17/17	17/17	24/27	19/19	24/24	21/21	-	-
Gel lipossoma placebo	20/20	22/22	15/15	18/23	17/18	20/20	23/23	-	-
Gel + DEET	0/19	1/19	0/21	0/15	0/23	0/25	0/23	-	-
Gel+lipossoma+DEET	0/23	0/20	0/12	0/19	0/21	0/21	0/24	-	-

Obs: número de fêmeas alimentadas/número de fêmeas expostas

TABELA 25: Efeito de de uma formulação de lipossomos contendo DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti* (tempo de 7 a 9 h)

Tempo (horas)	Voluntários								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tempo 7 h									
Gel placebo	9/10	19/19	18/18	19/19	17/17	-	-	-	-
Gel + lipossoma	11/11	18/18	3/10	15/20	16/16	-	-	-	-
Gel + DEET	0/22	0/13	0/18	1/20	0/25	-	-	-	-
Gel+lipossoma+DEET	0/22	0/20	0/18	0/22	0/21	-	-	-	-
Tempo 8 h									
Gel placebo	13/15	15/15	14/15	12/12	21/21	-	-	-	-
Gel + lipossoma	19/19	15/17	-	14/18	13/13	-	-	-	-
Gel + DEET	0/25	0/23	0/19	2/18	0/15	-	-	-	-
Gel+lipossoma+DEET	0/20	0/19	-	0/21	0/25	-	-	-	-
Tempo 9 h									
Gel placebo	20/21	22/22	18/19	7/7	16/16	15/15	18/18	11/11	13/13
Gel + lipossoma	18/18	20/20	18/18	19/19	17/17	17/17	14/15	22/23	19/19
Gel + DEET	0/23	0/20	0/25	4/14	2/18	1/21	0/23	0/23	0/21
Gel+lipossoma+DEET	0/21	0/15	0/14	1/24	2/18	3/21	0/22	0/22	0/21

Obs: número de fêmeas alimentadas/número de fêmeas expostas

TABELA 26: Efeito das formulações contendo DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti* (tempo de 10 a 12 h)

Tempo (horas)	Voluntários								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tempo 10 h									
Gel placebo	-	-	-	-	-	19/20	25/25	15/18	19/23
Gel + lipossoma	-	-	-	-	-	20/20	20/20	17/17	25/26
Gel + DEET						1/23	0/21	1/17	0/24
Gel+lipossoma+DEET						11/21	0/22	0/21	0/21
Tempo 11 h									
Gel placebo	-	-	-	-	-	15/15	15/15	5/13	10/13
Gel + lipossoma	-	-	-	-	-	12/20	23/23	18/19	24/24
Gel + DEET	-	-	-	-	-	5/23	4/22	8/17	0/20
Gel+lipossoma+DEET	-	-	-	-	-	4/20	1/26	0/24	0/21
Tempo 12 h									
Gel placebo	-	-	-	-	-	19/19	19/19	5/9	5/13
Gel + lipossoma	-	-	-	-	-	17/17	18/18	25/25	10/10
Gel + DEET	-	-	-	-	-	13/22	1/21	6/25	0/19
Gel+lipossoma+DEET	-	-	-	-	-	14/21	0/21	0/27	0/20

Obs: número de fêmeas alimentadas/número de fêmeas expostas

Foram feitas análises estatísticas pareadas, não paramétricas (Wilcoxon signed rank test) para comparação de duas condições entre os voluntários; e de tabela de contingência (qui quadrado) para comparação de duas condições em um mesmo voluntário.

Comparou-se, inicialmente, se existe uma diferença significativa ($\alpha > 0,05$) entre a taxa de fêmeas que não se alimentaram entre o gel de Carbopo®l placebo e o gel de Natrosol® com lipossomas placebo. Aplicou-se o teste de Wilcoxon signed rank test para todos os horários, ou seja, 0 h a 9 h, e verificou-se que a hipótese nula de que os controles apresentaram resultados similares não pôde ser rejeitada (FIGURA 39).

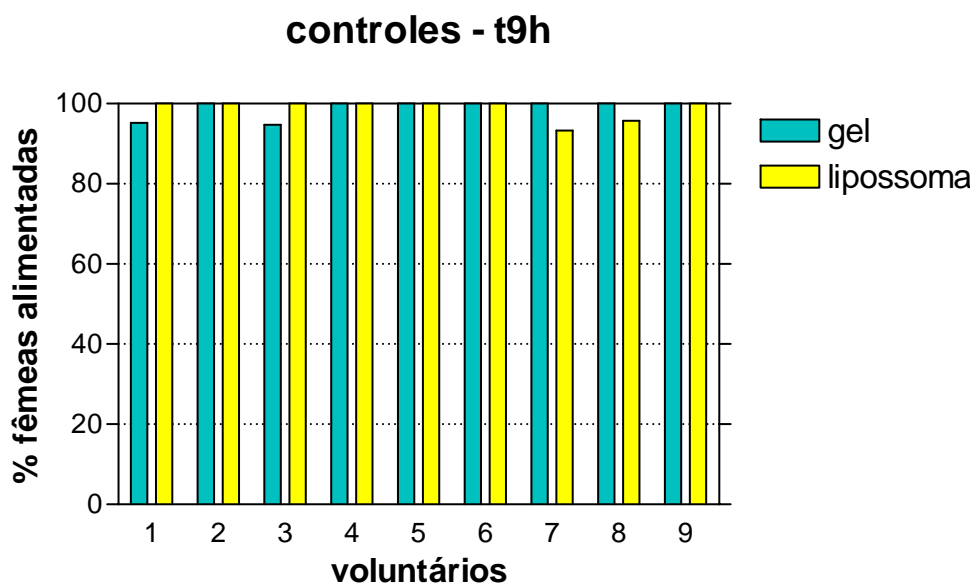


FIGURA 39 – Gráfico representativo do efeito das formulações placebo aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti* (tempo = 9 h)

A segunda comparação realizada foi a da existência ou não de diferença significativa ($P > 0,05$) entre a taxa de fêmeas de *Aedes aegypti* que se alimentaram, expostas ao gel de Carbopol® com DEET e gel de Natrosol® com lipossomas e DEET.

Para análise destes dados houve a necessidade de se fazer uma normalização com o controle (placebo), através da taxa de Abbott (ABBOTT, 1925).

$$\% \text{ REPELÊNCIA} = 100 - \frac{(\text{número de picadas na área tratada com o DEET})}{(\text{número de picada na área não tratada})} \times 100$$

O que significa que, se alguma fêmea de *Aedes aegypti* deixou de se alimentar naquela hora no placebo, este número deve ser descontado da condição experimental. Diante dos “dados normalizados” o Teste de Wilcoxon pôde ser aplicado para cada hora de teste. O observado foi que com os dados obtidos nos testes não ocorreu diferença significativa, nos horários compreendidos entre 0h e 6 h. Já nos horários de 7 h, 8h e 9 h que à princípio nos daria uma definição da melhor formulação com relação ao prolongamento do tempo de proteção, ocorreu uma pequena diferença que não foi significativa para ser considerada ($P>0,05$).

Os gráficos representativos dos testes nos tempos 10, 11 e 12 h encontram-se na figura 43.

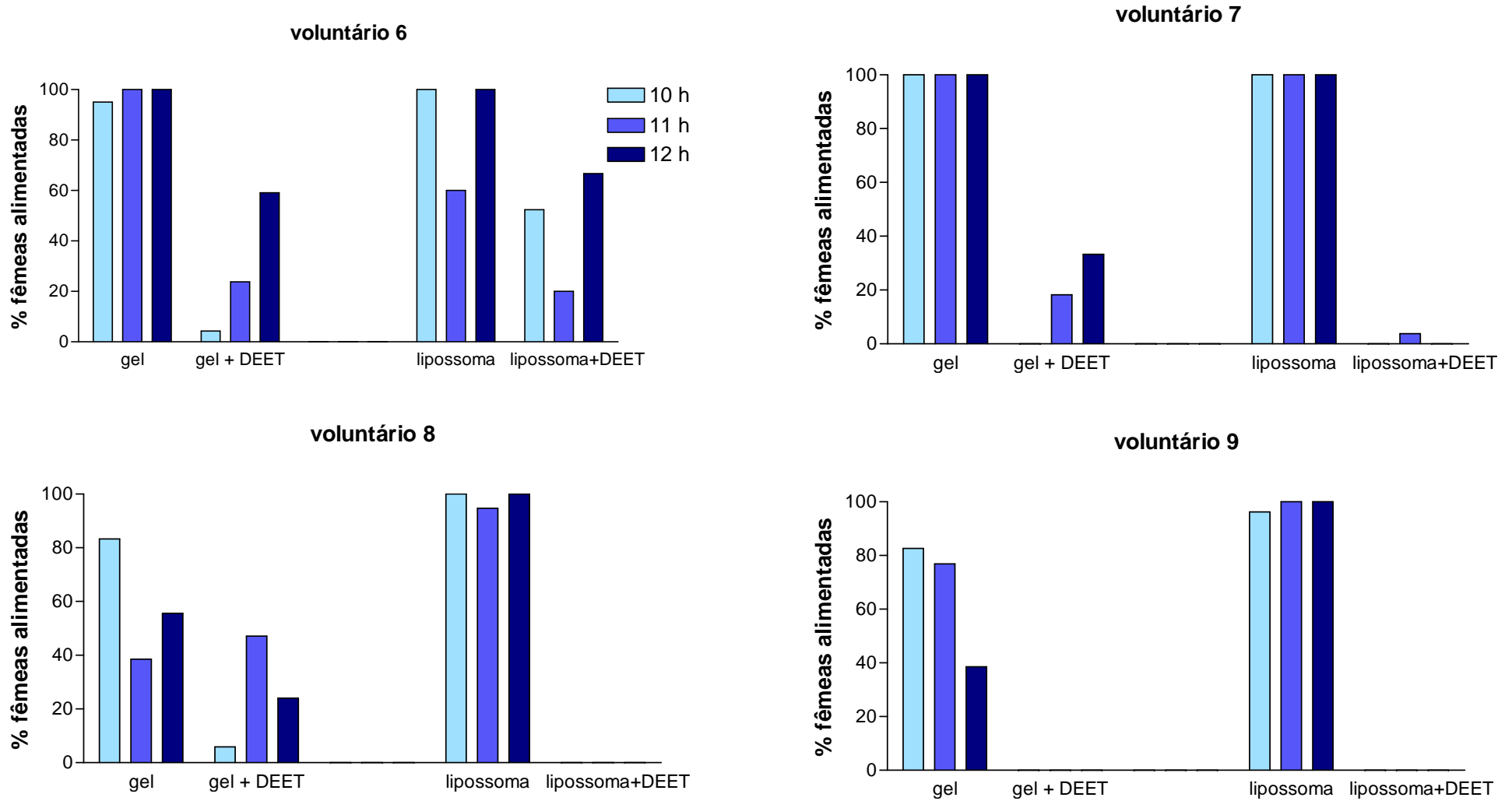


FIGURA 40 – Efeito de repelência nos voluntários submetidos ao teste nos tempos t = 10, 11 e 12 h.

Procedeu-se a análise estatística pelo teste do chi-quadrado dos 4 voluntários um a um nos tempos de 10, 11 e 12 h, para verificar se houve diferença significativa entre as duas condições, ou seja, a preparação placebo e a preparação contendo o DEET (gel e gel com lipossoma). Os resultados estão consolidados na TABELA 27.

TABELA 27: Comparação do número de fêmeas alimentadas nas duas condições experimentais. Valores de P (bicaudal, gl = 1)

Voluntários	Tempo (horas)		
	10	11	12
6	0,0004	0,7683	0,6074
7	NR	0,1052	0,0038
8	0,26	0,0003	0,0068
9	NR	NR	NR

Obs: NR = não foi possível aplicar o teste, uma vez que há valores iguais a zero.

Como se verificou (TABELA 27), valores de P acima de 0,05 significam que não se pode rejeitar a hipótese de que o número de fêmeas que se alimentaram nas duas condições seja igual. No caso do voluntário 6, não houve diferença significativa em um teste nos tempos de 11 e 12 horas, porém no tempo de 10 horas já houve. Isto pode ser explicado pelo fato de ter sido o único dos voluntários testados que teve uma resposta diferente dos demais, provavelmente devido as condições pessoais, visto que no dia do teste apresentou uma sudorese excessiva, podendo ter introduzido um erro do tipo aleatório. Em estudos realizados por Davis & Sokolove (1976), uma das formas de atrair os mosquitos é através da eliminação do ácido lático pelo suor humano, e a esta atração vai ser mais intensa quanto maior for a eliminação desta substância (DAVIS & SOKOLOVE, 1976).

Analisando o resultado do voluntário 7, não houve diferença significativa para os tempos 10 e 11 horas. No tempo de 12 horas ocorre uma diferença significativa para os voluntários 7 e 8. A análise pode ser melhor entendida através das FIGURAS 41, 42 e 43.

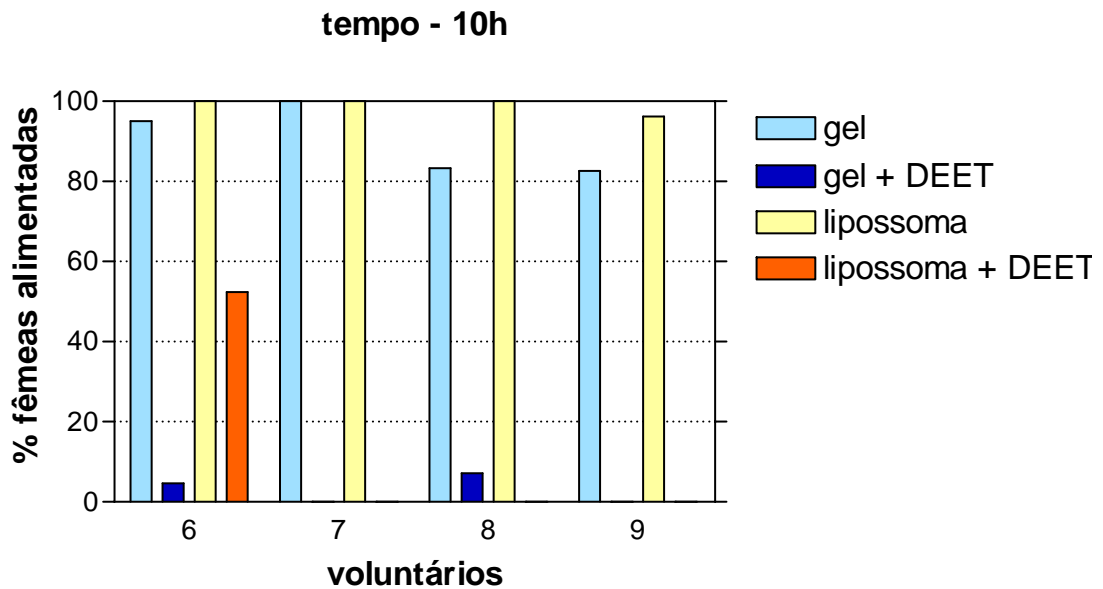


FIGURA 41 – Gráfico representativo do efeito das formulações aplicadas em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti*, t = 10 h

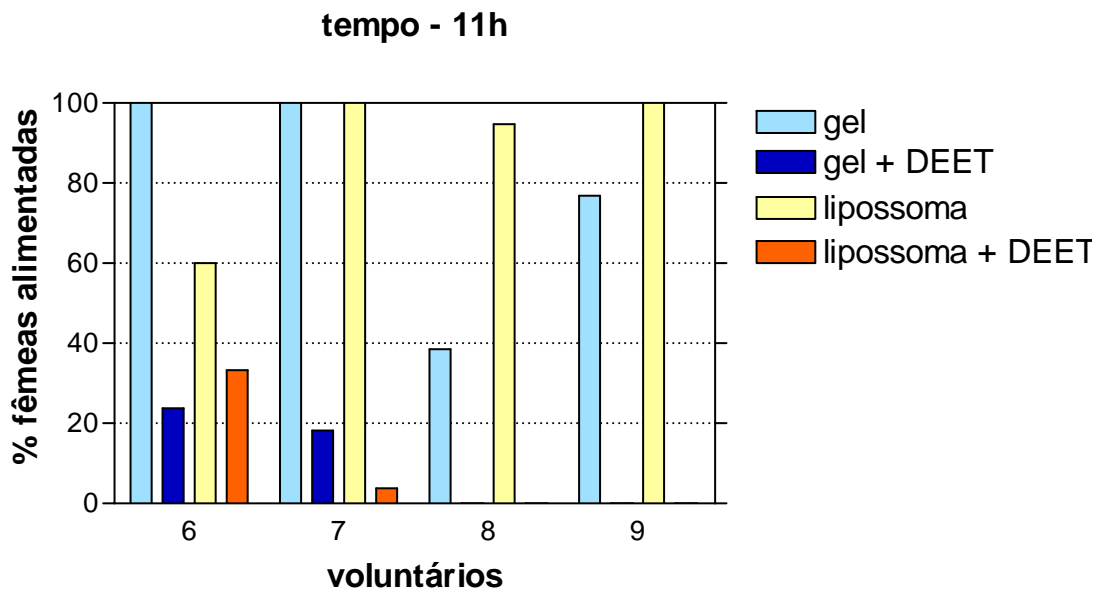


FIGURA 42 – Gráfico representativo do efeito das formulações aplicadas em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti*, t = 11 h

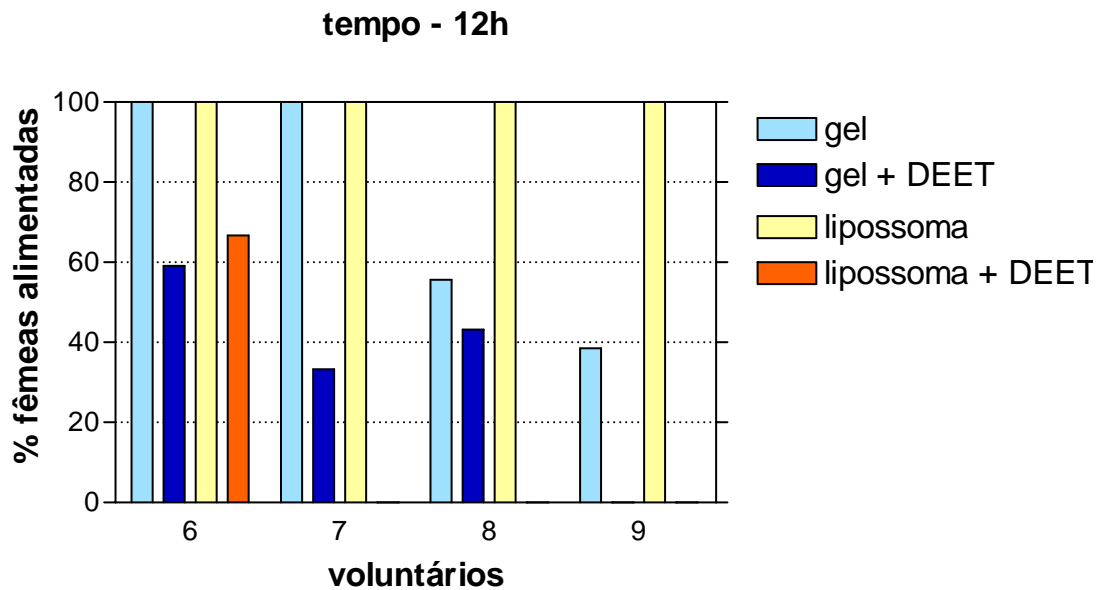


FIGURA 43 – Gráfico representativo do efeito das formulações aplicadas em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti* t = 12 h

Como pode ser observado a proteção dada pela preparação lipossoma com DEET à princípio parece possuir uma eficácia melhor do que a preparação gel com DEET, o que haveria de ser esperado, pois a preparação lipossoma tende a ter sua ação prolongada.

Em um estudo realizado em campo por Frances (2002), foram comparadas formulações nanocapsulares a base de polímeros, contendo repelente de insetos, em voluntários militares do Exército americano. Neste estudo foi avaliada a persistência da preparação no período noturno e diurno sendo evidenciado um tempo de proteção da ordem de 7 horas no máximo e as concentrações empregadas variaram entre 33% e 35% do repelente.(FRANCES, 2002).

Esta comparação fica mais bem representada pelas FIGURAS 44 e 45, respectivamente, gel de Carbopol® com DEET e gel de Natrosol® contendo lipossomas com DEET.

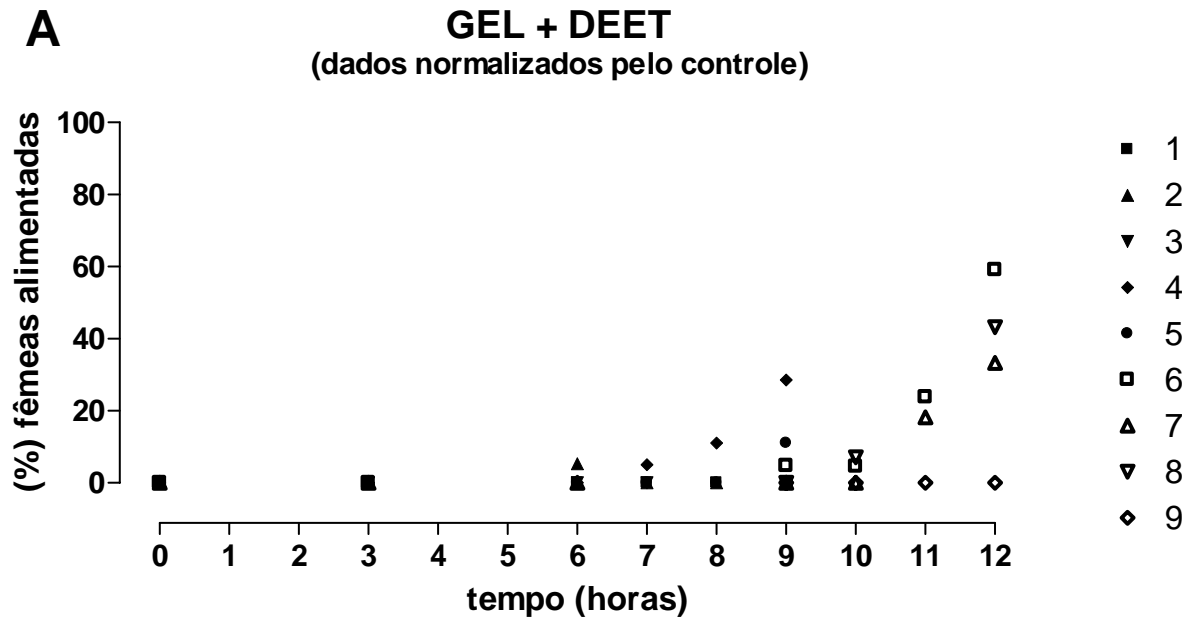


FIGURA 44 – Cinética de repelência da formulação Gel de Carbopol® com DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti*.

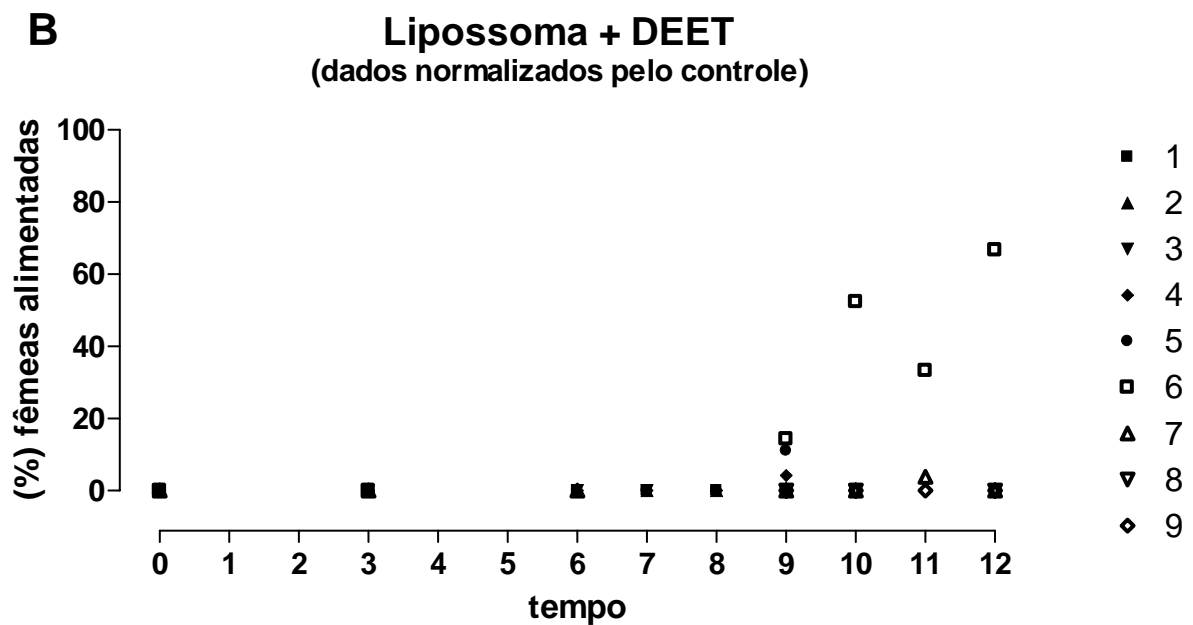


FIGURA 45 – Cinética de repelência da formulação Gel de Natrosol® contendo lipossoma com DEET aplicada em voluntários humanos sobre a repelência de fêmeas de *Aedes aegypti*.

Vários fatores individuais e ambientais estão envolvidos quanto ao risco de picadas de insetos, dentre eles podemos citar: eliminação de substâncias atrativas (gás carbônico, ácido láctico e amônia), população de mosquitos e estado alimentar dos mesmos, umidade e temperatura ambientais. Tais fatores podem determinar pequenas variações conforme foi observado nos testes com voluntários.

A metodologia empregada para testar a eficácia em laboratório favorece o controle de variáveis que podem confundir a interpretação no teste em campo, tais como: temperatura, velocidade do vento, umidade, população de mosquitos, nível de alimentação dos mosquitos, espécies avaliadas, entre outras. O período de proteção das duas preparações é consistente com os trabalhos previamente publicados (CHOU, 1997).

Observou-se que o voluntário 6 não teve a mesma proteção que os demais voluntários no teste de 12 horas, pode-se atribuir este efeito às condições fisiológicas, visto que o teste foi aplicado nas mesmas condições que o voluntário 7, ou seja, mesma população de mosquitos, mesmo dia, mesma formulação para os voluntários. Vale lembrar que os voluntários 6 e 7 submeteram-se ao teste em dupla, o mesmo ocorrendo com os voluntários 8 e 9.

Com relação ao observado com o teste no voluntário 8, verificou-se que a preparação gel contendo DEET no tempo de 11 horas proporcionou uma proteção menor, do que os tempos 10 e 12. Este efeito pode ser atribuído, também, às condições fisiológicas do voluntário 8, visto que no voluntário 9, ocorreu uma proteção de 100%, ou seja no teste normalizado nenhuma fêmea se alimentou.

Analisando-se os resultados obtidos com a preparação gel com lipossoma contendo DEET, o que se verifica é que a proteção oferecida é superior à preparação gel contendo DEET, pois com exceção do voluntário 6 que poderia ser descartado estatisticamente se fosse aplicado o teste qui-quadrado, procedimento este não adotado devido ao número de voluntários testados.

Os testes realizados nos apontam que, a preparação gel de Natrosol® com lipossoma contendo DEET, no período de 0 a 12 horas se mostrou eficiente.

Analisando-se as preparações no aspecto de biocompatibilidade, verificou-se na literatura consultada, que os excipientes usados na FORMULA 4 (gel de Natrosol® com lipossomas) são mais biocompatíveis que os excipientes da FORMULA 1 (gel de Carbopol® com silicone). A vantagem das preparações lipossomas de aplicação tópica é a sua semelhança às membranas biológicas e a sua composição química muito próxima à da epiderme, o que os torna melhores veículos quando comparados a outros. Os lipossomas são biodegradáveis e isentos de toxicidade (EGBARIA & WEINER, 1990).

Analisando-se as preparações no aspecto de cedência, verificou-se que preparações em gel não favorecem a absorção, entretanto a adição do silicone na FORMULA 2, tem por objetivo a proteção da área aplicada no tocante a hidrofiliabilidade, provocando o efeito de oclusão (ANSEL, 1999), o que favoreceria a absorção do DEET.

Já na FORMULA 4, a literatura consultada preconiza que os lipossomas multilamelares interagem com os corneócitos, retendo o princípio ativo no estrato córneo. Os estudos realizados por Korting e colaboradores (1994), em que foram empregados lipossomas oligolamelares em contato com cultura de corneócitos, evidenciaram que os lipossomas não penetram na pele intacta. Nacht (1995), provou através de experimentos que o lipossoma adere aos corneócitos e libera a substância encapsulada por difusão ou por fusão da parede do lipossoma com os lipídios do estrato córneo (KORTING et al, 1994; NACHT, 1995).

De acordo com os estudos de Salafsky e colaboradores (2000), os lipossomas com tamanhos da ordem de 250 – 350 nm, à semelhança dos que foram manipulados para serem usados nos testes de repelência ficam retidos nas camadas superficiais do estrato córneo ocorrendo um mínimo de absorção sistêmica (SALAFSKY, 2000).

Com relação à população de mosquitos estudada nos experimentos, ou seja, média de 20 mosquitos por cada hora de testes, representa uma situação superior à verificada em testes de campo, o que fala a favor da validação dos experimentos.

Comparando-se as fórmulas 2 e 4, percebe-se que o comportamento das fêmeas de *Aedes aegypti* se mostrou idêntico até o tempo de 9 horas, ou seja, as duas formulações repeliram, como é citado na literatura em estudo comparativo realizado por Domb e colaboradores (1995), em que foram testadas várias formulações (DOMB, 1995).

O que foi observado com tempo superior a 9 horas, ou seja, 10, 11 e 12 horas, é que a formulação contendo lipossomas, quando analisada separadamente, demonstra um discreto prolongamento da ação repelente como era previsto inicialmente.

Com os dados obtidos nos testes comparativos das duas formulações nos voluntários 6, 7, 8 e 9, que foram submetidos aos testes de até doze horas, não reunimos informações suficientes para afirmar que a preparação gel de Natrosol® com lipossoma contendo DEET é mais persistente do que a formulação gel de Carbopol® contendo DEET, face ao comportamento das fêmeas de *Aedes aegypti* diante das preparações placebo de gel de Carbopol®. Como podemos observar na FIGURA 40, ocorreu uma inibição do ato de picar nos voluntários 8 e 9 impedindo-nos de fazer uma análise comparativa mais precisa.

Com relação ao número de testes realizados, foi planejado estudar um número mínimo de voluntários para se ter a idéia do comportamento das preparações, sendo que há a necessidade de se aumentar o número de testes para se ter uma margem de segurança maior para atestar qual das duas preparações é a mais eficaz.

6 CONCLUSÕES

A melhor metodologia para a preparação de lipossoma incorporando o DEET nas proporções 42 mM de PC e 8,4 mM de DEET (20% em relação a PC) foi a do pré-lipossoma.

A metodologia de análise do DEET durante o processo de inclusão por espectrofotometria UV/VIS se mostrou adequada e de fácil aplicação.

A metodologia de análise do DEET na formulação gel de Natrosol® com lipossomas contendo DEET se mostrou adequada, específica, linear, precisa e exata.

Foi verificado que a preparação FÓRMULA 4, gel de Natrosol® com lipossoma 252 mM contendo DEET a 20% mostrou atividade repelente em testes de eficácia com mosquitos *Aedes aegypti* ce Rockfeller no período de 12 horas.

O DEET em lipossoma mostrou prolongamento da ação repelente em teste comparativo com uma formulação comercial.

7 PERSPECTIVAS

Será dada continuidade ao trabalho de pesquisa procurando seguir as seguintes etapas:

- Analisar os parâmetros de “otimização” do método de análise do DEET na preparação com vistas a uma possível validação da metodologia analítica por CLAE.
- Realizar estudos de biodisponibilidade *in vitro* para esclarecer o processo de absorção reduzida do princípio-ativo veiculado em lipossomas.
- Verificar se a toxicidade e a permeação diminuem com o uso do lipossoma na formulação
- Realizar os testes de eficácia com um número maior de voluntários para esclarecer o estudo comparativo entre as duas formulações testadas.
- Verificar se a preparação com concentrações menores de DEET têm a mesma ação repelente nos testes *in vivo* com voluntários.

8 REFERÊNCIAS

1. ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, v. 18, p. 265-267, 1925.
2. ABU-QARE, A. W.; ABOU-DONIA, M. B. Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (n,n-diethyl-m-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed Anal.*, v. 26, p. 291-299, 2001.
3. ACKERS, G. K. A new calibration procedure for gel filtration columns. *J. Biol. Chem.*, v. 242, p. 3237-3238, 1967.
4. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução nº 899*, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos. Disponível em: <http://e-legis.brs.br/leis>. Acesso em: 28 de maio 2004.
5. ALBUQUERQUE, M. F. M. et al. Bancroftian filariasis in urban áreas of Recife, Brasil: the role of individual risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 37, p. 225-233, 1995.
6. AMBROSE, A , YOST, D. H. Pharmacological and toxicological studies of DEET. *Toxicol. Appl. Pharmaco.*, v. 77, p. 772-780, 1965.
7. ANSEL, H. C.; ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. p. 548-551.
8. BANGHAM. A. D. ; STANDISH, M. M. ; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, v.13, p. 238-252 , 1965.
9. BARENHOLZ, Y.et al. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry*, v. 16, n. 12, p. 2806-2810, 1977.
10. BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem*, v. 234, p. 466-468, 1959.
11. BAYNES, R. E.; YEATTS, J. L.; RIVIERE, J. E. Analysis of n-n-diethyl-m-toluamide in porcine skin perfusates using solid-phase extraction disks and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. B.*, v. 780, p. 45-52, 2002.
12. BRITISH pharmacopoeia BP (Vet). London: The Stationery Office, 1998. v. 2, p. 109.
13. CASTILE, J. D.; TAYLOR, K. M. G. .Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. *Int. J. Pharm.*, v. 188, p. 87-95, 1999.

14. CHOU, J. T.; ROSSIGNOL, D. A.; AYRES, J. W. Evaluation of commercial insect repellents on human skin against *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) *J. Med. Entomol.*, v. 34, p. 624-630, 1997.
15. CHRISTIE, W. W. *Lipid Analysis*. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1982.
16. CLARKE'S isolation and identification of drugs. 2. ed. London: The Pharmaceutical Press, 1986.
17. DAVIS, E. E.; BOWEN, M. F. Sensory physiological basis for attraction in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 10, p. 316-325, 1994.
18. DAVIS, E. E.; SOKOLOVE, P. G. Lactic acid-sensitive receptor on the antennae of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Comp. Physiol.*, v. 105, p. 43-54, 1976.
19. DOMB, A. J. et al. Insect repellent formulations of N,N-diethyl-m-toluamide (deet) in a liposphere system: efficacy and skin uptake. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 11 p. 29-34, 1995.
20. EGBARIA, K; WEINER, N. Liposomes as a drug delivery system. *Adv. Drug. Del. Syst.*, v.5, p. 287 – 300, 1990.
21. EL-DIN, M. S.; ABERIRJIU, M. A. HPLC and first derivative spectrophotometric determination of permethrin in pharmaceutical formulations. *Acta Pharmaceutica Fennica*, v. 101, p. 111-118, 1992.
22. FORATTINI, O. P. Identificação, biologia, epidemiologia. In: *Culicidologia Médica*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 2002. v. 2.
23. FRADIN, M. S. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. *Ann. Intern. Med.*, v.128, p. 931-940, 1998.
24. FRADIN, M. S.; DAY, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N. Eng. Med.*, v. 347, n. 1, 2002.
25. FRANCES, S. P.; VAN DUNG, N. W.; DEBBOUN. M. Field evaluation of repellent formulations against daytime and nighttime biting mosquitoes in a tropical rainforest in northon Australia. *J. Med. Entomol.*, v. 39, n.3, p. 541-544. 2002.
26. GALERA, M. M. et al. *Chromatogr. A*, p. 727 -739. 1996.
27. GARCIA, S. **Lipossomas com filtro solar**: preparação e controle de qualidade.1998. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1998.
28. GOODYER, L.; BEHRENS, R. H. Short report: the safety and toxicity of insect repellents. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59, n. 2, p. 323-324. 1998.

29. GOULART, E.; LEITE, I. C. Parasitologia 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Cultura Medica, 1978, p.102.
30. GREGORIADIS, G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Lett.*, v. 36, n. 3, p. 292-296, 1973.
31. GRIT, M.; CROMMELIN, D. J. A.; LANG, J. Determination of phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and their lyso forms from liposome dispersions by high-performance liquid chromatograph using high-sensitivity refractive index detection. *J. Chromatogr.*, v. 585, p. 239-246, 1991.
32. GROVES, M. J. The application to electron microscopy. New York: Pergamon Press, 1984. p. 38-81, 169-171.
33. GRYBOSKI, J.; WEINSTEIN, D.; ORDWAY, N. K. Toxic encephalopathy apparently related to the use of insect repellent. *N. Engl. J. Med.*, v. 264, p. 289-291, 1961.
34. GUPTA, R. K.; RUTLEDGE, L.C. Controlled release repellent formulations on human volunteers under three climatic regimens. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 7, p. 490-493, 1991.
35. HALL, S. A.; GREEN, N.; BEROZA, M. Inset repellent. *J. Agr. Food. Chem.*, v. 5, p. 663-667, 1957.
36. HALLER, P. H. Aplicações dos lipídios e fosfolipídios em cosméticos. *Cosmet. Toiletr.*, v. 1, n.4, p. 33-40, 1989.
37. HO, N. F. H. et al. Mechanisms of topical delivery of liposomally entrapped drugs. *J. Controlled Release*, v. 2, p. 61-65, 1985.
38. HOPE, M. J. et al. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 812, p. 55-665, 1985.
39. HOX, W. M. A.; GEURTS VAN KESSEL, W. S M. , *J. Chromatog.*; v. 142, p. 735, 1977.
40. ISRAELACHVILI, S.; MARCELJA, S.; HORN, R. G. . Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.*, v. 13, p. 121-200, 1980.
41. KIRBY, C.; CLARKE, J.; GREGORIADIS, G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.*, v. 2, n. 182, p. 591-598, 1980.
42. LANG, J. K. Quantitative determination of cholesterol in liposome drug products and raw materials by high-performance liquid chromatograph. *J. Chromatograph.*, v. 507, p. 157 – 163, 1990.
43. LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation, *J. Biochem.*, v. 256, p.1-11, 1988.

-
44. LEHNINGER, A. L. ; NELSON, D. L. ; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
 45. LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation methods. *Biochem. Anal.*, v. 33, p. 337-462, 1988.
 46. LILLIE, T. H.; SCHRECK, C. E.; RAHE, A. J. Effectiveness of personal protection against mosquitoes in Alaska 1988. *Journal of Medical Entomology*, v. 25, p. 475, 1988.
 47. McCABE, E. T. et al. Insect repellent III N,N-diethyla. *J. Org. Chem.*, v. 19, p. 493, 1953.
 48. MARCONDES, C. B. *Entomologia medica e veterinaria*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. 432 p.
 49. MARKOVIC, G. et al. Determination of some insect repellents in cosmetic products by high-performance thin-layer chromatography. *J. Chromatography. A.*, v. 847, p. 365-368, 1999.
 50. MARTINDALE: the complete drug reference. 32. ed. London: Pharmaceutical Press, 1999, p. 1348.
 51. MAYER, L. D. et al. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 817, p. 193-196. 1985.
 52. MAYHEN, E. et al. Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 775, n. 2, p. 169-174, 1984.
 53. MEDEIROS, Z. A filariose bancroftiana no município de Moreno – Pernambuco, Brasil. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, n. 1, p. 73-79, 2004.
 54. MELO, A. L. et al. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. *Int. J. Pharm.*, v. 255, p. 227-230, 2003.
 55. MEZEI, M.; GUASEKHARAM, V. Liposomes: a selective drug delivery system for the topical route of administration: lotion dosage form. *Life. Sci.*, v. 26, p. 1473-1477, 1980.
 56. MEZEI, M.; GUASEKHARAM, V. Liposomes: a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 34, 473-474, 1982.
 57. MILLER, J. D. Anaphylaxis associated with insect repellent. *N. Engl. J. Med.*, v. 307, p.1341-1342, 1982.
 58. BRASIL. Ministério da Saúde – FUNASA. *Programas e projetos de saúde* [online]. Disponível: <http://www.funasa.gov.br/epi/dengue.htm>. Acesso em: 22 de julho de 2003.

59. MÜLLER, M.; MACKEBEN, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of liposomes with encapsulated local anaesthetics. *Int. J. Pharm.*, v. 274, p. 139-148, 2004.
60. NERY, M. S. et al. Niobium pentachloride promoted conversion of carboxylic acids to carboxamides: synthesis of the 4-aryl-1-, 3, 4-tetrahydroisoquinoline alkaloid structures. *Synthesis*, v. 2, p. 272 – 276, 2003.
61. NACHT, S. Encapsulation and other topical delivery systems. *Cosmet. Toiletries*, v. 110, p. 25 – 30, 1995.
62. NEW, R.R.C. *Liposomes: a practical approach*. New York: IRL Press, 1990. p.105-109.
63. NING, M. et al. Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antifungal drug clotrimazole. *Indian. J. Exp. Biol.*, v. 43, n. 3, p. 208, 2005.
64. PERRETT, S.; GOLDING, M.; WILLIAMS, P. A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 43, n. 3, p. 154-161, 1991.
65. PUGLIA, C. et al. Evaluation of in-vivo topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 56, n. 10, p. 1225-1232, 2004.
66. REY, L. *Bases da parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 906 p.
67. RIDGWAY, R. L.; INSCOE, M.; ARN, H. *Insect pheromones and other behaviour-modifying chemicals*. London: British Crop. Protection Council, 1990. 135 p.
68. RIEGER, M. M. Current aspects of cosmetics sciences III. Liposomes and their uses. *Cosmet. Toiletries*, v. 96, n. 8, p. 35-38, 1981.
69. RIVIERE, E. J. Biological factors in absorption and permeation. In: ZATZ, J. L. *Skin permeation fundamentals and application*. Washington: Allured Publishing, 1993. cap. 5, p.113-125.
70. ROZENDAL, F. *Vector control: methods for use by individuals and communities*. Geneve: WHO, 1997.
71. SALAFSKY, B. et al. Study on the efficacy of a new long-acting formulation of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) for the prevention of tick attachment. *Am. J. Trop. Hyg.*, v. 62, p. 169-172, 2000.
72. SCHÄFER-KORTING, M.; KORTING, H. C.; PONCE-PÖSCHL. E. Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris. *Clin. Invest.*, v. 72, p. 1080-1091, 1994.
73. SCHMID, M. H.; KORTING, H. C. Therapeutic progress with topical liposome drugs for skin disease. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 18, p. 335-342, 1996.

74. SCHRECK, C. E.; KLINE, D. L.; CARLSON, D. A. Mosquito attraction to substances from the skin of different humans. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 6, p. 406-410, 1990.
75. SCHRECK, C. E. et al. Evaluation of personal protection methods against phlebotomine and sand flies including vectors of leishmaniasis in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 31, p. 1046-1053, 1982.
76. SELIM, S. et al. Absorption, metabolism, and excretion of N,N-Diethyl-m-toluamide following dermal application to human volunteers. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 25, p. 95-100, 1995.
77. SHERMAN, J. L. Jr. Development of a systemic insect repellent. *J. Amer. Med. Assoc.*, v. 196, p. 256-258, 1966.
78. SHIEREN, H. et al. Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 542, p. 137-153, 1978.
79. SHOENIG, G. P. et al. Absorption, metabolism and excretion of N,N-diethyl-m-toluamide in the rat. *Drug. Metab. Dispos.*, v. 24, p. 156-163, 1996.
80. SILVIUS, J. R. Thermotropic phase transitions of pure lipids in model membranes and their modification by membrane proteins. IN: JOST, P. C.; GRIFFITH, H. *Lipid-protein interactions*. New York: John Wiley Sons, 1982. v. 2, p. 239-281.
81. SINGER, M. A. et al. The formation of multilamellar vesicles from saturated phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines: morphology and quasi-elastic light scattering measurements. *Chem. Phys. Lipids*, v. 54, p. 131-146, 1990.
82. SMITH, C. N. Personal protection from blood-sucking arthropods. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 196, p. 236-239, 1966.
83. SONENSHINE, D. E. Pheromones and other semiochemicals of the acari. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 30, p. 1-8, 1985.
84. STEWART, J. C. Colorimetric determination of phospholipid with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.*, v. 104, p. 10-14, 1980.
85. STINECIPHER, J.; SHAH, J. Percutaneous permeation of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) from commercial mosquito repellents and the effect of solvent. *J. Toxicol. Environ. Health*, v. 52, p. 119, 1997.
86. SUZUKI, K.; SAKON, K. The application of liposomes to cosmetics. *Cosmet. Toiletries Magazine*, v. 105, n. 5, p. 65-77. 1990.
87. SZOKA, F.; PAPAHAJIOPOULOS. D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, v. 9, p. 467-508, 1980.

-
88. TALSMA, H. , CROMMELIN, D. J. A . Liposomes as drug delivery systems. Part I: preparation. *Pharm. Technol. Int.*, p. 24-36, 1992a.
 89. TALSMA, H. et al. The influence of the molar ratio of cholesteryl hemisuccinate/dipalmitoylphosphatidylcholine on liposome formation after lipid film hydration. *Chem. Phys. Lipids*, v. 62, n. 2, p. 105-112, 1992b.
 90. THE ASTM Commitee E35 on Pesticides. *Standard test methods for laboratory testing of non-commercial mosquito repellent forulations on the skin – E 951-94* (Reapproved 2000).
 91. THE MERCK index. 13. ed. New Jersey: Merck & Co., 2001, p. 415.
 92. UNITED States pharmacopoeia. 27. ed. Rockville: United States Pharmacopial Convention, 2000, p. 557.
 93. VELTRI, J. C. et al. Retrospective analysis of calls to poison control center resulting from exposure to the insect repellent DEET from 1985-1989. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, v. 32., p. 1-16. 1994.
 94. WAGNER, A. ; VORAUER-UHL, K; KATINGER, H. Liposomes produced in a pilot scale; production, purification and efficiency aspects. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, v. 54, p. 213-219, 2002.
 95. WEINNER, N.; MARTIN, F.; RIAZ, M. Liposomes as a drug delivery system. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, v. 15, p. 1523-1533, 1989.
 96. WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. *Cosmetologia de Harry*. Madri: Ediciones Diaz dos Santos, 1990.
 97. WISCHNITZER, S. *Introduction to eletron microscopy*. New York: Pergamon Press, 1980, p. 38-81, p. 169-171.
 98. YOUNG, D. L.T.C. G.; EVANS, S. Safety and efficacy of DEET and permethrin in the prevention of arthropod attack. *Military Medicine*, v. 163, p. 324-330, 1998.
 99. ZHANG, X. et al. Determination of liposomal encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 127, p. 113-120, 2004.

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
CML 1ªRM
LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO DO EXÉRCITO
(Botica Real Militar/1808)**

**ESTUDO COMPARATIVO DE
FORMULAÇÕES TÓPICAS DE
REPELENTE DE INSETOS:
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA**

Autor: T Cel Farm MARCIO Costa Miranda

Orientadora: Sheila Garcia

2005

MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
CML 1ª RM
LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO DO EXÉRCITO
(Botica Real Militar/1808)

**ESTUDO COMPARATIVO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS DE REPELENTES DE
INSETOS: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA PREPARAÇÃO
EM DESENVOLVIMENTO**

NOME DA UNIDADE: LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO DO EXÉRCITO

ENDEREÇO: LICÍNIO CARDOSO Nº 96, TRIAGEM

CIDADE: RIO DE JANEIRO ESTADO RIO DE JANEIRO CEP: 20911-150

TIPO DE PROJETO:

**TESTE DE REPELÊNCIA UTILIZANDO MOSQUITOS *Aedes Aegypti* DO
INSETÁRIO DO IBEx**

POPULAÇÃO ALVO:

A preparação a ser desenvolvida tem como principal alvo os militares do Exército Brasileiro

Nº PREVISTO DE VOLUNTÁRIOS: 06

ÁREA GEOGRÁFICA:

O projeto busca a proteção pessoal contra insetos hematófagos que são encontrados em todo território nacional, em especial nas zonas de transmissão das doenças tropicais. Nestas regiões de clima tropical é mais freqüente o desenvolvimento desses insetos transmissores, principalmente regiões atingidas por doenças endêmicas como a malária, dengue e leishmanioses.

LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO DO EXÉRCITO

ENDEREÇO (Rua/Av.): LICÍNIO CARDOSO, Nº 96, TRIAGEM CEP 20911-150

CIDADE:RIO DE JANEIRO

TELEFONE: 0XX21 22811426

C.G.C: 00394452/0406-60

IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELA INSTITUIÇÃO MANTENEDORA

NOME DO DIRIGENTE: HAROLDO OLIVEIRA GOMES

DESIGNAÇÃO DO CARGO: DIRETOR

IDENTIDADE: 011095502-8 CPF:584439677-49

FACULDADE DE FARMACIA DA UFRJ

ENDEREÇO: CCS Bloco Bss sala 34 – Cidade Universitária – CEP 21941-590

RIO DE JANEIRO

TELEFONE: 0XX21 2564-7380

IDENTIFICAÇÃO DO COORDENADOR DO PROJETO

NOME COMPLETO: Drª SHEILA GARCIA

DESIGNAÇÃO DO CARGO: PROFESSOR ADJUNTO DA UFRJ

IDENTIDADE:04220122-8 CPF: 706108787-00

IDENTIFICAÇÃO DO PESQUISADOR

NOME COMPLETO: MARCIO COSTA MIRANDA

DESIGNAÇÃO DO CARGO: TEN CEL FARM CH DIV PRODUÇÃO DO LQFEx

IDENTIDADE: 0114671233 CPF: 672561637-20

INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO

ENDEREÇO: RUA FRANCISCO MANUEL Nº 126

RESPONSÁVEIS PELO LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA: DENISE VALLE e
JOSÉ BENTO PEREIRA LIMA

CONVÊNIO: FIOCRUZ / IBEX

IDENTIDADE: 04494928-7 CPF: 769655707-68

I - DESCRIÇÃO DO PROJETO:

Este projeto propõe testar uma preparação de lipossomas contendo produto repelente já disponível no mercado, veiculada em gel para aplicação sobre a pele. Esta preparação será comparada com uma preparação em gel, contendo o mesmo produto repelente, através de teste de eficácia e persistência. Neste, as preparações em estudo serão aplicadas nos antebraços de voluntários que logo após os oferecerão a um grupo de mosquitos fêmea, confinados em gaiolas.

Os repelentes agem por evaporação, em pequenas quantidades, criando um microambiente na área onde foram aplicados, impedindo a aproximação dos insetos hematófagos, que são atraídos pelo calor da pele e pelo odor de algumas substâncias exaladas pelo tecido cutâneo. A maioria dos repelentes é dissolvida em um líquido diluente (em geral, álcool) e aplicada na forma de spray sobre a área a ser protegida, pele ou roupa.

O repelente a ser usado, N,N-dietil-m-toluamida, mais conhecido pela sigla DEET, vem sendo empregado há vários anos como repelente, sendo encontrado no mercado sob as mais variadas formas de uso tópico (soluções alcóolicas, cremes, géis, microemulsões etc). O tempo de proteção que cada formulação confere é diretamente proporcional à concentração do princípio ativo.

Em estudos duplo-cego, realizados com voluntários das Forças Armadas dos Estados Unidos da América, formulações de DEET (bem como de permetrina) demonstraram ser de alta eficácia quando aplicados a voluntários (YOUNG, 1998).

No presente projeto, o objetivo final é a definição de uma formulação, baseada no uso de lipossomas como veículo carreador do repelente, que aumente o tempo de proteção contra picadas, em relação às formulações em gel existentes no mercado. Pretende-se que esta formulação repelente seja utilizada pelo efetivo das Forças Armadas em regiões de maior incidência de doenças e de elevados índices de infestação por insetos vetores (áreas de assentamento e de extrativismo). Vale lembrar que muitas doenças parasitárias estão presentes no Brasil. Por exemplo, de acordo com dados do Ministério da Saúde, ocorreram 186.000 casos de malária na Amazônia Legal

entre janeiro e julho de 2002 e cerca de 800 mil casos de dengue no território nacional no ano de 2002 (fonte: <http://www.funasa.gov.br>).

Os lipossomas são estruturas microscópicas consistindo de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas circundando os compartimentos aquosos, dentro do qual substâncias ativas hidrossolúveis podem ser aprisionadas. Substâncias lipofílicas também podem ser incorporadas, permanecendo no interior da membrana lipídica. As vesículas se formam quando esses lipídios são dispersos em meio aquoso. A forma e o tamanho dos lipossomas dependem do método de preparação, da composição de lipídios, da força iônica do meio e do pH (ANSEL, 1999).

As preparações que contêm lipossomas, devido à sua similaridade com a composição da membrana plasmática das células, são comumente empregadas como veículo para incorporar substâncias que terão seu local de ação em regiões específicas do nosso organismo. No campo da dermatologia, os lipossomas têm sido bastante aceitos, por permitirem que a substância ativa fique retida nas camadas mais superficiais da pele, não havendo absorção para as camadas mais profundas. Exemplo da sua aplicação é o uso de filtros solares, que ficam retidos, por tempo prolongado, no estrato córneo (a camada mais externa da pele), proporcionando maior proteção contra os raios solares.

Está sendo desenvolvida, no Laboratório LabCQ da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), uma preparação de lipossomas que tem por finalidade servir de veículo para o repelente de insetos DEET. Os lipossomas já foram obtidos e incorporados à substância repelente e estão sendo usados para a preparação de uma formulação, na forma farmacêutica em gel, que deverá ser aplicada sobre a pele. Pretende-se que esta formulação, a exemplo dos filtros solares, permaneça no estrato córneo, conferindo proteção contra a aproximação de mosquitos hematófagos. Vale ressaltar que o repelente usado para os testes desta nova formulação, DEET, é uma substância de consagrada utilização desde 1950, tendo sido estudada nos aspectos de estabilidade, toxicidade, concentração eficaz e testes *in vivo* e *in vitro*.

Atividades: A tecnologia de manipulação da preparação desenvolvida no LabCQ já foi definida e a análise do princípio ativo (DEET) já

foi efetuada. O material está pronto para teste em voluntários, por meio de aplicação nos antebraços e exposição a fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti*. Será usada a cepa Rockefeller, referência internacional de susceptibilidade a inseticidas, mantida há décadas em laboratório, e livre de qualquer agente patogênico. Será testado um número mínimo de seis voluntários. A formulação que se quer testar (lipossomas + DEET, formulação em gel) será comparada com outra formulação comercial do LQFEx contendo o mesmo princípio ativo (DEET em gel). Serão usados, como controles, formulações em gel (com e sem lipossomas) sem o repelente. Para cada voluntário, a área do antebraço onde as formulações terão sido aplicadas será exposta durante períodos de 15 minutos a gaiolas contendo 20 mosquitos, a intervalos regulares, de três horas, até seis horas e depois de hora em hora, até nove horas depois da aplicação. Apenas uma formulação será aplicada em cada antebraço de cada vez. Cada antebraço receberá uma formulação diferente (controle ou experimental). Detalhes da metodologia de aplicação, exposição e avaliação estão na seção pertinente.

Resultados esperados: Estão disponíveis no comércio várias preparações que utilizam o DEET como princípio ativo, na forma de cremes, géis ou soluções (por exemplo: OFF®, AUTAN®). Espera-se que a formulação aqui desenvolvida (contendo formulação em gel de DEET encapsulado em lipossomas) apresente um tempo de proteção mais prolongado que aquele da preparação comercial (usada para comparação), que consiste de formulação de DEET em gel.

II - DESCRIÇÃO DA SITUAÇÃO, DO PROBLEMA E DA POPULAÇÃO-ALVO

As doenças transmitidas por insetos são um problema de saúde pública em vários países, principalmente aqueles localizados na Região Tropical. No Brasil, as arboviroses e parasitoses continuam a emergir em regiões endêmicas, com alguns episódios epidêmicos que têm merecido, por parte do Ministério da Saúde, programas específicos para controle, como é o caso da dengue, ou da malária.

O Exército Brasileiro encontra-se distribuído em todo o território nacional, em localidades onde é comum a infecção por agentes etiológicos de doenças transmitidas por insetos, e mesmo em regiões endêmicas de outros países, como é o caso de militares que fazem parte das Missões de Paz da Organização das Nações Unidas. Adicionalmente, várias são as situações de emprego das Forças Armadas em que se faz necessário expor o militar às doenças transmitidas por insetos hematófagos. As ações de controle de insetos vetores, através do uso de inseticidas, larvicidas ou reguladores do desenvolvimento de insetos, nem sempre são viáveis. Nestes casos, a utilização de repelentes de insetos pode ser uma alternativa prática e eficiente, contribuindo para minimizar as picadas por insetos hematófagos, vetores, e conseqüentemente, o risco de infecção.

As campanhas contra o *Aedes aegypti* têm conseguido reduzir os casos de dengue. O mesmo não tem acontecido com tanta eficiência, porém, com a malária no país: os principais vetores desta doença, os mosquitos anofelinos, vivem em ambientes de florestas, o que dificulta a aplicação de técnicas de controle de insetos transmissores que sejam ao mesmo tempo eficazes e seguras, não agredindo o meio ambiente, inclusive outras espécies existentes nessas regiões. Nestes locais, recomenda-se a aplicação de algumas medidas de proteção, por exemplo, evitar o contato com o mosquito (mediante o emprego de telas nas portas e janelas das residências) ou borrifar inseticidas nas paredes das casas.

Os repelentes de uso tópico ou para aplicação em tecidos são os métodos de proteção pessoal mais empregados contra picadas de insetos e, conseqüentemente, para eventual prevenção de doenças transmitidas por vetores (YOUNG, 1998).

As formulações com DEET têm sido citadas na literatura como os mais eficazes e estudados repelentes das últimas décadas e, quando usados apropriadamente, são bastante seguros. Os eventuais efeitos colaterais, função de absorção transdérmica da substância ativa, estão na dependência da extensão da área a proteger e da quantidade de aplicações efetuadas (QIU 1998). Várias formulações já são comercializadas, entre elas AUTAN CLASSIC®, AUTAN® SENSITIV®, JOHNSON'S BABY®, OFF®, SUPER

REPELEX® e EXPOSIS®, apresentando concentrações variadas, que chegam a 50% do princípio ativo.

Em documento emitido pela Diretoria de Saúde do Exército Brasileiro, que contém os dados de Doenças de Notificação Compulsória, há registro de 560 casos de malária por *Plasmodium vivax*, 127 casos de malária por *Plasmodium falciparum*, 119 casos de leishmaniose, 1.811 casos de dengue, três casos de febre amarela e dois casos de filariose, no âmbito das doze Regiões Militares no ano de 2002. No ano de 2003, até o mês de agosto, já haviam sido notificados 359 casos de malária por *P. vivax*, 136 casos de malária por *P. falciparum*, 112 casos de leishmaniose, 625 casos de dengue, um caso de filariose e um caso de oncocercose nas mesmas Regiões Militares, o que justifica nossa preocupação com a adoção de medidas preventivas contra estas doenças. Os recentes casos de malária, contraída por militares que regressam de missões em regiões de clima tropical, como Angola e Timor Leste, são outros exemplos da preocupação com o efetivo empregado nestas missões.

III - ANTECEDENTES DO PROJETO

O Laboratório Químico Farmacêutico do Exército (LQFEx) sempre esteve envolvido com a produção de repelentes e sua distribuição, para utilização pela tropa, em situações de adestramento (Serviço Militar, Curso de Operações nas Selvas, Curso de Comandos etc) ou para emprego em atividades efetivas, como nas Missões de Paz em Angola e no Timor Leste. Estas medidas de proteção têm sido adotadas em função da dificuldade de operacionalização de uma política de saúde preventiva, por parte das autoridades sanitárias, em muitas localidades onde o pessoal militar está sediado.

Recentemente o LQFEx, em parceria com o IBEX, desenvolveu um repelente para impregnação de uniformes militares que vem surtindo um bom efeito. Esta preparação, entretanto, não pode ser aplicada em áreas descobertas, ou seja, sobre a pele. Neste sentido, o objetivo final do presente projeto é testar uma formulação de uso tópico, com tempo de ação prolongado,

para aplicação nos militares, reduzindo os custos com a promoção de saúde do efetivo das Forças Armadas.

Os lipossomas, sistemas de liberação de ativos que pretendemos testar como base de uma nova formulação de repelente, provavelmente exercem suas funções a partir da erupção na superfície da pele e da formação de uma camada oclusiva de lipídios na superfície da epiderme. Os lipossomas podem ter ainda vantagens secundárias, como impedir a degradação da substância ativa pelo processo de oxidação.

IV - DESCRIÇÃO DA(S) INSTITUIÇÃO(ÕES)

O Laboratório Químico Farmacêutico do Exército foi durante décadas o mais importante centro irradiador de cultura e pesquisa das ciências farmacêuticas, tornando-se merecedor de vários diplomas e medalhas, conquistados desde 1875. Além de suprir as Organizações Militares do Exército em todo o território nacional em vários aspectos, tem notável participação, ao longo de sua existência, com o fornecimento de medicamentos e material de uso médico em missões no exterior, como nas Guerras da Tríplice Aliança, I e II Guerras Mundiais e nas forças de Paz da ONU e OEA (Suez, Moçambique, Angola, Timor Leste e São Domingos).

O Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LabCQ) pertence ao Departamento de Medicamentos, da Faculdade de Farmácia da UFRJ. O corpo docente participa ativamente do ensino e da orientação de alunos de graduação, dentre outros, em Farmácia e Habilitação Farmacêutico Industrial, pós-graduação *latu-sensu* e *stricto sensu*, conjugando-os com atividades de pesquisa e extensão. O LabCQ foi oficializado em 1999 (Portaria 01, BUFRJ 02, de 25/02/1999) com projeto de vinculação à REBLAS, cadastrado sob número 577 / 1999 na Sub-Reitoria de Desenvolvimento e Extensão (SR-5).

O presente estudo faz parte do projeto de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do Ten Cel Farm Marcio Costa Miranda, inserido no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Concentração: Incorporação de Substâncias Ativas em Lipossomas. Este trabalho conta com

o apoio do Laboratório de Controle de Qualidade – LabCQ da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e do Laboratório de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx), coordenado por pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz, onde os ensaios de repelência serão executados.

V - OBJETIVO GERAL DO PROJETO PROPOSTO

Desenvolvimento de formulação de DEET, em lipossomas, para uso como repelente de insetos, com vistas a ser empregada no efetivo das Forças Armadas e, eventualmente, em segmentos da sociedade civil, como uma alternativa para evitar a propagação de doenças transmitidas por insetos.

VI - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1 - Incluir a substância repelente em lipossomas, avaliando a melhor proporção de inclusão da substância repelente em relação ao fosfolipídio empregado, a fosfatidilcolina.

Resultado esperado – Este objetivo já foi atingido no LabCQ - UFRJ. A melhor proporção de incorporação do DEET foi de 20%. Em relação a fosfatidilcolina.

Objetivo 2 - Estudar o tempo de repelência obtido com a formulação desenvolvida, contendo lipossoma, com a finalidade de contribuir para a oferta de um produto que tenha o seu tempo de ação prolongado.

Resultado esperado – O tempo médio das preparações sem lipossoma existentes no mercado é de 4-6 horas e, por isso, há necessidade de reaplicações periódicas. Espera-se que a preparação lipossoma + DEET tenha o tempo de ação superior àquele apresentado pelos produtos comerciais.

Objetivo 3 - Comparar, através de testes de repelência “*in vivo*”, com voluntários, a eficácia da formulação desenvolvida com aquela de um repelente comercial, contendo o mesmo princípio ativo.

Resultado esperado – Validação do produto formulado no âmbito deste projeto, como repelente estável e adequado à utilização pelo efetivo das Forças Armadas em missões e treinamento em campo.

VIII - PLANO DE IMPLEMENTAÇÃO

OBJETIVO NÚMERO	ATIVIDADES	PERÍODO
1	CONCENTRAÇÃO DO ATIVO	4 meses
2	TESTE DE EFICÁCIA E PERSISTÊNCIA	4 meses
3	COMPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA COM PRODUTO COMERCIAL	4 meses

IX – PARÂMETROS AVALIADOS

A quantificação do teor do princípio ativo (DEET) no lipossoma e a verificação de formação de vesículas já foram analisadas, respectivamente, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e por contagem de vesículas por espectroscopia de espalhamento da luz laser e em imagens geradas por microscopia eletrônica de transmissão, na UFRJ. Estes parâmetros já foram objeto de avaliação por pesquisadores daquela Instituição e portanto, não serão novamente abordados no presente projeto.

A avaliação da eficácia e da persistência da preparação desenvolvida será realizada através de testes comparativos, pareados, em voluntários sadios, entre a formulação experimental e um produto comercial. Serão usados culicídeos mantidos em laboratório há várias décadas, livres de infecção, da espécie *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller, susceptível a inseticidas. Os dados obtidos com os ensaios serão submetidos ao teste estatístico de Wilcoxon, não paramétrico, para a comparação de dados pareados.

X – MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar a eficácia dos produtos, será feito um teste prático de repelência com *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller. Esta cepa foi originalmente estabelecida no *Rockefeller Institute* (Nova York, NY) por D. W. Jenkins em 1959 e tem sido usada por laboratórios de todo o mundo como cepa de referência para fecundidade, vigor, uniformidade e susceptibilidade a inseticidas. Serão usados os mosquitos criados no Laboratório de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx), bem como suas instalações. Os ensaios contarão com apoio da equipe que lá trabalha, formada por pesquisadores da Fiocruz, em convênio com o IBEx.

Para os testes serão usados pelo menos seis voluntários sadios, após esclarecimento em relação ao experimento executado e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido.

Em cada voluntário serão testadas quatro formulações, como segue:

- 1) Controle com gel.
- 2) Controle com lipossomas em gel.
- 3) Formulação comercial de DEET em gel.
- 4) Formulação experimental de DEET/lipossoma em gel.

Serão testadas, de cada vez, duas formulações, em dois dias diferentes. Apenas uma formulação será testada em cada antebraço a cada vez. O braço esquerdo receberá sempre uma das formulações-controle e o braço direito, uma das formulações contendo o repelente.

Antes da aplicação das formulações, proceder-se-á à lavagem de todo o antebraço com água e sabão, seguida de secagem completa. As formulações serão aplicadas em área de 4 X 4 cm, previamente delimitada com fitas adesivas. A quantidade de cada formulação será pesada em balança analítica e espalhada na área delimitada com espátula de madeira. Os testes se iniciarão 15 minutos depois da aplicação, para garantir a secagem completa das formulações aplicadas.

Os testes de repelência serão feitos em diferentes momentos após a aplicação: 0 h (na prática, 15 minutos depois da aplicação), 3h, 6h, 7h, 8h e 9h. Estes tempos foram escolhidos de forma a atender a dois critérios:

- 1) Exposição dos voluntários ao menor número possível de Culicídeos.
- 2) Cobertura do período de repelência indicado para o produto comercial (de quatro a seis horas), com margem para avaliação de eventual extensão do período de proteção.

Em todos os testes de repelência, para cada um dos pontos experimentais (0, 3, 6, 7, 8 e 9h), será fixada uma caixa acrílica em cada um dos antebraços, contendo 20 mosquitos adultos fêmea. O tamanho e a forma das caixas acrílicas estão indicados na Figura 1: estas caixas, construídas de acordo com o manual da ASTM E 951 – 94 (Re-aprovado em 2000) são teladas em uma das faces e apresentam, na face oposta, duas aberturas distintas, de 2,9 cm de diâmetro cada. Em cada caixa, apenas uma das aberturas será utilizada, de forma a expor aos mosquitos a área do antebraço contendo a formulação. Em cada ponto experimental, os mosquitos ficarão expostos às formulações por 15 minutos.

Serão usadas fêmeas adultas de três a sete dias de idade, não alimentadas com sangue e submetidas, antes do teste, a um jejum de água açucarada de 15-24 horas. Este procedimento, necessário para induzir e normalizar a avides das fêmeas pelo repasto sangüíneo, é utilizado rotineiramente no laboratório para alimentação das fêmeas de culicídeos, durante a manutenção das colônias.

Em cada ponto experimental serão usados mosquitos diferentes, ou seja, cada mosquito será usado apenas uma vez. Ao final da exposição, será contado o número de mosquitos que realizou o repasto, através da observação de seus abdomens. Em caso de dúvida, proceder-se-á à dissecção, para confirmação. Outros parâmetros, como número de picadas ou número de vezes que os mosquitos pousam, ou ainda, tempo de cada picada ou tempo entre uma picada e outra foram descartados: alguns são subjetivos; outros, de avaliação difícil, principalmente com 20 mosquitos de cada vez; outros ainda estariam sujeitos a ruídos experimentais, como seria o caso de quantificação do número de picadas (cada mosquito poderia picar mais de uma vez e, dependendo da quantidade de sangue ingerida a cada vez, sua avides estaria modificada, ocasionando falta de homogeneidade entre os mosquitos).

Os resultados obtidos serão submetidos ao teste não paramétrico, pareado, de Wilcoxon que avaliará, para cada voluntário, a diferença entre o número de mosquitos alimentados em cada condição. Inicialmente serão comparadas as duas formulações-controle. Se não houver diferenças significativas entre estas, os dados obtidos para os controles (itens 1 e 2, acima) serão tratados em conjunto e comparados com cada uma das formulações contendo o repelente (itens 3 e 4). Em caso de diferenças significativas entre os controles, serão feitas apenas comparações entre cada formulação contendo o repelente e seu controle específico (itens 1 X 3 e itens 2 X 4).

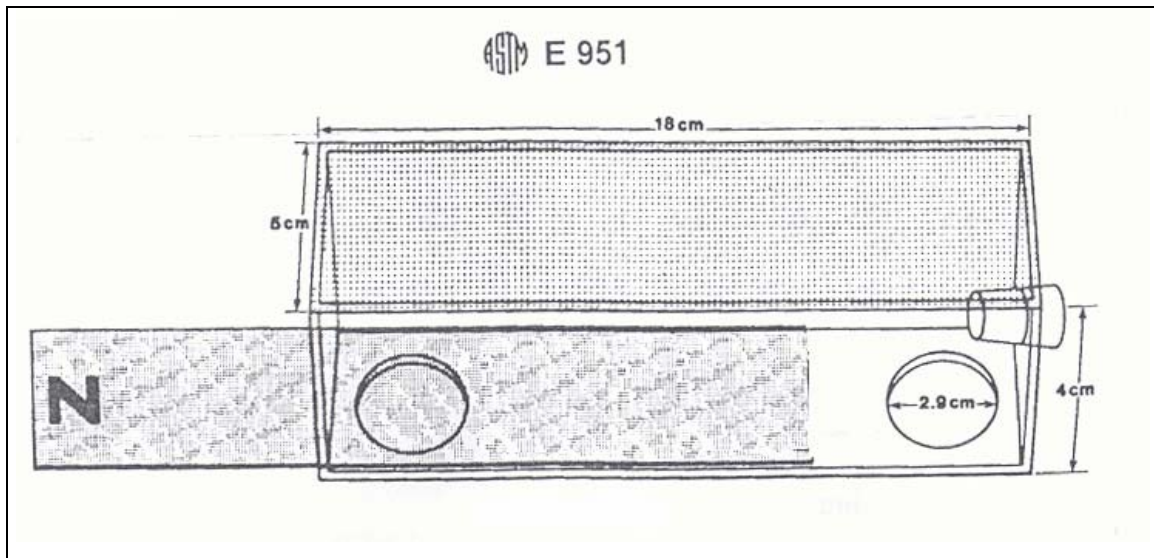


Figura 1 - Esquema indicativo da estrutura da caixa acrílica usada para exposição do antebraço de voluntários aos Culicídeos.

XI – RESULTADOS E CONCLUSÕES ESPERADAS

Com estes testes pretende-se definir se a formulação repelente desenvolvida no âmbito deste projeto, contendo lipossomas, é efetiva por mais tempo que a formulação comercial e, em conseqüência, adequada à utilização no efetivo das Forças Armadas.

XII – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Serão selecionados pelo menos seis voluntários sadios, de ambos os sexos; com idade de 18 a 50 anos, com adequada relação peso-altura, sem histórico de doença de pele, sem lesões cutâneas no antebraço que possam interferir com os resultados do estudo e capazes de fornecer seu consentimento livre e esclarecido (Alberti et al., 2001).

Critérios de inclusão

- ✓ Voluntários sadios
- ✓ Idade entre 18 e 50 anos
- ✓ Peso em um limite de $\pm 10\%$ do peso considerado normal, levando-se em consideração a altura e estrutura física
- ✓ Consentimento pós-informação (por escrito) para participação voluntária no estudo
- ✓ Os voluntários sadios serão recrutados entre os integrantes do Exército Brasileiro que pertençam ao sistema de SAMMED/FUSEX.

Os voluntários preencherão um Formulário de Cadastro, com as seguintes informações básicas:

Voluntário nº: _____

Nome: _____

Idade: _____

Sexo: F M

Telefone para contato:

Cor da pele: branca parda negra outra

Já teve algum problema de pele?

Preferência em relação ao dia e hora para o experimento:

ESPAÇO RESERVADO PARA O PESQUISADOR CLÍNICO:

Exame dermatológico:

Observações complementares:

Data: _____

Assinatura e carimbo _____

Estas informações serão necessárias para a avaliação do investigador clínico e a liberação do voluntário para o Estudo de Repelência das Formulações para Uso Tópico contendo DEET.

Critérios de exclusão

- ✓ Hipersensibilidade ao DEET
- ✓ Voluntários com histórico de doença de pele ou lesão cutânea no antebraço

Critérios de exclusão durante o estudo

- ✓ Irritação, sensação de ardência, dermatite de contato associada à aplicação da preparação com DEET.

Os procedimentos a serem adotados para controle ou tratamento dos eventos adversos, compreendem:

- ✓ Em caso de evento adverso, ao voluntário será prestado atendimento de emergência pelo Posto Médico do Instituto de Biologia do Exército.
- ✓ Em caso de eventos adversos sérios (graves) o clínico do Posto de Saúde do Instituto de Biologia do Exército encaminhará para o Hospital de Guarnição da Vila Militar, que prestará atendimento, conforme declaração anexa.
- ✓ Os voluntários retirados do estudo por causa de um evento adverso serão acompanhados até que os desdobramentos finais sejam determinados.
- ✓ Os voluntários terão esclarecidas todas as dúvidas restantes, e caso concordem, assinarão o Termo de Consentimento para participação no estudo.

Alguns procedimentos a serem seguidos - adequação às condições estabelecidas pelo FDA/CDER (FDA/CDER-GTDDP,1998):

- ✓ Quinze minutos antes do experimento, os antebraços do voluntário serão lavados com água corrente e sabonete neutro.
- ✓ O antebraço será coberto com um material resistente a picada de insetos, tendo uma área pré-estabelecida para o acesso das fêmeas dos mosquitos.
- ✓ A formulação será aplicada na área demarcada, com auxílio de uma espátula de madeira, de modo uniforme quanto à distribuição e quantidade (6,25 mg/cm²). A cada vez, serão aplicadas duas formulações em cada voluntário, uma em cada antebraço, para a realização de testes comparativos.
- ✓ As áreas de cada antebraço serão expostas aos mosquitos por períodos de 15 minutos a intervalos de três horas até seis horas e, posteriormente, de hora em hora, até um total de nove horas.

O voluntário participante do estudo deve se comprometer a:

- ✓ Estar disponível durante aproximadamente 12 horas, a cada três dias alternados, por um intervalo de 15 a 30 dias, marcados de acordo com a conveniência dos pesquisadores e voluntários. O experimento será realizado no Laboratório Entomologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx).
- ✓ Não usar hidratante, perfume ou qualquer outro cosmético ou medicamento na região dos antebraços 24 horas antes do experimento.

XIII – CURRICULUM VITAE DOS PESQUISADORES (anexo)

XIV- REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. ALBERTI, I., KALIA, Y.N., NAIK, A., BONNY, J-D., GUY, R.H. In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *Journal Controlled Release*, 71: 319-327, 2001.
2. ANSEL, H. C.; ALLEN Jr, L. V.; POPOVICH, N. G. Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 7 th Ed, Lippincott Williams and Wilkins, p. 548-551, 1999.
3. FDA/CDER-GTDDP Guidance for industry: topical dermatological drug products NDAs and ANDAs – in vivo bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release and associated studies [online]. DEPARTMENT OF. HEALTH AND HUMAN SERVICES FDA/CDER. Disponível: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> [6/2/1998].
4. LILLIE, T. H.; SCHRECK, C. E.; RAHE, A. J. Effectiveness of personal protection against mosquitoes in Alaska 1988. *Journal of Medical Entomology*, 25: 475, 1988.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE - FUNASA - Programas e Projetos de Saúde [online]. Disponível: <http://www.funasa.gov.br/epi/dengue.htm#>. Rio de Janeiro.
6. QIU, H.; JUN, H. W.; McCALL, J. W. Pharmacokinetics, formulation, and safety of insect repellent N, N-diethyl-3-methylbenzamide (deet): a review. *Journal of American Mosquito Control Association*, 14: 12-27, 1998.
7. RIVIERE, E.J. Biological factors in absorption and permeation. In: ZATZ, J.L., Skin permeation fundamentals and application. Ed. Joel L. Zatz. Estados Unidos: Allured Publishing Corp. Wheaton Il, cap.5, p.113-125, 1993.
8. SHAH, V.P.; FLYNN, G.L.; YACOBI, A.; MAIBACH, H.I.; BON, C.; FLEISCHER, N.M.; FRANZ, T.J.; KAPLAN, S.A.; KAWAMOTO, J.; LESKO, L.J.; MARTY, J.P.; PERSHING, L.K.; SCHAEFER, H.; SEQUEIRA, J.A.; SHRIVASTAVA, S.P.; WILKIN, J.; WILLIAMS, R.L. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms – methods of evaluation of bioequivalence. *Pharmaceutical Research*, 15: 167-171, 1998.
9. YOUNG, D.LTC G.; EVANS, S. Safety and efficacy of DEET and permethrin in the prevention of arthropod attack. *Military Medicine*, 163: 324-330, 1998.

ORIENTAÇÃO FORNECIDA AOS VOLUNTÁRIOS PARA TESTES FEITOS COM LIPOSSOMA CONTENDO REPELENTE

OBJETIVO

O presente estudo visa coletar resultados referentes à proteção dos voluntários contra picadas de insetos, utilizando-se para estas medidas a aplicação de uma preparação em gel contendo lipossomas com substância repelente, o DEET.

METODOLOGIA

Cada voluntário receberá em cada um dos braços, na região do antebraço, a aplicação de 1) uma preparação controle contendo apenas gel; 2) uma preparação controle em gel com lipossoma; 3) uma preparação comercial em gel contendo a substância repelente (DEET) ou 4) uma preparação experimental em gel contendo o lipossoma e a substância repelente (DEET). Foi estabelecida como área de aplicação a região interna do antebraço.

Cada antebraço receberá apenas uma formulação por vez. Como os dois antebraços serão usados e quatro formulações serão testadas, será necessário o comparecimento de cada voluntário pelo menos duas vezes. Visitas adicionais serão solicitadas em caso de necessidade de repetição de algum ensaio.

As avaliações serão efetuadas em ambiente climatizado, com temperatura mantida em torno de 26° C e a umidade por volta de 80%.

Para otimização dos resultados, é necessário seguir alguns critérios aqui estabelecidos:

- Comparecer, no dia e horário combinados para as aplicações e medidas, no Laboratório de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército.
- Não utilizar nenhum cosmético a partir das 24 horas que antecedem o ensaio.
- Fidelidade às regras estabelecidas neste estudo.

Obs: em caso de reação tardia após o teste, fazer contato via telefone (TC Márcio):

- (21) 2281-1426 LQFEx

- (21) 9294 3287 ou 8827 1775

- (21) 2564-7380 LabCQ

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____
Identidade nº _____, estado civil _____,
Idade _____ residente à rua _____
Nº _____ bairro _____ telefone: _____

concordo em participar dos testes de eficácia e persistência de uma formulação repelente de insetos. Estou ciente de que os efeitos que podem ser desencadeados com os testes são irritação alérgica local, vermelhidão e rash cutâneo. Para tanto, autorizo a aplicação, nos antebraços, de gel ou gel contendo lipossomas, com ou sem o repelente, seguida de exposição da área a uma população de mosquitos aprisionados em uma gaiola telada. Declaro ainda ter sido esclarecido sobre todos os procedimentos e responsabilidades envolvidos com o ensaio e que posso suspender os testes a qualquer instante.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2005.

Assinatura do pesquisador

Assinatura do voluntário

TESTE DE EFICÁCIA

Nome do voluntário:

Número da visita (1) (2) (3) (4)

Data:

Hora da chegada:

Hora da lavagem do antebraço:

Hora de aplicação:

Aplicação antebraço esquerdo:

() controle com gel

() controle com lipossoma gel

Aplicação antebraço direito:

() gel comercial com DEET

() lipossoma em gel com DEET

Observações:

Hora exposição:

0h: até
3h: até
6h: até
7h: até
8h: até
9h: até
10h: até
11h: até
12h: até

Observações:

braço/condição	Tempo	0h	3h	6h	7h	8h	9h	10h	11h	12h
E	n expostos									
	n alimentados									
	n picadas (*)									
D	n expostos									
	n alimentados									
	n picadas (*)									

(*) quantificação opcional

(n) = número

Observações: