



**UNIVERSIDADE DE SOROCABA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LUCAS RANNIER MELO DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL  
(POLICAPROLACTONA) CONTENDO ICARIDINA E GERANIOL VISANDO  
ATIVIDADE REPELENTE FRENTE AO *Aedes Aegypti*.**

SOROCABA/SP  
2021

LUCAS RANNIER MELO DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL  
(POLICAPROLACTONA) CONTENDO ICARIDINA E GERANIOL VISANDO  
ATIVIDADE REPELENTE FRENTE AO *Aedes Aegypti***

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto

SOROCABA/SP  
2021

### Ficha Catalográfica

A568d Andrade, Lucas Rannier Melo de  
Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de PCL (policaprolactona) contendo icaridina e geraniol visando atividade repelente frente ao *Aedes aegypti* / Lucas Rannier Melo de Andrade. – 2021.  
56 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima.  
Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Nanopartículas. 2. Nanocápsulas. 3. *Aedes aegypti*. I. Lima, Renata de, orient. II. Fraceto, Leonardo F., co-orient. III. Universidade de Sorocaba. VI. Título.

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

LUCAS RANNIER MELO DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL  
(POLICAPROLACTONA CONTENDO ICARIDINA E GERANIOL VISANDO ATIVIDADE  
REPELENTE FRENTE AO *Aedes Aegypti*)**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado (a) em: 05/02/2021

Banca Examinadora



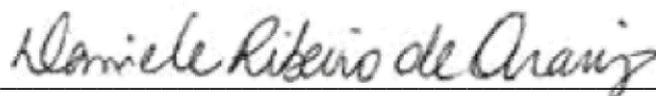
---

Prof(a). Dr(a). Renata de Lima (Orientadora)  
Universidade de Sorocaba



---

1º Exam: Prof(a). Dr(a). Patrícia Severino  
Universidade Tiradentes – Aracaju/SE



---

2º Exam: Prof(a). Dr(a). Daniele Ribeiro de Araújo  
Universidade Federal do ABC

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e da sabedoria.

À minha família (Mãe, avós e tias) por sempre apoiarem acreditarem e por todo investimento na minha formação e educação.

À minha namorada Thaísa por todo apoio, paciência e companheirismo durante esta jornada.

Aos meus orientadores Profa. Dra. Renata de Lima e Prof. Dr. Leonardo Fraceto pela oportunidade, orientação e inspiração no caminho da pesquisa.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo e de alguma forma contribuíram para a soma de meus conhecimentos.

Ao Laboratório de Avaliação de Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais (LABITON) da Universidade de Sorocaba e a todos os meus colegas que fazem parte deste laboratório.

Ao Laboratório de Nanotecnologia Ambiental – UNESP SOROCABA e todos os colegas que fazem parte, os quais também foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto e companhia de vários cafés.

À Coordenação e a secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba por todo suporte.

À banca examinadora por toda contribuição e tempo dedicado à avaliação deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – ( PROCESSO 88887.307783/2018-00)

O conhecimento emerge apenas através da invenção e da reinvenção, através da inquietante, impaciente, contínua e esperançosa investigação que os seres humanos buscam no mundo, com o mundo e uns com os outros.

*Paulo Freire*

## RESUMO

O uso de repelentes tornou-se uma necessidade entre a população como forma de prevenir de doenças transmitidas por mosquitos em especial o *Aedes aegypti* transmissor da dengue, zika e chikungunya. Atualmente muitos dos repelentes comercializados apresentam toxicidade inviabilizando sua utilização, o que leva a necessidade de novas pesquisas com a intenção de encontrar repelentes alternativos. Uma das opções é a utilização de agentes botânicos com atividade repelente; dentre estes destacam-se a icaridina e o geraniol. Contudo, estas substâncias podem apresentar alta volatilidade, fato que diminui a efetividade repelente após sua aplicação. A utilização de nanocápsulas poliméricas para dispersão dos ativos pode ser uma alternativa para aumento da eficácia e diminuição da toxicidade. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas de PCL (policaprolactona) contendo geraniol e icaridina. As nanocápsulas foram desenvolvidas utilizando o polímero PCL incorporando os óleos essenciais geraniol e icaridina através do método de nanoprecipitação com evaporação do solvente e avaliadas quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico (DLS), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, eficiência de encapsulação, calorimetria diferencial exploratória (DSC) e sua morfologia analisada através de microscopia de força atômica (AFM). As amostras também foram analisadas por calorimetria diferencial exploratória e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As nanocápsulas desenvolvidas apresentaram diâmetro entre 260 nm e 314 nm, com índice de polidispersão de  $< 0,2$  e potencial zeta entre -25 e -36 mV. As nanocápsulas apresentaram valores de eficiência de encapsulação de  $73,7 \pm 0,1$  % para icaridina e  $98,7 \pm 0,1$  % para geraniol. A análise de Microscopia de Força Atômica demonstrou morfologia esférica e baixa polidispersão. Os parâmetros cinéticos calculados a partir modelo de Korsmeyer-Peppas indicam perfil de liberação anômalo. Os ensaios de viabilidade celular e genotoxicidade mostram que as nanocápsulas poliméricas apresentam maior viabilidade celular na concentração  $< 0,005$  mg/mL (V79- linhagem celular pulmonar normal de Hamster chinês) e em concentrações  $< 0,0025$  mg/mL (3T3 linhagem celular embrionárias de *Swiss* albino). Diante dos resultados obtidos se pode concluir que o sistema preparado momento possui boas características físico-químicas e estabilidade, o que nos leva a crer que apresente potencial repelente frente ao *Aedes aegypti*.

**Palavras-chave:** Nanocápsulas, icaridina, geraniol, *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

The use of repellents has become a necessity among the population as a way of preventing diseases transmitted by mosquitoes, especially the *Aedes aegypti*, which transmits dengue, zika and chikungunya. Currently many of the commercialized repellents have toxicity making their use unfeasible, which leads to the need for further research with the intention of finding alternative repellents. One of the options is the use of botanical agents with repellent activity; among these, icaridine and geraniol stand out. However these substances can have high volatility, a fact that reduces the repellent effectiveness after their application. The use of polymeric nanocapsules for dispersing the assets can be an alternative to increase efficiency and decrease toxicity. The present study aimed at the development and physicochemical characterization of polymeric nanoparticles of PCL (polycaprolactone) containing geraniol and icaridine. The nanocapsules were developed using the PCL polymer incorporating the essential oils geraniol and icaridine through the method of nanoprecipitation with solvent evaporation and evaluated for their hydrodynamic diameter (DLS), polydispersion index (PDI), zeta potential, encapsulation efficiency, differential scanning calorimetry (DSC) and its morphology analyzed through atomic force microscopy (AFM). The samples were also analyzed by differential scanning calorimetry and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). The developed nanocapsules had a diameter between 260 nm and 314 nm, with a polydispersity index of  $<0.2$  and zeta potential between -25 and -36 mV. The nanocapsules showed encapsulation efficiency values of  $73.7 \pm 0.1\%$  for icaridine and  $98.7 \pm 0.1\%$  for geraniol. The analysis of Atomic Force Microscopy showed spherical morphology and low polydispersity. The kinetic parameters calculated from the Korsmeyer-Peppas model indicate anomalous release profile. The cell viability and genotoxicity tests show that the polymeric nanocapsules show greater cell viability at a concentration  $<0.005$  mg / mL (V79- normal Chinese Hamster pulmonary cell line) and at concentrations  $<0.0025$  mg / mL (3T3 embryonic cell line of Swiss albino). In view of the results obtained, it can be concluded that the system prepared at the moment has good physical-chemical characteristics and stability, which leads us to believe that it presents a repellent potential against *Aedes aegypti*.

Keywords: Nanocapsules, icaridine, geraniol, *Aedes aegypti*.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características dos repelentes contendo icaridina disponíveis comercialmente no Brasil, concentração, idade permitida e tempo de proteção máxima.....	19
<b>Tabela 2</b> Representação dos materiais utilizados e suas concentração para desenvolvimentos das formulações apresentada no estudo.....	24
<b>Tabela 3.</b> Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) dos métodos analíticos dos Geraniol e Icaridina.....	29
<b>Tabela 4.</b> Resultados das determinações de tamanho médio das partículas (tempo zero), índice de polidispersibilidade (PDI) e potencial zeta das nanocápsulas.....	35
<b>Tabela 5.</b> Resultados do diâmetro médio e concentração em função do tempo 0 e 90 dias das das amostras Nano_Sem ativo; Nano_GER1%; Nano_GER3%; Nano_ICAR1% e Nano_ICAR3% pela técnica de Rastreamento De Nanopartículas – NTA.....	38
<b>Tabela 6.</b> Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para os distintos modelos matemáticos empregados para a cinética de liberação das nanocápsulas contendo os ativos geraniol e icaridina. ....	53

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas; a) ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) ativo adsorvido à parede polimérica nas nanocápsulas; c) ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. **Fonte:** Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003..... 16
- Figura 2.** Representação da estrutura química do geraniol. **Fonte:** PubChem.....17
- Figura 3.** Representação da estrutura química da Icaridina. **Fonte:** PubChem.....18
- Figura 4.** Curvas analíticas obtidas. Em A) Geraniol e B) Icaridina. As análises foram realizadas em triplicata (n=9).....28
- Figura 5.** Aspecto macroscópico das formulações da nanocápsulas poliméricas Nano\_CONTROLE; Nano\_GER1%; Nano\_ICAR1%; Nano\_GER3% e Nano\_ICAR3%. **Fonte:** Própria.....29
- Figura 6.** Perfil do pH das nanocápsulas poliméricas de PCL contendo Geraniol e Icaridina (0, 15, 30, 60 dias e 90 dias). Nano\_CONTROLE; Nano\_GER1% – Nanocápsulas contendo 1% de geraniol; Nano\_GER3% – Nanocápsulas contendo 3% de geraniol; Nano\_ICAR1% Nanocápsulas contendo 1% de icaridina; Nano\_ICAR3% - Nanocápsulas contendo 3% de icaridina.....30
- Figura 7.** Diâmetro hidrodinâmico (tamanho) e Índice de Polidispersão (PDI) das Nanocápsulas Poliméricas contendo Geraniol e Icaridina em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de  $p < 0,05$  (One Way ANOVA – Tunkey) para a análise de variância dos Tempos (15, 21, 30, 60 e 90 dias) em relação ao Tempo 0. Simbolos iguais representam variação significativa.....32
- Figura 8.** Resultados das determinações do índice de polidispersibilidade (PDI) das das Nanocápsulas Poliméricas contendo Geraniol e Icaridina em função do tempo 0 à 90 dias. As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).....33
- Figura 9.** Distribuição de tamanho das partículas em função da concentração e tempo (0, 8, 15, 21, 30, 60 e 90 dias) das formulação **a)** Nano\_CONTROLE **b)** Nano\_GER1% **c)** Nano\_GER3% **d)** Nano\_ICAR1% e **e)** Nano\_ICAR3% utilizando a Análise de Rastreamento de Partículas – NTA.....34
- Figura 10.** Valores de Potencial Zeta (mV) para as Nanocápsulas Polimericas contendo e não contendo

os Geraniol e Icaridina em função do tempo (0, 15, 21, 30, 60 dias e 90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).....	36
<b>Figura 11.</b> Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para: Nano_CONTROLE; Nano_GER1%; Nano_GER3%; Nano_ICA1%; Nano_ICA3% e PCL.....	37
<b>Figura 12.</b> Espectros de infravermelho para os bioativos Geraniol e Icaridina. Os espectros foram obtidos através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando KBr, na faixa de frequência de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> .....	40
<b>Figura 13.</b> Espectros de infravermelho para as formulações – Nano_CONTROLE; – Nano_GER1%; – Nano_GER3%; – Nano_ICAR1% e – Nano_ICAR3%. Os espectros foram obtidos através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando KBr, na faixa de frequência de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> .....	41
<b>Figura 14.</b> Eficiência de encapsulação (%) da Nanocápsulas Poliméricas em função do tempo (0, 15, 21, 30, 60 e 90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de p<0,05 (One Way ANOVA – Tunkey) para a análise de variância dos Tempos (15, 21, 30, 60 e 90 dias) em relação ao Tempo 0.....	42
<b>Figura 15.</b> Representação do <b>a)</b> Gráfico de distribuição de Tamanho (nm) em relação a Frenquência Relativa (%) e <b>b)</b> Topografia referente a formulação Nano_GER3%.....	43
<b>Figura 16.</b> Representação do <b>a)</b> Gráfico de distribuição de Tamanho (nm) em relação a Frenquência Relativa (%) e <b>b)</b> Topografia referente a formulação Nano_ICAR3%.....	44
<b>Figura 17.</b> Ensaios de liberação cumulativa das nanocápsulas Nano_GER3%; Nano_ICAR3%; Emulsão_GER3% e Emulsão_ICAR3% realizada em temperatura de 32 °C. Determinação realizada em triplicata (n=3).....	45
<b>Figura 18.</b> Avaliação da citotoxicidade das formulações Nano_CONTROLE em linhagens celulares 3T3 e V79.....	48
<b>Figura 19.</b> Avaliação da citotoxicidade das formulações Nano_GER/ICAR_3% em linhagens celulares 3T3 e V79.....	49
<b>Figura 20.</b> Avaliação do danos de DNA pelo ensaio comet em linhagens celulares: 3T3 e V79 expostas às concentrações de 0,005; 0,01 e 0,02 mg/mL da formulação Nano_GER/ICAR3% e Nano_S/Ativo. Números iguais não apresentam significância estatística (p > 0,05).....	50

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b><math>\Delta H_{fus}</math></b> -	Variação da entalpia de fusão
<b>AFM</b> -	Microscopia de Força Atômica
<b>ANVISA</b> -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CLAE</b> -	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>DSC</b> -	Differential scanning calorimetry ou Calorimetria Diferencial Exploratória
<b>DLS</b> -	Dynamic Light Scattering
<b>EE</b> -	Eficiência de Encapsulação
<b>FTIR</b> -	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
<b>GER</b> -	Geraniol
<b>ICAR</b> -	Icaridina
<b>INMETRO</b> -	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
<b>LD</b> -	Limite de Detecção
<b>LQ</b> -	Limite de Quantificação
<b>AFM</b> -	Microscopia de força atômica
<b>NTA</b> -	Nanoparticle tracking analysis ou Rastreamento de Nanopartículas
<b>NCP</b> -	Nanocápsulas
<b>PCL</b> -	Poli( $\epsilon$ -caprolactone)
<b>PDI</b> -	Índice de polidispersão
<b>pH</b> -	Potencial hidrogênico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
1.1 Nanotecnologia no uso de repelentes	16
1.2 Geraniol	17
1.3 Icaridina	18
1.4 Polímeros utilizados no desenvolvimento de nanocápsulas	20
<b>2 OBJETIVOS</b>	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
<b>3 MÉTODOS</b>	23
3.1 Obtenção de condições analíticas para quantificação do Icaridina e Geraniol	23
3.1.1 Construção das curvas analíticas	23
3.1.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	23
3.2 Desenvolvimento das nanocápsulas de PCL	23
3.3 Caracterização físico-química e estudo da estabilidade das Nanocápsulas Poliméricas	24
3.3.1 Análise de tamanho e índice de polidispersão (PDI)	24
3.3.2 Análise de Nanopartículas por Rastreamento (Nanoparticle Tracing Analysis-NTA)	24
3.3.3 Potencial Zeta	25
3.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	25
3.3.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	25
3.3.6 Eficiência de Encapsulação	26
3.3.7 Microscopia Eletrônica Força Atômica (MFA)	26
3.4 Ensaio de Liberação e mecanismo de liberação	26
3.5 Ensaio de Atividade Mitocondrial - MTT	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	28
4.1 Curvas analíticas para quantificação dos ativos	28
4.1.1 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Geraniol e Icaridina	28
4.2 Aspecto e pH das Formulações	29
4.3 Diâmetro Médio das Partículas (DLS) e Índice de Polidispersão (PDI)	30
4.5 Potencial Zeta	35
4.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	36
4.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	39
4.8 Eficiência de Encapsulação	42
4.9 Microscopia de Força Atômica (MFA)	43
4.10 Ensaio de Liberação e mecanismo de liberação	45
4.11 Ensaio de Atividade Mitocondrial – MTT	47
4.12 Ensaio Cometa – Avaliação de Genotoxicidade	49
<b>5 CONCLUSÃO</b>	51
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	52

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a dengue, zika e chikungunya tornaram-se doenças reemergentes no Brasil, sendo um dos principais problemas de saúde pública no País. O *Aedes aegypti*, principal vetor, é um mosquito pertencente ao gênero *Aedes*, responsável por transmissão do vírus da dengue além das outras arboviroses como a chikungunya, zika e febre amarela. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), entre dezembro de 2019 até o primeiro trimestre de 2020 foram registrados 484.249 prováveis casos de dengue, sendo a região Centro-oeste com o maior registro de casos (553,52 casos/100 mil habitantes), seguido pelas regiões Sul com (537,48 casos/100 mil habitantes) e Sudeste (212,35 casos/100 mil habitantes). Com relação ao vírus da Zika, neste mesmo período foram registrados 1.667 casos, de acordo com o Ministério da Saúde isso significa uma taxa de 0,79 casos/100 mil hab. Para a febre chikungunya, 13.636 casos foram registrados neste período, demonstrando uma taxa de 6,49 casos/100 mil hab. A febre Chikungunya é uma doença viral causada pelo vírus CHIKV, no Brasil essa doença vem apresentando crescimento no número de registros, colocando o país entre os líderes mundiais com áreas endêmicas (BRASIL, 2020; ZARA et al., 2016; ARAGÃO et al., 2018; SOUZA-NETO et al., 2019; VALDEZ et al., 2018; GOULART et al., 2016).

O uso de repelentes é uma das medidas preventivas contra a picada do vetor transmissores da Dengue, Zika e Chikungunya, seu uso reduz significativamente o risco de picadas e conseqüentemente contração de doenças. Repelentes são definidos como substâncias que quando aplicadas sobre a pele reduzem a aproximação de insetos. Desde a antiguidade o homem busca métodos de repelência de artrópodes, relatos da época greco-romana revelam a utilização de uma solução de suco de madeira quente (*Artemisia absinthium*) e fruta cítrica para repelir insetos. Atualmente alguns compostos nitrogenados incorporados em cremes e spray são utilizados como repelentes, como por exemplo o DEET (N, N-dietil-3-metilbenzamida), IR3535 e a Icaridina (STEFANI et al., 2009, RIBAS, et al., 2010).

Dentre várias substâncias a mais utilizadas em repelentes é o DEET (N,N-Diethyl-3-methylbenzamide); desenvolvido nos Estados Unidos em 1946, esse composto químico tinha como objetivo proteger soldados americanos que ocupavam regiões infestadas por insetos. Alguns estudos mostram que o DEET possui uma melhor eficácia sobre as demais substâncias no mercado, porém ainda existe poucos estudos sobre a sua segurança e toxicidade, e a ANVISA restringe seu uso em crianças, principalmente menores de 2 anos. Quando utilizada de forma incorreta ou excessiva essa substância pode ser tóxica levando a quadros de irritação cutânea, crises convulsivas, distúrbios respiratórios, gastrointestinais, problemas cardíacos, neurológicos e oculares. Outro fator ligado a esta substância é sua deposição no meio ambiente onde estudos encontraram concentrações consideráveis desse composto químico em matrizes ambientais (WEEKS et al., 2011; TAVARES et al., 2019;

ANVISA, 2013; SINGH et al., 2010).

Diante dos problemas relacionados à segurança humana e ambiental destes compostos químicos, o uso de substâncias naturais como óleos essenciais de plantas é uma ótima estratégia para o desenvolvimento de um produto que seja eficaz e seguro para toda população, incluindo crianças e gestantes as quais pertencem ao grupo de maior risco de contrair doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*. Estudos utilizando óleos essenciais de plantas têm demonstrado significantes atividades larvicida contra o *A. aegypti*, isto se deve a determinados grupamentos químicos isolados ou em sinergismo, os quais conferem atividade repelente frente aos mosquitos (PEREIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2010).

Dentre as substâncias naturais que despertam interesse para o desenvolvimento de repelentes está o geraniol, que é classificado como monoterpenóide, sendo encontrado em óleos essenciais de limão, citronela, rosas e dentre outros. Estudos revelam que o geraniol possui diversas propriedades entre elas atividade antifúngica, anti-inflamatória, antibacteriana e atividade inseticida e/ou repelente em várias concentrações, contudo como maioria dos óleos essenciais fatores com luz, oxigênio, umidade e temperaturas elevadas podem diminuir ou até mesmo inibir sua atividade. (LIRA, et al., 2020; KARMAKAR et al., 2012; REEVES et al., 2010).

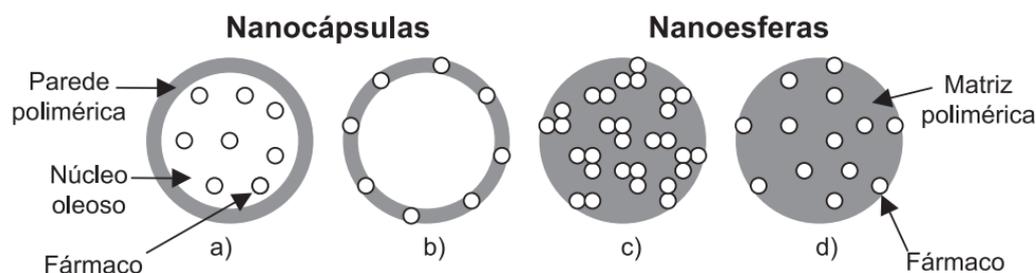
Diante deste contexto, a nanotecnologia pode ser utilizada com a intenção de proteção do ativo, sendo o ativo encapsulado mais resistente a volatilização, assim como existe a possibilidade de uma liberação modificada, a qual promoveria proteção prolongada contra os mosquitos vetores e principalmente, ocasionaria uma diminuição da toxicidade do ativo.

Neste estudo foram desenvolvidas e avaliadas nanocápsulas poliméricas contendo icaridina (repelente sintético) e geraniol (repelente botânico), visando o desenvolvimento de um produto que possua longo tempo de proteção, alta eficiência repelente e uma baixa toxicidade. A encapsulação e a liberação prolongada dos princípios ativos geraniol e icaridina permitirão a redução dos efeitos adversos, os quais detém diversos estudos sobre seu potencial alergênico, como também conferir a formulação uma maior estabilidade à luz, à umidade, à temperatura e à degradação por microrganismos.

## 1.1 Nanotecnologia no uso de repelentes

A utilização de nanocápsulas como sistemas carreadores de compostos bioativos apresenta-se como uma estratégia promissora para dispersão de ativos, pois estes potencialmente aumentam a eficiência dos compostos, promovem a liberação sustentada e como consequência apresentam a diminuição da toxicidade. Dentre essas tecnologias as nanopartículas poliméricas são promissoras na encapsulação de bioativos fotossensíveis e que sofrem rápida volatilização em temperatura ambiente. As nanopartículas poliméricas (Figura 1) são sistemas carreadores que possuem diâmetro inferior a 1000nm; diferente das nanoesferas esses sistemas são constituídos por um invólucro polimérico com o fármaco ou bioativos dissolvidos no núcleo e/ou adsorvidos à parede polimérica (ZORZI et al., 2017).

**Figura 1.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas; a) ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) ativo adsorvido à parede polimérica nas nanocápsulas; c) ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. **Fonte:** Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003.



Em estudo realizado por Nuchuchua et al. (2009) foi verificado que a combinação de citronela 10%, óleo de manjerição 5% e óleo de vetiver 5% utilizadas como nanoemulsão mostrou melhor desempenho de repelência quando comparado a outras combinações. Este estudo concluiu que a vaporização dos óleos essenciais foi maior nas partículas com menor tamanho, devido ao aumento da área de superfície apresentada, assim como apresentou uma melhor proteção no teste *in vivo* com mosquitos, não apresentando relatos de erupção, toxicidade ou irritação da pele por parte das formulações aplicadas nos voluntários. Indo ao encontro destes resultados Sakulku et al., (2009) mostraram que em nanoemulsões a citronela foi mais facilmente liberada de formulações que continham partículas de menor tamanho.

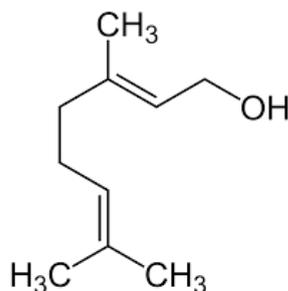
Neste cenário, o desenvolvimento de formulações que proporcionem uma longevidade na ação do repelente se torna cada vez mais necessário. Formulações inovadoras utilizando a nanotecnologia vem demonstrando um potencial de aplicação sobre o manejo de arbovirus. Uma revisão realizada por Campos et al., (2020) mostra que a partir de 2016 foram publicados cerca de

1000 artigos relacionados ao uso da nanotecnologia como controle de arbovírus, através do desenvolvimento de pesticidas, dispositivos de diagnósticos, medicamentos com sistema de liberação controlada e repelentes sendo que através desta tecnologia se busca modificar as propriedades físico-química desenvolvendo um produto mais eficaz e reduzindo eventos de toxicidade. Assim podemos destacar que o uso da nanotecnologia em repelentes possui grande potencial para o desenvolvimento de produtos sustentáveis e com uma atividade prolongada, proporcionando à saúde pública mais ferramentas no combate às arboviroses.

## 1.2 Geraniol

O geraniol é um monoterpene acíclico com solubilidade água em 100 mg/L a 25°C, este bioativo possui algumas propriedades terapêuticas tais como; anti-inflamatória, antioxidantes, antitumoral como também apresenta boa propriedade repelente e inseticida para o controle de pragas, (Sociedade Brasileira de Química, 2016; PAVAN, et al., 2018). Devido suas propriedades repelentes e baixo custo para obtenção existem incentivos para o desenvolvimento de formulações contendo este bioativo frente a mosquitos transmissores de arboviroses (TABARI et al., 2017), inclusive para uso como repelentes (WIRTZ et al., 1980; MUMCUOGLU et al., 1996; XUE et al., 2003; BARNARD et al., 2004; MULLER et al., 2008a; MULLER et al., 2008b).

**Figura 2.** Representação da estrutura química do geraniol. **Fonte:** PubChem



Trata-se de um monoterpene (10 átomos de carbono) de massa molar: 154,24 g/mol, densidade 0,89 g/cm<sup>3</sup> e LD<sub>50</sub> = 3600 mg/Kg (ratos, via oral) (Sociedade Brasileira de Química, 2016). Sua fórmula química é C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O e possui nome IUPAC: 3,7-dimetil-oct-2,6-dien-1-ol, sendo um álcool acíclico de origem vegetal. Em temperatura ambiente é líquido (TE 229-230°C) e bastante odorífero (Sociedade Brasileira de Química, 2016). É encontrado amplamente em óleos essenciais muitas vezes como éster de cadeias variadas, sendo um importante constituinte do óleo de rosas, citronela e palmarosa (SHARMA et al., 2013).

Segundo a Agência de Proteção ambiental dos EUA o geraniol é um pesticida de risco mínimo,

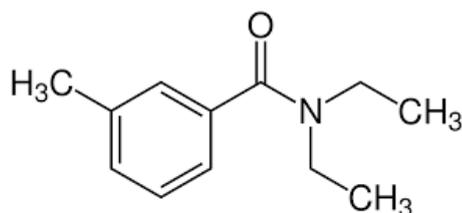
no entanto, segundo estudos, ele pode causar dermatite de contato alérgica em seres humanos e animais (HOSTYNEK et al., 2004; UTER, 2017). Atualmente poucos repelentes contendo somente um bioativo são comercializados, dentre os disponíveis o repelente Bug Band – *Insect Repellent* contém 20% de geraniol em sua formulação (6,8% demais ativos), com uma duração de atividade repelente de 3 horas e seu uso é indicado para crianças acima de três anos. Dentre os produtos que possui mistura de repelente natural e sintético, o *OFF!®Refresh Spray* tem em sua formulação a mistura de DEET 15% , 20% de geraniol e 65% relacionado a demais ativos que compõe a formulação; com uma duração de 5 horas de proteção tem o uso indicado para crianças a partir de doze anos.

Nesse sentido estudos buscam o desenvolvimento de produtos que contenham bioativos naturais que promovam uma alta eficiência e longa proteção contra mosquitos vetores de arboviroses, esse objetivo pode ser alcançado através da nanotecnologia, a a fim de promover uma liberação sustentada e conseqüentemente redução de sua toxicidade.

### 1.3 Icaridina

A icaridina é um ativo desenvolvido na década de 90 e que está em uso público desde 1998 (NAUCKE et al., 2007). Conhecida como picaridina, possui fórmula molecular  $C_{12}H_{23}NO_3$ , peso molecular 229,3 g/mol, nome IUPAC: butano-2-il 2-(2-hidroxietil) piperidina-1-carboxilato, ponto de ebulição de 296°C e solubilidade (em água) de 8,6 g/L em 20 °C. É um ativo incolor derivado da pimenta, não oleoso e com odor agradável (PUBCHEM, 2016). Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia a icaridina é um ativo indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), podendo ser utilizado inclusive por crianças acima de dois anos de idade.

**Figura 3.** Representação da estrutura química da Icaridina. **Fonte:** PubChem.



A eficácia da icaridina contra *Aedes aegypti* em testes humanos foi demonstrada por Boeckh et al. (1996), Klun et al. (2006) e Naucke et al. (2007). Em um estudo Miot et al. (2011) compararam a performance de quatro repelentes caseiros constituídos por: cravo, icaridina, óleo de soja e andiroba. A icaridina, utilizada a 20%, apresentou o melhor desempenho e maior proteção, no entanto pontuou-

se que ela pode provocar reações alérgicas na pele devido ao uso prolongado. Roey et al. (2014), avaliando a eficácia de repelentes em voluntários, demonstrou que tanto DEET como icaridina a 20% e 10% respectivamente, demonstraram eficácia acima de 95% em 5 horas.

Os repelentes atualmente comercializados apresentam-se em spray, gel, loção e aerossol e em seus rótulos apresentam a concentração de ativo repelente utilizado, tempo de ação e idade mínima para aplicação. Na Tabela 1 estão representados alguns dos repelentes à base de icaridina comercializados no Brasil. Podemos observar que as concentrações de icaridina, na maioria dos repelentes, se encontra entre 10% e 25%, limitando a sua aplicação em bebês menores de 6 meses e algumas com restrições de aplicação em menores de 2 anos.

**Tabela 1.** Características dos repelentes contendo icaridina disponíveis comercialmente no Brasil, concentração, idade permitida e tempo de proteção máxima.

<b>Produtos (fabricante) e forma de apresentação</b>	<b>Concentração de icaridina (%)*</b>	<b>Idade permitida</b>	<b>Tempo estimado de ação*</b>
<b>SBP Advance Repelente Spray</b>	9,98%	< 2 anos limita-se a 2 aplicações diárias.	Até 5 horas
<b>SBP Repelente Pro Spray</b>	25%	≥ 1 ano	12 horas
<b>SBP Advance Repelente Gel</b>	10,6%	≥ 6 meses	Até 5 horas
<b>OFF!® Baby</b>	10%	≥ 3 meses	até 6 horas
<b>AlergoShop- Repelente de insetos</b>	20%	≥ 6 meses	Até 7 horas
<b>Exposis Infantil Gel</b>	20%	≥ 6 meses	Até 10 horas
<b>Exposis Extremê</b>	25%	≥ 2 anos	Até 10 horas
<b>Sunlau Repelente</b>	20%	≥ 6 meses	Até 10 horas
<b>Granado – Repelente Longa duração Bebê**</b>	25%	≥ 6 meses	Até 6 horas
<b>Cutisanol – Repelente de Insetos**</b>	5,5%	≥ 6 meses	Até 6 horas

\*Informações fornecidas pelo fabricante

\*\* Repelentes disponível no mercado baseados em nanotecnologia

Embora apresentem boa atividade como repelentes estes ativos apresentam toxicidade, e que o seu uso não controlado pode aumentar o risco de reações principalmente em crianças e gestantes. O uso de repelentes baseado em nanotecnologia vem se tornando uma importante ferramenta para a obtenção de sistemas mais eficazes. (CAMPOS et al., 2020; CHARLTON et al., 2016). Nesse contexto, estudos realizados envolvendo nanotecnologia no controle de arboviroses apresentam caráter promissor no desenvolvimento de produtos eficazes, contendo menor concentrações de ativo, com longa proteção e segurança.

#### 1.4 Polímeros utilizados no desenvolvimento de nanocápsulas.

As nanocápsulas são sistemas vesiculares com diâmetro de 10 nm a 1000 nm constituídas por um invólucro polimérico contendo fármacos ou bioativos dissolvidos em um núcleo oleoso (RATA et al., 2019; SOUTO et al., 2012). Vários estudos demonstram a eficiência desta tecnologia utilizando drogas lipofílicas pelo fato de proporcionar o carreamento dessas substâncias como também conferir proteção frente à degradação, permitindo uma liberação modificada, e assim, proporcionar uma maior biodisponibilidade e reduzindo possíveis quadros de reações alérgicas e toxicidade (SCHMALTZ et al., 2005; MOSQUEIRA et al., 2000).

Na indústria farmacêutica diversos polímeros são utilizados como revestimentos para formulações, nas últimas décadas observa-se sua utilização no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados como cosméticos e medicamentos de liberação convencional e modificada, pois possuem características como alta estabilidade, baixa toxicidade, um baixo custo e alta biodegradabilidade (SILVA et al., 2018).

Os polímeros são macromoléculas formadas a partir de sequências de subunidades menores descritas como monômeros, na indústria farmacêutica são divididos em duas classes i) Polímeros Naturais como a quitosana, alginato e a dextrina ii) Polímeros Sintéticos, o PCL (Policaprolactona) e o PLGA - Poli (ácido lático-co-ácido glicólico). (VILLANOVA et al., 2010).

O PCL (policaprolactona) é um polímero hidrofóbico e biodegradável pertencente à família dos poliésteres alifáticos utilizado em diversas aplicações médicas e farmacêuticas no desenvolvimento de próteses ortopédicas como também utilizada no desenvolvimento de medicamentos com liberação controlada de fármacos. Em meios biológicos este polímero sofre degradação enzimática pela enzima lipase, a qual realiza clivagem das ligações éster do PCL gerando o ácido 6-hidroxicapróico como produto de degradação (BEZZERA et al., 2017; MALIKMAMMADOV et al., 2017).

Estudo realizado por Zanetti et al., (2019) desenvolveu nanocápsulas poliméricas de PCL contendo o composto natural geranyl cinamato, pelo método de nanoemulsificação/evaporação do solvente. O objetivo foi avaliar suas propriedades antibacterianas e obtiveram ótimos valores de eficiência de encapsulação e um retardo na liberação do bioativo, proporcionando ao sistema uma liberação prolongada com manutenção da eficácia e segurança. Em outro estudo realizado por Pereira et al., (2014) foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas de PCL encapsulando o herbicida atrazina, o qual demonstrou resultados satisfatórios em relação a estabilidade, liberação modificada e redução da genotoxicidade do herbicida após o processo de encapsulação. Com isso, a utilização de polímeros no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados mostrou ser promissora para a

encapsulação e liberação prolongada de bioativos, conferindo alta eficácia e segurança diminuindo a toxicidade destas substâncias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo os repelentes icaridina e geraniol como um sistema mais eficiente e prolongado para repelência frente ao *Aedes aegypti*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo icaridina e geraniol;
- Avaliar a estabilidade e realizar ensaio de liberação da formulação;
- Realizar Análise de viabilidade com cultura 2D;
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade das nanocápsulas contendo icaridina e geraniol.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de condições analíticas para quantificação do Icaridina e Geraniol

##### 3.1.1 Construção das curvas analíticas

Para a construção das curvas de calibração foram utilizadas soluções estoques de Geraniol e Icaridina nas concentrações de 1 µg/mL a 6 µg/mL e 10 µg/mL a 150 µg/mL respectivamente. As amostras foram preparadas em triplicata e analisadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A partir da regressão linear foram construídas a curva analítica dos compostos. Para a produção dos gráficos foi utilizado o Software OringinPro 8.0®.

##### 3.1.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores estimados do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ) foram realizadas a partir dos dados obtidos das regressões lineares das curvas analíticas e em seguida aplicados às Equações 1 e 2. (INMETRO, 2016)

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$LD = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde, **DP** é o desvio Padrão do intercepto com o eixo y e **IC** é a inclinação da curva analítica média.

#### 3.2 Desenvolvimento das nanocápsulas de PCL

No presente estudo foram desenvolvidas cinco diferentes formulações contendo PCL, Geraniol e Icaridina em diferentes concentrações, como também uma formulação sem a presença dos princípios ativos como forma de avaliar sua estabilidade físico-química. As concentrações dos reagentes utilizados em cada formulação estão descritas na Tabela 2.

As nanocápsulas foram desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação, conhecido como deslocamento de solvente, foi descrito pela primeira vez por ABDELWAHED et al., (2006). Neste método a formação das nanocápsulas deve-se à rápida difusão espontânea da solução polimérica na fase aquosa; processo regulado pelo efeito Marangoni que é regido pela diminuição da interface interfacial entre as duas fases e conseqüentemente ocorrendo o aumento da área de superfície levando à formação de pequena gotículas de solvente orgânico, que na medida que difunde-se das nanopartículas leva a precipitação do polímero e na forma de nanocápsulas ou nanoesferas (CRUCHO, et al., 2017).

Neste estudo, a fase orgânica foi constituída pelo polímero PCL (50 mg), acetona (30 mL) icaridina (100 e 300 mg), geraniol (10 e 300 mg) e triglicerídeo de ácido caprílico/capróico (100 mg). A fase aquosa foi composta pelo tensoativo polissorbato 80 (Tween® 80) (60 mg) e água deionizada (Milli-Q, Millipore) (30 mL). Posteriormente a fase orgânica foi vertida lentamente sobre a fase aquosa. A solução foi mantida sob agitação durante 30 min e posteriormente levada ao rotaevaporador. A quantidade de solvente evaporado foi substituída por água deionizada obtendo um volume final de 10mL.

**Tabela 2** Representação dos materiais utilizados e suas concentração para desenvolvimentos das formulações apresentada no estudo.

Formulações	PCL (mg)	Span 60 (mg)	Myritol (mg)	Acetona (mL)	Água Destilada (mL)	Tween 80 (mL)	Princípio Ativo (mg)
Nano_CONTROLE	50	40	100	30	30	60	0
Nano_GER3%	50	40	100	30	30	60	300
Nano_GER1%	50	40	100	30	30	60	100
Nano_ICAR3%	50	40	100	30	30	60	300
Nano_ICAR1%	50	40	100	30	30	60	100

3.3

Caracterização físico-química e estudo da estabilidade das Nanocápsulas Poliméricas.

Para avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas, foram determinadas análises de tamanho (Diâmetro hidrodinâmico), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), polidispersão (PDI), potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação em função do tempo (Zero, 15, 21, 30, 60 e 90 dias), comparando-se as formulações com e sem a presença dos princípios ativos geraniol e icaridina e suas diferentes concentrações utilizadas.

### 3.3.1 Análise de tamanho e índice de polidispersão (PDI)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) é utilizada para determinar tamanho, distribuição de tamanho de nanopartículas e o índice de polidispersão. Para estas análises as amostras foram diluídas em água deionizada e em seguida foram analisadas utilizando um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 90° luz. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.3.2 Análise de Nanopartículas por Rastreamento (Nanoparticle Tracing Analysis-NTA)

Para a realização da análise de rastreamento de nanopartículas os dados obtidos foram coletados utilizando o equipamento NanoSight LM14 (Laser verde, 532 nm) onde as imagens das

nanopartículas foram coletadas por uma câmera sCMOS utilizando o Software NanoSighth (versão 2.3). Inicialmente as formulações foram diluídas em 10000 vezes utilizando água deionizada, posteriormente com auxílio de uma seringa 1mL de cada formulação foi injetada na célula volumétrica para que iniciasse a análise das nanopartículas. Para cada amostra foram obtido um total de aproximadamente 143 partículas/frame, obtendo um total de 1951 frames. Cada análise foi constituída de cinco medições. Após as análises foram obtidos a distribuição de tamanho das partículas em função da concentração.

### 3.3.3 Potencial Zeta

Para a determinação do potencial zeta foi utilizado um analisador ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern®), as amostras foram diluídas em água deionizada (1:1000 v:v) e posteriormente inseridas em uma cubeta específica do equipamento. Os resultados obtidos foram expressos em mV com a média e desvio padrão de três determinações.

### 3.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As amostras foram submetidas à análise térmica, sob atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>), em faixa de temperatura de 25 a 300°C, com vazão de gás de 50 mL/min, com taxa de aquecimento de 10°C/min utilizando um aparelho DSC-Q20 - TA Instruments. Para DSC, as formulações foram analisadas na faixa de 0 a 300 °C, sob atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>), com vazão de gás de 50 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Foram utilizados porta amostras de alumínio e a massa de amostra variando entre 2,0 a 4,0 mg.

### 3.3.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização química dos componentes e nanocápsulas foi realizada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (Shimadzu, IRAffinity, Kyoto, Japan) operando em um intervalo de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, foram realizadas 160 varreduras com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As amostras Nano\_CONTROLE; Nano GER1%, Nano\_GER3%, Nano\_ICAR1% e Nano\_ICAR3% foram analisadas pelo método KBr. Aproximadamente 1 mg da amostra foi misturada com 200 mg de brometo de potássio (KBr) em um cadinho de ágata até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Posteriormente o pó foi levado para secagem em estufa (~70°C) durante 20 min para a remoção de possíveis umidades. Em seguida a amostra foi colocada em um suporte e submetida à prensa hidráulica para formação das pastilhas e encaminhada para

análise.

### 3.3.6 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada por cromatografia gasosa por método indireto, o qual consiste na razão entre a diferença entre a concentração de um marcador presente no óleo (CT) e a concentração livre deste marcador no sobrenadante (CL) dividido pela CT. Para determinação dos valores foi utilizado a seguinte equação 3.

$$EE (\%) = \frac{(CT-CL)}{CT} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

### 3.3.7 Microscopia Eletrônica Força Atômica (MFA)

As nanocápsulas foram analisadas por Microscopia de Força Atômica utilizando o equipamento Nanosurf EasyScan 2 AFM com objetivo de visualizar a morfologia e a distribuição de tamanho dos nanomateriais. Inicialmente 1µL da suspensão das nanocápsulas foram depositadas sobre uma superfície de silício, posteriormente as amostras foram levadas para secagem em dessecador por 48 h. Para a análise o equipamento foi operado em modo sem contato com cantilever TapAl-G (BudgetSensors, Bulgária) e voltagem de ponta de 90 Hz. A velocidade de *scan* foi proporcional ao tamanho da área de varredura e da frequência de varredura (0,6 Hz). As imagens adquiridas foram analisadas usando o software Gwyddion.

## 3.4 Ensaio de Liberação e mecanismo de liberação

O ensaio de liberação foi realizado conforme a metodologia descrita por SOTELO-BOYÁS et al., 2017, com algumas adaptações. Para este ensaio foram selecionadas as formulações Nano\_GER3% e Nano\_ICA3% na proporção 1:1 a fim de verificar o perfil de liberação do sistema nanoestruturado, assim como a aplicação de modelos matemáticos para a avaliação do mecanismo de liberação regente. O ensaio de liberação é constituído por dois compartimentos (doador e receptor) separados por uma membrana de diálise (tamanho de poro de exclusão de 1 kDa, Spectrapore). No compartimento doador foram adicionados 1 mL da formulação contendo as nanocápsulas geraniol e icaridina. O compartimento receptor é formado por uma solução de Tween 80 a 5% mantido em agitação. Alíquotas (1mL) foram coletadas periodicamente e armazenados em *vials* para a quantificação. O sistema foi mantido em compartimentos fechados para evitar possíveis perdas por evaporação. O ensaio foi realizado em temperatura de 32 °C, mimetizando a temperatura da pele, local desejado para aplicação. Para verificar o mecanismo de liberação os dados foram avaliados usando

modelos matemáticos de primeira ordem, Korsmeyer-Peppas, Hixon-Crowell e Higuchi (BRUSCHI, 2015).

### 3.5 Ensaio de viabilidade celular (Atividade Mitocondrial)

Para a realização das análises de citotoxicidade pelo método MTT foram utilizadas as linhagens celulares 3T3 (embrionárias de *Swiss* albino) e V79 (pulmonar normal de Hamster chinês). As células foram plaqueadas à uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços, as quais foram encubadas à 37 °C - 5%CO<sub>2</sub>. Após 24h as células foram expostas as formulações Nano\_CONTROLE e Nano\_Ger/Ica3% em diferentes faixas de concentrações. A exposição foi realizada pelo período de 24h com encubação à 37 °C - 5%CO<sub>2</sub> em concentrações decrescentes da solução estoque. Após o período de tratamento as nanopartículas foram removidas das culturas e as células foram lavadas com PBS, foram adicionados a cada poço 100 µL de solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) na concentração de 0,5 mg/mL e mantidos em encubação por 3h à 37°C - 5%CO<sub>2</sub>. A seguir a solução de MTT foi retirada e as células foram fixadas, adicionando-se 100 µL de DMSO por poço. A análise da viabilidade celular foi realizada utilizando o equipamento de leitura de microplacas à 540 nm.

### 3.6 Avaliação de Genotoxicidade – Ensaio Cometa

A análise do ensaio cometa foi realizado segundo a metodologia adaptada de Singh, et al., (1988) e Collins (2004). Para esta análise foram utilizadas as linhagens celulares 3T3 (embrionárias de *Swiss* albino) e V79 (pulmonares normais de Hamster chinês) que foram expostas as nanopartículas contendo geraniol e icaridina (1:1) nas concentrações 0,005; 0,01 e 0,02 mg/mL. As células foram expostas por um período de 1 h, após a exposição, as células foram homogeneizadas em agarose *low melting* 0,8% e espalhadas em lâminas preparadas anteriormente com agarose 1,5%. Após montagem, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise por 1 h, seguida de neutralização. Posteriormente, as lâminas foram mantidas em tampão de eletroforese a 4 °C por 20 minutos seguido de corrida por 20 minutos, 1,6 V cm<sup>-1</sup>. Ao final da eletroforese, as lâminas foram secas, fixadas e coradas com solução de prata. As análises foram realizadas em microscópio ótico (40x) sendo consideradas aproximadamente 100 células por lâmina seguindo critério de score visual proposto por Collin et al., (1994). O Índice de danos (ID) de cada tratamento foi calculado dividindo-se o score de cada lâmina pelo número de células analisadas (COLLINS et al., 1997; TICE et al., 2000; COLLINS et al., 2004).

### 3.7 Análise Estatística

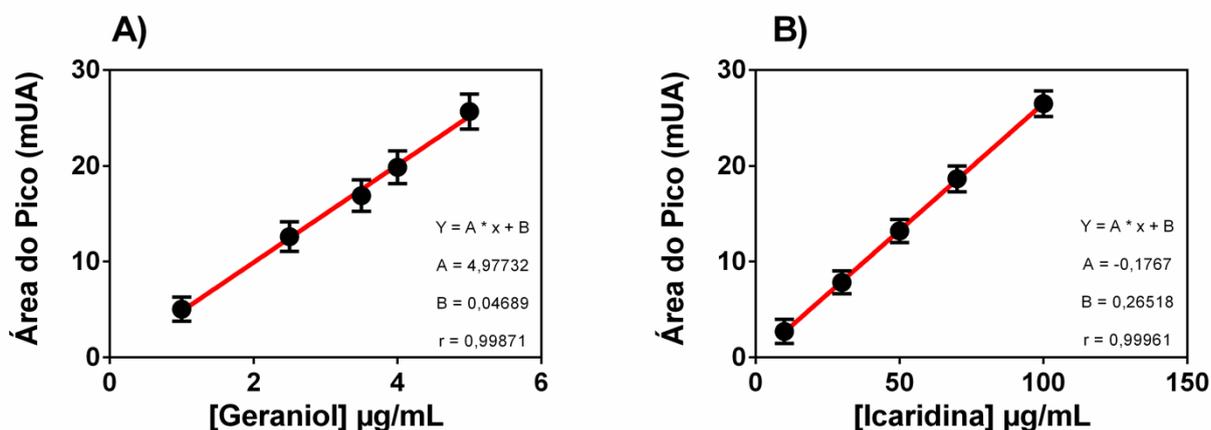
Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados em média e desvio padrão utilizando o software *Origin 8.0*. As análises foram submetidas à análise de variância (ANOVA-One way); para a comparação das médias entre as formulações e o controle (NanoCONTROLE) também foi aplicado o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para as análises de viabilidade celular foi utilizado o software *GradPad Prism 8.0.1*.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Curvas analíticas para quantificação dos ativos

A quantificação de ativos pode ser realizada por meio de cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou determinação eletroquímica (LIU; WHU, 2011). A Figura 4 apresenta a média de três curvas analíticas realizada de diferentes concentrações dos ativos Geraniol e Icaridina. Os coeficientes de correlação da curva analítica média apresentaram valores de  $r^2 = 0,99871$  referente ao Geraniol e  $r^2 = 0,99961$  para a Icaridina demonstrando a linearidade do método. Segundo a RDC 166/2017 é desejável que o coeficiente de correlação deve apresentar valores acima de 0,990 e mais próximo de 1, o que significa uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais.

**Figura 4.** Curvas analíticas obtidas. Em A) Geraniol e B) Icaridina. As análises foram realizadas em triplicata ( $n=9$ ).



#### 4.1.1 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Geraniol e Icaridina

Os limites de detecção e quantificação do Geraniol e Icaridina (Tabela 3) foram obtidos através das regressões lineares das curvas analíticas as quais foram aplicados às Equações 1 e 2. Através desses resultados conclui-se que os dados obtidos foram considerados satisfatórios, uma vez que os valores estão de acordo com os preconizados pela RDC 116/2007.

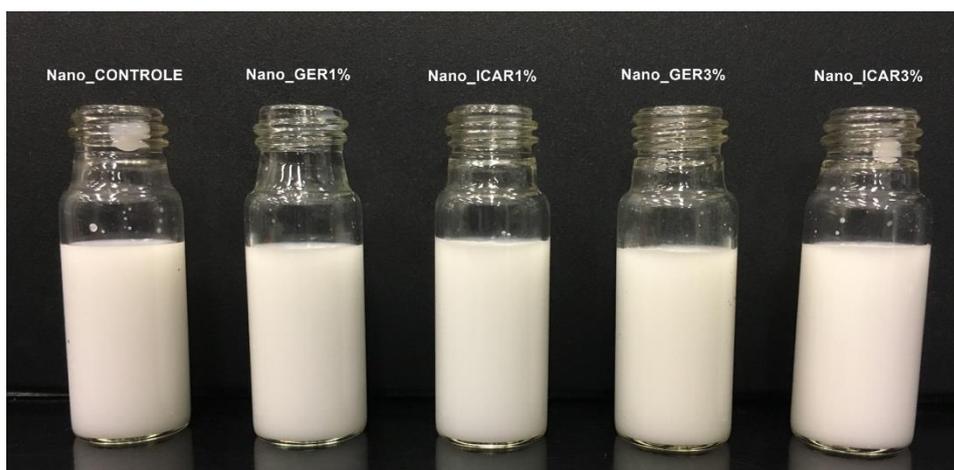
**Tabela 3.** Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) dos métodos analíticos dos Geraniol e Icaridina

Detecção	GERANIOL	ICARIDINA
Limite de Detecção ( $\mu\text{g/mL}$ )	$0,39 \pm 0,02$	$2,35 \pm 0,86$
Limite de Quantificação ( $\mu\text{g/mL}$ )	$1,30 \pm 0,32$	$7,83 \pm 1,65$

#### 4.2 Aspecto e pH das Formulações

As formulações desenvolvidas foram obtidas como suspensões coloidais apresentando um aspecto branco leitosos característicos das nanocápsulas poliméricas (Figura 5). As formulações apresentaram uma excelente estabilidade físico-química e nenhuma alteração macroscópica como sedimentação ou floculação foram identificadas. O aspecto líquido e leitoso já esperado para a formulação desenvolvida garante uma fácil aplicação tópica uma vez que não é necessária força para espalhabilidade.

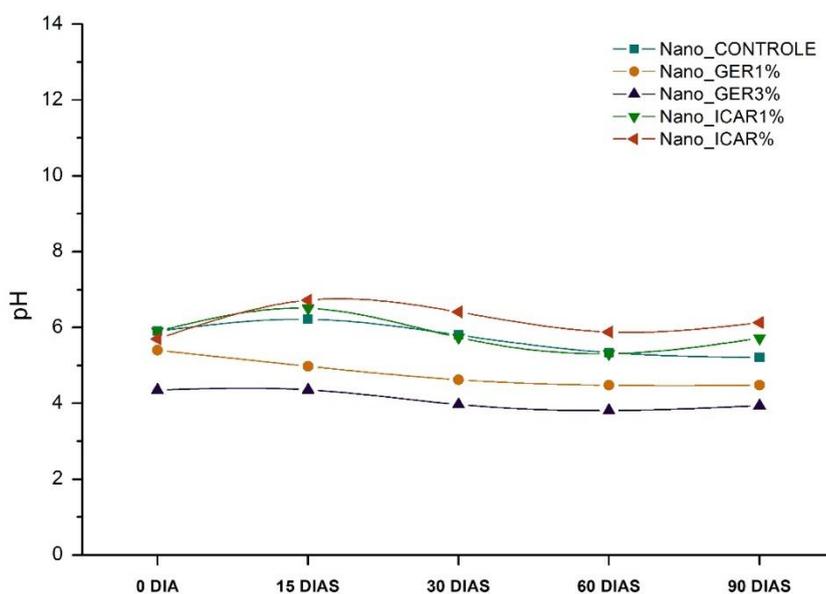
**Figura 5.** Aspecto macroscópico das formulações da nanocápsulas poliméricas Nano\_CONTROLE; Nano\_GER1%; Nano\_ICAR1%; Nano\_GER3% e Nano\_ICAR3%. **Fonte:** Própria.



O pH das suspensões de nanocápsulas poliméricas foi analisado no decorrer de 90 dias utilizando-se um pHmetro (OHAUS Starter3100) previamente calibrado com soluções tampão em pH 7,0 e 4,0. A análise do pH é um parâmetro muito importante para a avaliar a estabilidade e futura aplicação da formulação desenvolvida. A Figura 6 apresenta os valores de pH das formulações desenvolvidas em função do tempo.

De acordo com os resultados obtidos é possível observar que durante o período definido para avaliação o pH das formulações permaneceram entre 4,3 e 5,9 até o período de 90 dias. O pH da pele humana possui um caráter levemente ácido, entre 4,6 e 5,8 necessários para a manutenção da função de barreira física e química, como também é fundamental para evitar a perda de água transepidermica e na hidratação do estrato córneo (ELBAN et al., 2020).

**Figura 6 .** Perfil do pH das nanocápsulas poliméricas de PCL contendo Geraniol e Icaridina (0, 15, 30, 60 dias e 90 dias). Nano\_CONTROLE; Nano\_GER1% – Nanocápsulas contendo 1% de geraniol; Nano\_GER3% – Nanocápsulas contendo 3% de geraniol; Nano\_ICAR1% Nanocápsulas contendo 1% de icaridina; Nano\_ICAR3% - Nanocápsulas contendo 3% de icaridina.



Em um estudo realizado por SOUZA et al., (2012), onde foram desenvolvidos e avaliados o pH de nanocápsulas poliméricas de PCL contendo herbicidas, foram apresentados valores entre 4,8 e 5,6 durante um ensaio de estabilidade (0 e 30 dias) corroborando com os resultados obtidos das formulações desenvolvidas neste estudo. Variações elevadas do pH pode influenciar na estabilidade, como também, pode ser indicativos de presença de reações químicas ou crescimento bacteriano, os quais podem comprometer a qualidade e eficácia da formulação (DURÁN-LOBATO et al., 2015; SCHMID-WENDTNER et al., 2006).

Diante do resultado obtido é possível relatar que o sistema de nanocápsulas contendo geraniol e icaridina possuem uma positiva estabilidade do pH, conferindo a formulação proteção frente a contaminações antimicrobianas e conferindo aos ativos uma maior proteção uma vez que não estejam sendo liberadas no período de acondicionamento.

#### 4.3 Diâmetro Médio das Partículas (DLS) e Índice de Polidispersão (PDI)

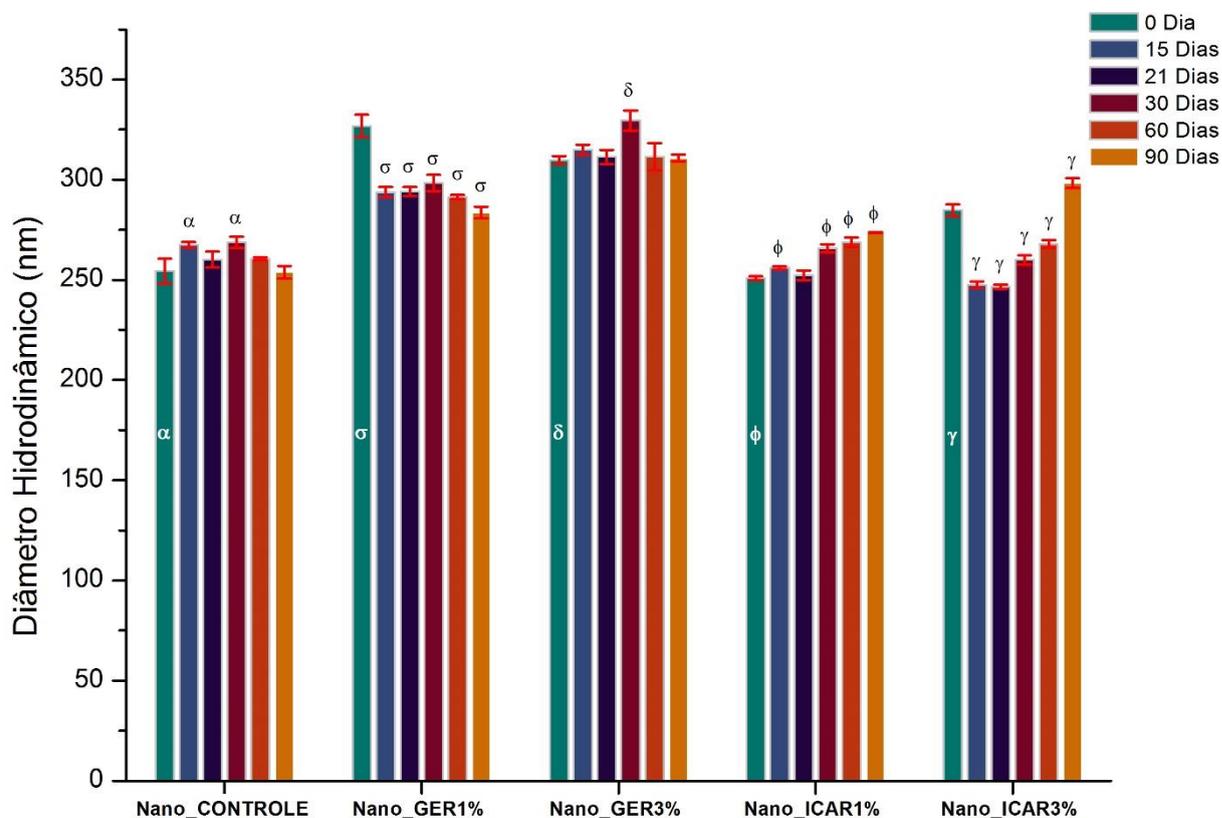
Os valores de diâmetro e o índice de polidispersão são parâmetros importantes no desenvolvimento de nanopartículas para aplicação tópica, uma vez que esta propriedade rege a penetração ou retenção das partículas nanestruturadas nas camadas da pele. Durante o desenvolvimento estes parâmetros podem sofrer variações pela influência do pH, solubilidade do

princípio ativo, concentração do tensoativo, concentração de polímero e das técnicas de desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados, assim podendo alcançar tamanhos desejados de nanopartículas destinados ao local de interesse (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; FONTANIVE, 2014).

Os valores do diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas estão representados na Figura 7. Observa-se que todas as nanopartículas apresentaram um tamanho inicial próximos a 300 nm, justificando uma positiva reprodutibilidade no processo de desenvolvimento. Algumas formulações apresentaram variação significativa no seu diâmetro durante o período de armazenamento. A formulação Nano\_Sem ativo mostrou uma variação aos 15 dias de armazenamento, contudo se no período de 90 dias a mesma não apresentou uma variação significativa. Resultado similar foi encontrado na formulação Nano\_GER3%, a qual durante 30 dias de armazenamento houve um aumento significativo em relação ao tempo 0, contudo não foi observado aos 90 dias. Esses resultados não necessariamente demonstra uma estabilidade do sistema, uma vez que, a técnica de DLS que realiza a análise através do movimento browniano das partículas, da camada de hidratação e da adsorção dos agentes tensoativos podem expressar uma variação no tamanho das partículas analisadas (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

A formulação Nano\_GER1% apresentou um valor inicial de  $326 \pm 5,6$  nm com uma diminuição desse valor com o passar do tempo de armazenamento. Esse resultado pode estar relacionado à degradação da parede polimérica da nanocápsula, assim ocasionando o decréscimo no tamanho da nanopartícula. Porém ao associar os resultados dos valores dos diâmetros hidrodinâmicos com os valores de eficiência de encapsulação é possível observar a permanência da incorporação do ativo. Comportamento semelhante ao descrito anteriormente foi verificado na amostra Nano\_ICA3% que apresentou um diâmetro inicial de  $284 \pm 3$  nm e  $298 \pm 2,4$  nm no período de 90 dias, entretanto nos períodos 15, 21, 30 e 60 houve uma diminuição significativa em relação ao dia 0 (0 Dia), o qual pode estar relacionado a eventos de degradação do polímero e/ou liberação do ativo.

**Figura 7.** Diâmetro hidrodinâmico (tamanho) e Índice de Polidispersão (PDI) das Nanocápsulas Poliméricas contendo Geraniol e Icaridina em função do tempo (90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de  $p < 0,05$  (One Way ANOVA – Tukey) para a análise de variância dos Tempos (15, 21, 30, 60 e 90 dias) em relação ao Tempo 0. Símbolos iguais representam variação significativa.



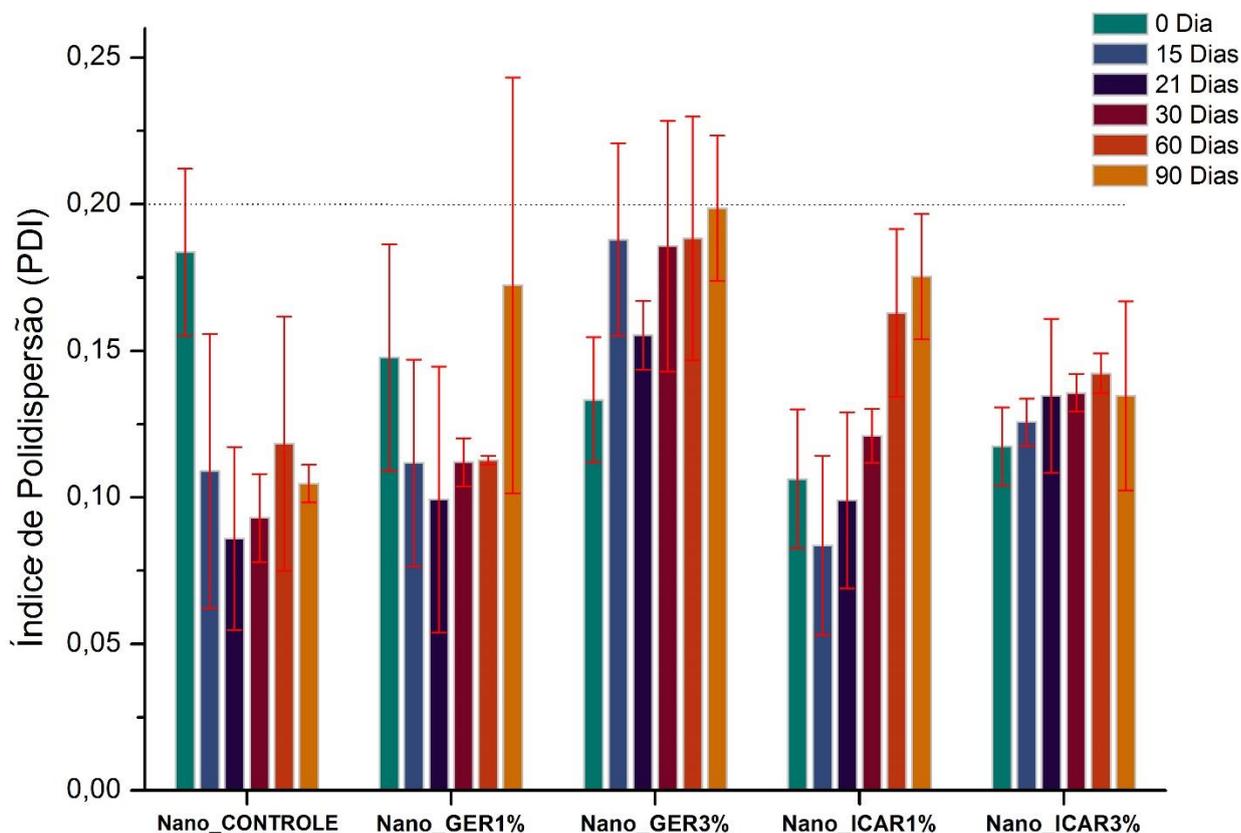
No decorrer do período da análise de estabilidade as nanopartículas apresentaram valores de diâmetro entre 260 a 314 nm. Os valores conferiram as formulações uma boa estabilidade, destacando a amostra Nano\_GER3%. Com esta análise podemos concluir que os sistemas nanoestruturados apresentaram tamanhos desejáveis à aplicação tópica sendo este parâmetro muito importante para a permanência de nanopartículas na epiderme onde partículas que possuem valores  $< 100$  nm tem uma maior possibilidade de atingir camadas mais profundas da pele (LIANG et al., 2013).

A figura 8 apresenta os valores de índice de polidispersão (PDI) para as nanocápsulas em função do tempo. A caracterização da polidispersividade é fundamental na avaliação físico-química de nanopartículas com o objetivo de verificar a uniformidade média da solução. Além de indicar a distribuição do tamanho de partículas, o valor de PDI pode sugerir se há agregação entre elas (CLAYTON et al., 2016).

Observa-se que todas as formulações desenvolvidas apresentaram um valor de PDI inferior a 0,2 durante o período de 90 dias. Segundo Danaei et al. (2018); valores de PDI abaixo de 0,2 são consideráveis aceitável em nanopartículas poliméricas, esse configura uma população homogênea

e/ou monodispersa o qual confere a formulação uma maior estabilidade descartando a possibilidade de agregação de partículas.

**Figura 8.** Resultados das determinações do índice de polidispersibilidade (PDI) das das Nanocápsulas Poliméricas contendo Geraniol e Icaridina em função do tempo 0 à 90 dias. As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).

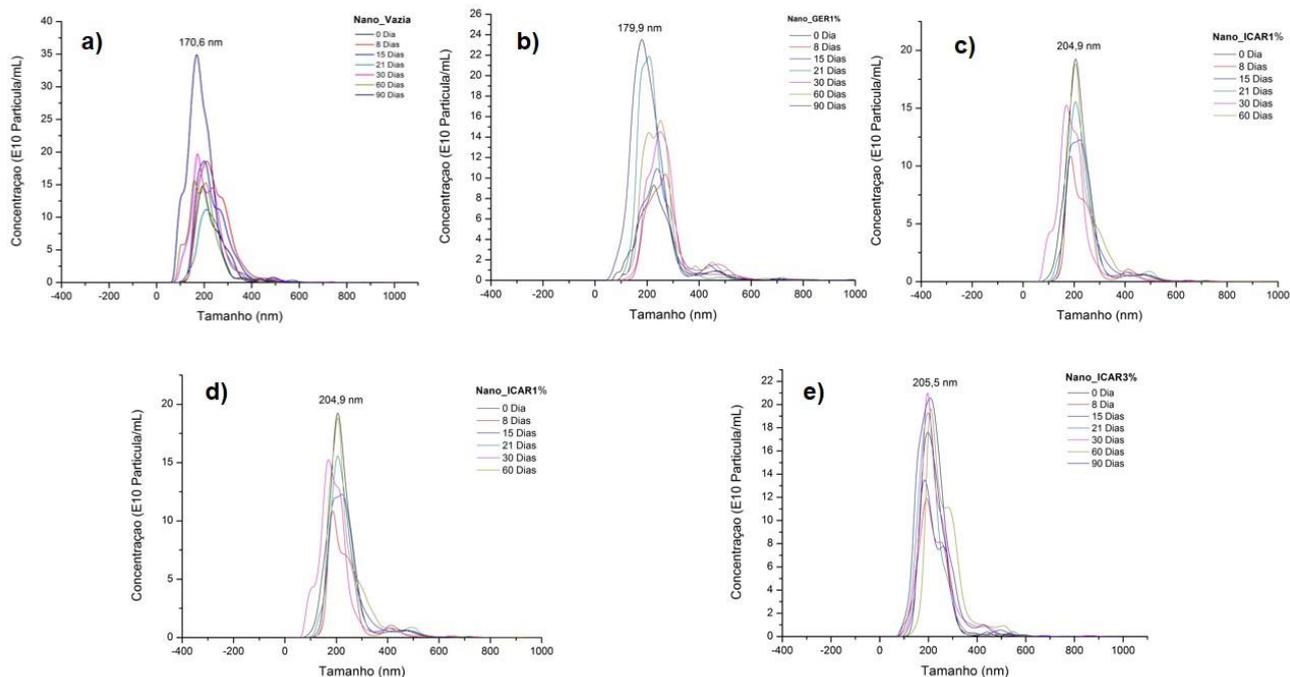


#### 4.4 Análise de distribuição tamanho pela técnica de Rastreamento de Nanopartículas - NTA

A técnica de NTA foi utilizada para determinação da distribuição e tamanho de nanopartículas. A técnica de rastreamento de nanopartículas se baseia no uso de microscopia acoplada com laser a qual permite a análise do movimento Browniano das nanopartículas em tempo real.

Os valores apresentados na Figura 9 representam o tamanho médio das nanocápsulas e a concentração de partículas em função do tempo (0, 8, 15, 21, 30, 60 e 90 dias) de cada formulação desenvolvida. Para a formulação **a)** Nano sem ativos foi obtido no tempo inicial (0) um diâmetro hidrodinâmico  $196 \pm 5$  nm e uma concentração de  $1,6 \times 10^{13} \pm 5,37 \times 10^{11}$  partículas/mL. Para as formulações Nano\_GER1% (**b)** e Nano\_GER3% (**c)** as partículas apresentaram  $220 \pm 12$  nm e  $184 \pm 7$  nm e com as concentrações de  $1,39 \times 10^{13} \pm 6,4 \times 10^{11}$  partículas/mL e  $9,8 \times 10^{12} \pm 1,1 \times 10^{12}$  partículas/mL respectivamente. As formulações contendo o bioativo icaridina Nano\_ICAR1% (**d)** e Nano\_ICAR3% (**e)** apresentaram no tempo inicial (zero) diâmetros hidrodinâmicos  $184 \pm 5$  nm e  $205,4 \pm 7$  nm e  $1,9 \times 10^{13} \pm 9,7 \times 10^{11}$  partículas/mL e  $1,9 \times 10^{13} \pm 1,4 \times 10^{12}$  partículas/mL respectivamente.

**Figura 9.** Distribuição de tamanho das partículas em função da concentração e tempo (0, 8, 15, 21, 30, 60 e 90 dias) das formulação **a)** Nano\_CONTROLE **b)** Nano\_GER1% **c)** Nano\_GER3% **d)** Nano\_ICAR1% e **e)** Nano\_ICAR3% utilizando a Análise de Rastreamento de Partículas –NTA.



O resultado apresentado na Tabela 4 mostra que no período de 90 dias a amostra Nano\_CONTROLE apresentou diâmetro médio de  $165,6 \pm 4,6$  nm e uma concentração de  $4,10 \times 10^{13} \pm 8,99 \times 10^{11}$  partículas/mL; para as formulações Nano\_GER1% e Nano\_GER3% após o período de 90 dias apresentaram diâmetro médio de  $178 \pm 8$  nm;  $192 \pm 3$  nm e concentrações de  $3,2 \times 10^{13} \pm 3,74 \times 10^{11}$  partículas/mL e  $1,3 \times 10^{13} \pm 3,6 \times 10^{11}$  partículas/mL, respectivamente. A amostra Nano\_ICAR1% apresentou no tempo 90 dias diâmetro médio de  $178,1 \pm 8,4$  nm e concentração  $2,6 \times 10^{13} \pm 8 \times 10^{11}$  partículas/mL, já a formulação Nano\_ICAR3% apresentou valor de diâmetro médio de  $206 \pm 9$  nm e concentração de  $2,8 \times 10^{13} \pm 3 \times 10^{11}$  partículas/mL.

**Tabela 4.** Resultados do diâmetro médio e concentração em função do tempo 0 e 90 dias das amostras Nano\_Sem ativo; Nano\_GER1%; Nano\_GER3%; Nano\_ICAR1% e Nano\_ICAR3% pela técnica de Rastreamento De Nanopartículas –NTA.

Formulações	Tempo Inicial (Zero)		90 Dias	
	Diâmetro médio (nm)	Concentração (Partículas/mL)	Diâmetro médio (nm)	Concentração (Partículas/mL)
Nano_CONTROLE	196 ± 5	1,6 x10 <sup>13</sup> ± 5,3x10 <sup>11</sup>	166 ± 5	4,1 x10 <sup>13</sup> ± 8,9 x 10 <sup>11</sup>
Nano_GER1%	220 ± 12	1,3 x 10 <sup>13</sup> ± 6,4 x 10 <sup>11</sup>	179 ± 8	3,2 x 10 <sup>13</sup> ± 3,7 x 10 <sup>11</sup>
Nano_GER3%	184 ± 7	9,8 x 10 <sup>12</sup> ± 1,1 x 10 <sup>12</sup>	192 ± 3	1,3 x 10 <sup>13</sup> ± 3,6 x 10 <sup>11</sup>
Nano_ICAR1%	184 ± 5	1,9 x 10 <sup>13</sup> ± 9,7x10 <sup>11</sup>	178 ± 8	2,6 x 10 <sup>13</sup> ± 8 x 10 <sup>11</sup>
Nano_ICAR3%	205,4 ± 7,8	1,9 x 10 <sup>13</sup> ± 1,4 x 10 <sup>12</sup>	207 ± 9	2,8 x 10 <sup>13</sup> ± 3 x 10 <sup>11</sup>

Os resultados obtidos demonstraram que as formulações desenvolvidas apresentaram valores menores em comparação aos obtidos através da técnica de DLS. Segundo Filipe et al., (2010) essa diferença nos valores pode ser explicada devido as distribuições de tamanho no DLS consistirem de distribuições de massa ao contrário dos valores obtidos por NTA o qual consistem em distribuições numéricas. De acordo com um estudo realizado por Maruyama et al. (2016) a ligeira diferença de valores obtidos entre estas técnicas pode estar associadas ao processo de análise por NTA a qual as amostras sofrem uma maior diluição do que a utilizada no DLS, conseqüentemente essa diluição pode causar a ruptura de agregados resultando em valores médio de distribuição de partículas ligeiramente menores daquelas obtidas pela técnica de DLS. Em relação a concentração das formulações analisadas se pode observar que durante o período de estabilidade analisadas todas as formulações apresentaram discretas variações não significativas.

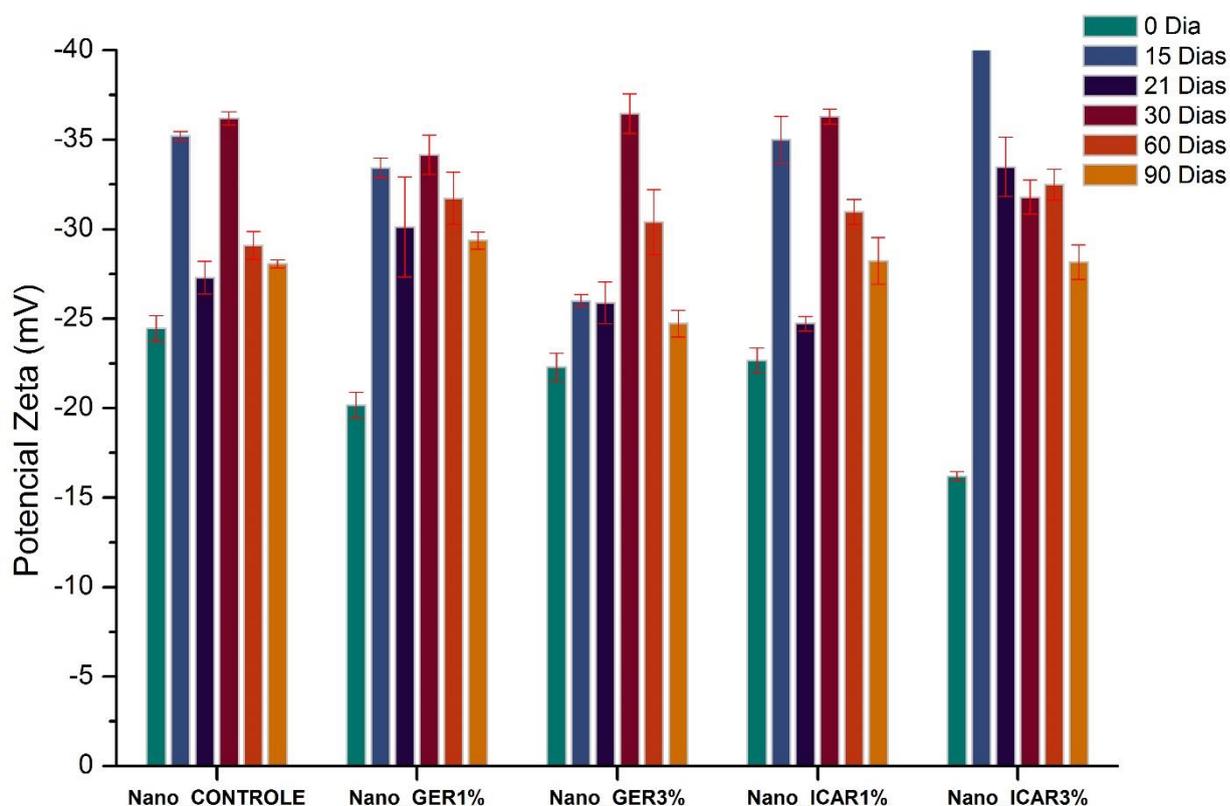
#### 4.5 Potencial Zeta

O potencial zeta tem como objetivo medir a magnitude da interações repulsivas entre as partículas; paralelamente é uma ferramenta para avaliar a estabilidade de suspensões, quanto maior do potencial zeta maior a estabilidade. Partículas com alto potencial zeta tendem a apresentar menos chances de agregação devido conferirem uma alta repulsão das cargas elétricas (MEHNERT; MÄDER. 2012).

A Figura 10 mostra os valores de potencial zeta das formulações nanocápsulas contendo geraniol e icaridina as quais apresentaram carga superficial negativa variando entre -25 mV e -36 mV em função do tempo. Suspensões que apresentam um alto valor de potencial zeta, preferivelmente próximos à (+/-) 30mV tendem a serem mais estáveis, estes valores conferem uma maior tendência

de repulsão das partículas evitando eventos como agregação e floculação (ZETASIZER, 2005).

**Figura 10.** Valores de Potencial Zeta (mV) para as Nanocápsulas Poliméricas contendo e não contendo os Geraniol e Icaridina em função do tempo (0, 15, 21, 30, 60 dias e 90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).



Os valores negativos de potencial zeta apresentados estão relacionados ao polímero PCL e aos tensoativos que constituem as formulações. O potencial zeta está associado com as propriedades de superfície das nanopartículas, nos quais valores negativos estão associados a dissociações dos grupos carboxílicos terminais presentes no polímero PCL (ABRIATA, et al. 2019; MORA-HUERTAS, et al. 2012). Um alto valor - seja ele negativo ou positivo - de potencial é muito importante na estabilidade físico-química da formulação nanoemulsionada, devido as altas forças repulsivas tenderem a evitar agregação das nanopartículas assim proporcionando uma melhor estabilidade do sistema (SONVICO et al. 2006).

#### 4.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

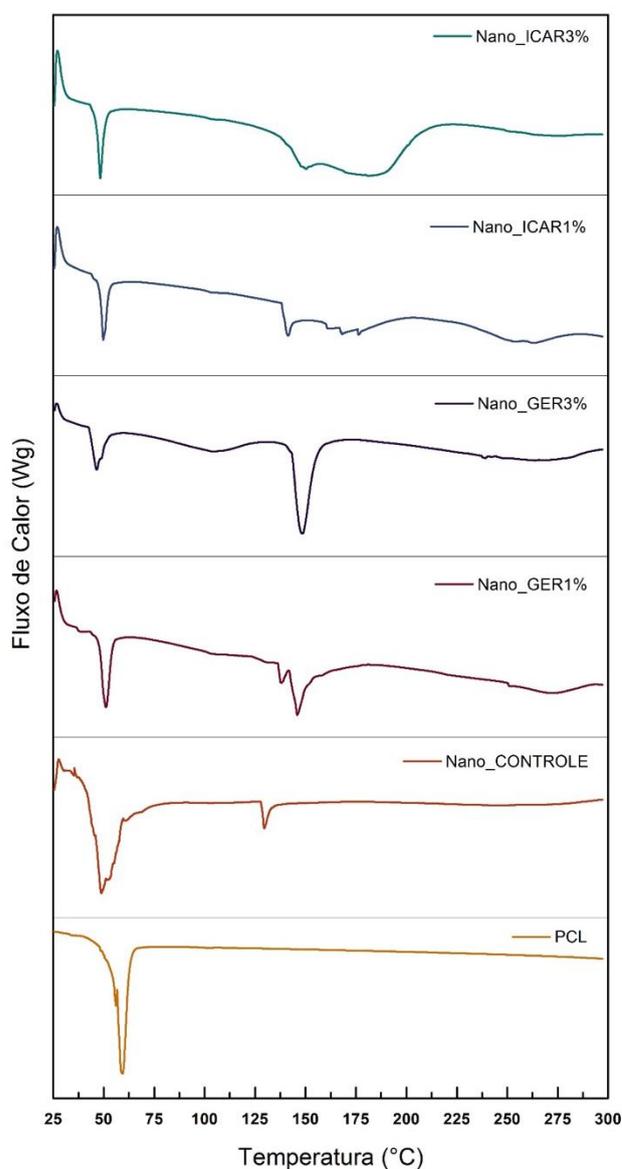
Com o propósito de se observar as possíveis interações e estabilidade térmica dos bioativos e a matriz poliméricas das nanopartículas, foi realizada a análise calorimétrica através da técnica de DSC tem utilizadas no estudos de interações intermoleculares e estudo de pré-formulação.

Os valores dos picos de fusão e energia de entalpia estão representados na Figura 9 e na Tabela 5. A realização da análise calorimétrica por DSC pode nos mostrar informações sobre a cristalinidade

e possíveis interações entre os componentes presente na formulação. Foram realizadas análise do polímero PCL, das nanocápsulas CONTROLEs como também dos sistemas nanoestruturados contendo Geraniol e Icaridina em diferentes concentrações (1% e 3%).

Diante da análise pode-se observar na Figura 11 das formulações desenvolvidas. O perfil da curva do polímero PCL apresentou um pico estreito endotérmico em 59 °C, representando o ponto de fusão do polímero e assim corroborando a sua cristalinidade. Por se tratar de um polímero termoplástico o PCL possui um baixo índice de fusão, tendo seu início em aproximadamente 50 °C e 55 °C (SALVEKAR et al. 2015).

**Figura 11.** Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para: Nano\_CONTROLE; Nano\_GER1%; Nano\_GER3%; Nano\_ICA1%; Nano\_ICA3% e PCL.



Os valores dos energia de entalpia (Tabela 5) mostra uma diminuição do valor na entalpia de fusão das demais amostras em relação à amostra Nano\_CONTROLE. Esse resultado pode estar relacionado à diminuição da cristalinidade a medida do encapsulamento dos ativos geraniol e icaridina. Este efeito pode estar relacionado a uma diminuição da compatibilidade do polímero PCL com os ativos encapsulados, sugerindo a formação do invólucro polimérico corroborando com a formação de um núcleo oleoso delimitado.

**Tabela 5.** Parâmetros obtidos dos termogramas das amostras Nano\_CONTROLE; Nano\_GER1%; Nano\_GER3%; Nano\_ICAR1% e Nano\_ICAR3% obtido por DSC.  $\Delta H_{fus}$  = Entalpia de Fusão.

	<i>Tonset</i> / °C	<i>Tpico</i> <sup>1</sup> / °C	$\Delta H_{fus}/J\ g^{-1}$	<i>Tonset</i> / °C	<i>Tpico</i> <sup>2</sup> / °C	$\Delta H_{fus}/J\ g^{-1}$
<b>Nano_CONTROLE</b>	47,83	59,16	93,7	127,07	128,15	7,744
<b>Nano_GER1%</b>	46,41	49,6	10,36	141,79	144,36	7,535
<b>Nano_GER3%</b>	41,75	45,05	8,832	141,71	146,89	30,32
<b>Nano_ICAR1%</b>	46,68	48,29	5,94	136,84	139,65	2,56
<b>Nano_ICAR3%</b>	44,88	46,86	8,771	141,86	146,13	4,103

A formulação Nano\_CONTROLE apresentou um pico endotérmico em aproximadamente 48 °C, este correspondente a temperatura de fusão do polímero PCL; um segundo pico com uma intensidade mínima foi detectado em aproximadamente 129 °C, este pico pode estar relacionado a presença do tensoativo Span 60 utilizado no desenvolvimento das formulações (HASHIM et al., 2018). As formulações contendo o bioativo Icaridina apresentaram pico endotérmicos em 49,6°C e 139°C para a formulação Nano\_ICAR1% e picos em 46,8 °C e 146,1°C referente a amostra Nano\_ICAR3%; o primeiro pico está relacionado ao ponto de fusão do polímero PCL, já o segundo pico ao tensoativo Span 60; porém a presença do terceiro pico mais largo pode está relacionado ao bioativo Icaridina. Contudo os intervalos de temperatura do polímero PCL e dos bioativos nas diferentes concentrações polímero, indicando a incorporação do óleo frente a matriz polimérica.

Em estudo Lee et al. (2017) desenvolveu nanocápsulas utilizando o polímero PCL na encapsulação da pilocarpina observou pico característico do polímero em ~ 59 °C e para a análise do sistema nanoestruturado aproximadamente 198° C, pico referente ao fármaco, assim se pode destacar que o pico obtido se refere há desestruturação e fragmentação do grupo éster do polímero. Resultados de DSC obtidos por Zanetti et al. (2019) na encapsulação cinamato de geraniol sugerem que a diminuição da entalpia de fusão de sistemas nanoestruturados promovem a presença de ligação física entre as moléculas de éster e as matrizes de PCL.

A presença de um segundo evento endotérmico estão relacionados aos óleos geraniol e

icaridina, esses valores podem estar associados ao processo de nanoencapsulação o qual promoveu uma melhoria das propriedades térmicas dos bioativos. Em análise Santos et al., (2015) realizou uma análise calorimétrica do complexo  $\beta$ -Ciclodextrina incorporando o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* o qual possui o geraniol como componente majoritário obteve um pico endotérmico em 152°C referente ao ponto de decomposição do óleo após a inclusão. Os valores de temperaturas obtidos dos sistemas nanoestruturados conferiram uma maior estabilidade térmica aos bioativos geraniol e icaridina, assim indicando a incorporação desses bioativos na matriz polimérica.

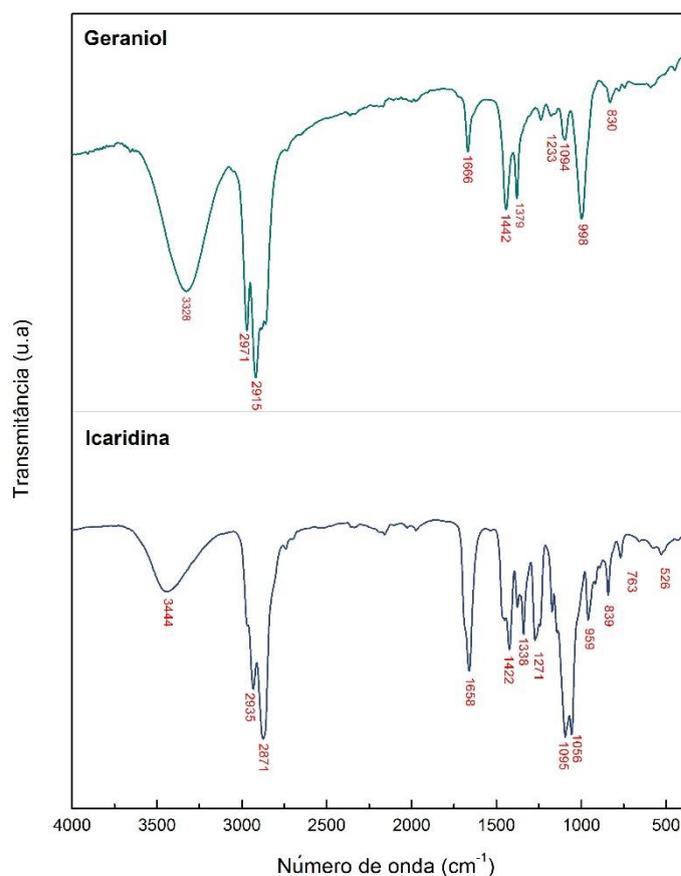
#### 4.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR foi realizada visando a caracterização de possíveis modificações e interações químicas ocorrida na estrutura das nanocápsulas contendo geraniol e icaridina. Para esta análise foram coletados espectros na região do infravermelho – FTIR para os bioativos geraniol e icaridina (Figura 12); como também foram realizadas analisadas os espectros da nanoformulações Nano\_CONTROLE; Nano\_ICAR (3 e 1%) e Nano\_GER (1 e 3%) representados na Figura 13.

A Figura 12 apresenta os espectros dos bioativos Geraniol e Icaridina. O bioativo geraniol apresentou bandas específicas em 3326  $\text{cm}^{-1}$ , esta correspondente ao grupamento O-H, regiões encontradas em 2967 e 2916  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas as vibrações de estiramento de C-H pertencente ao grupo alceno presente na estrutura do bioativo, outras banda analisada apresentou-se na região de 1669  $\text{cm}^{-1}$  referente as vibrações específicas de ligações C=C, e uma banda característica em 1010  $\text{cm}^{-1}$  as ligações C-O.

Espectros semelhantes foram obtidos por Songkro et al., (2012) ao realizar análise de FTIR no óleo de citronela, o qual possui o geraniol como constituinte majoritário, assim corroborando com a pureza e identificação do bioativo utilizado no desenvolvimento das formulações. Para a Icaridina foram observados espectros na região de 3450  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento do grupo OH e em 2938  $\text{cm}^{-1}$  identificou-se uma banda característica do grupamento alquila e por volta da região de 1667  $\text{cm}^{-1}$  foi observado um pico referente a deformação angular de C-O.

**Figura 12.** . Espectros de infravermelho para os bioativos Geraniol e Icaridina. Os espectros foram obtidos através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando KBr, na faixa de frequência de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

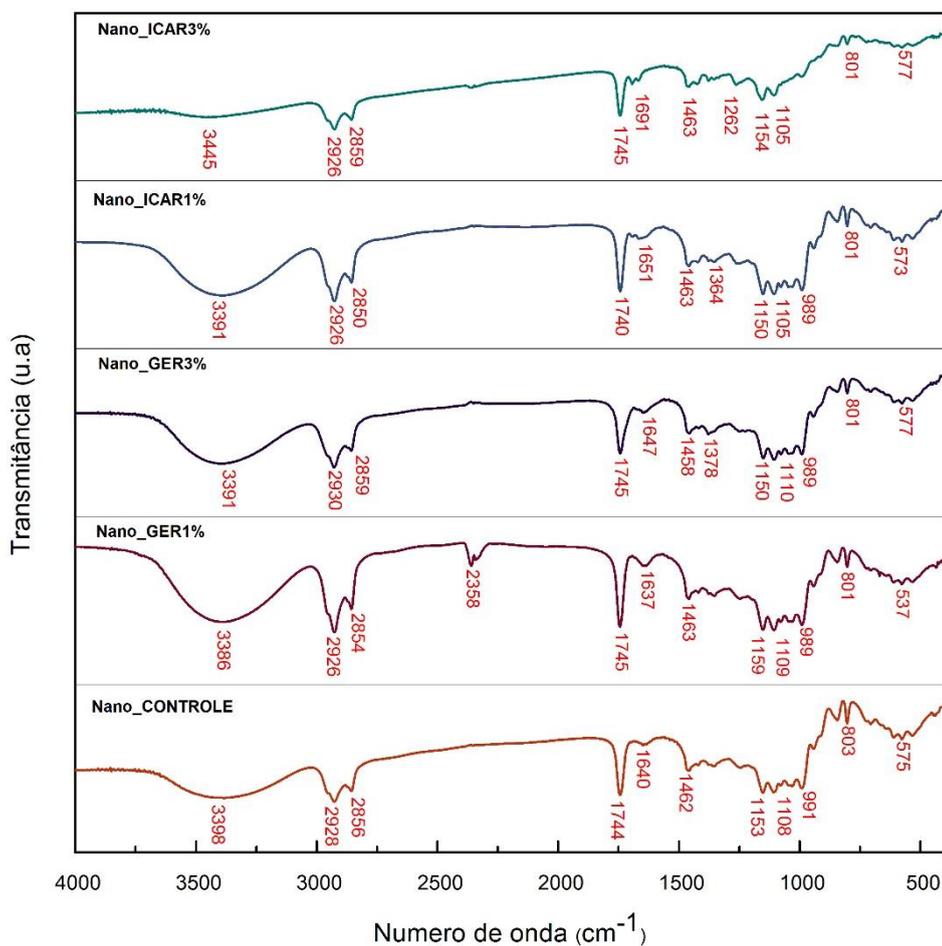


Na Figura 13 estão representados os espectros das nanopartículas contendo os bioativos Geraniol e Icaridina. Ao analisar a formulação Nano\_CONTROLÉ pode-se observar a presença de bandas específicas  $3398 \text{ cm}^{-1}$  referente grupo funcional O-H atribuído a umidade presente nas formulações maioritariamente composta por água; bandas em  $2928$  e  $2856 \text{ cm}^{-1}$  atribuídas deformação axial assimétrica e simétrica de C-H do grupo  $\text{CH}_2$ . Pode-se observa no espectro da amostra a banda  $1744 \text{ cm}^{-1}$  a qual representa a vibração de estiramento do grupo C=O de amidas, bandas apresentadas em  $1462 \text{ cm}^{-1}$  referente a deformação angular do grupo  $\text{CH}_2$ . As bandas elucidadas são referentes ao polímero PCL, o qual é componente majoritário na formulação desenvolvida.

Os espectros obtidos a partir da análise das nanocápsulas desenvolvidas representados na Figura 11 corroboram um estudo desenvolvido por Catauro et al. (2016) o qual elucida as bandas obtidas do polímero PCL. Pode-se observar que os demais espctros obtidos das nanoformulações contendo os bioativos geraniol e icaridina apresentaram bandas semelhantes daquela obtida da formulação Nano\_CONTROLÉ. Este resultado pode demonstrar que os espectros dos biotivos sofreram sobreposição das bandas característica do PCL o qual pode estar associado as bandas características da icaridina e geraniol apresentarem espectros proximos da região de absorção do

polímero outro ponto que podemos destacar é quantidade do polímero PCL no desenvolvimento das nanocápsulas, assim demonstrando espectros e bandas semelhantes em todas as formulações.

**Figura 13.** Espectros de infravermelho para as formulações – Nano\_CONTROLE; – Nano\_GER1%; – Nano\_GER3%; – Nano\_ICAR1% e – Nano\_ICAR3%. Os espectros foram obtidos através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando KBr, na faixa de frequência de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$

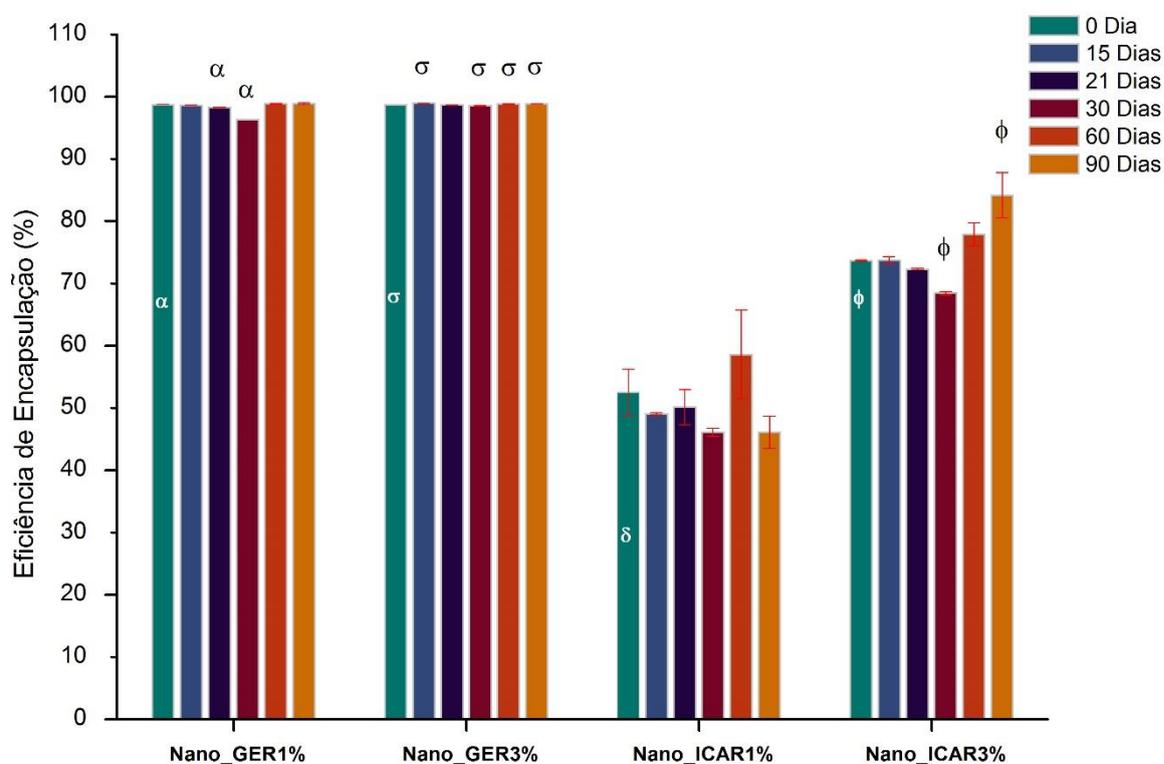


Um estudo realizado por Freire et al., (2017) o qual foram desenvolvidas nanopartículas contendo óleo de citronela, foi observado que os espectros deste ativo apresentaram a mesma bandas que o polímero utilizado, com isso é possível concluir a incorporação do óleo pois este evento determina que não houve um interação química entre os compostos, descartando a possibilidade de perda do princípio ativo utilizado. Resultados semelhantes foram obtidos com as nanopartículas poliméricas contendo geraniol e icaridina, os quais diante da observação dos espectros podemos sugerir que não ocorreu interação ou surgimento de novos grupos, com isso podemos concluir que houve a encapsulação destes ativos.

#### 4.8 Eficiência de Encapsulação

Na preparação de nanopartículas de PCL contendo Geraniol e Icaridina foi possível calcular a eficiência de encapsulação para cada formulação. Representado na Figura 14 os sistemas nanoemulsionados Nano\_GER1% e Nano\_GER3% apresentaram uma eficiência de encapsulação de  $98,7\% \pm 0,01$  e  $98,7\% \pm 0,004$  respectivamente. Já as nanocápsulas de PCL com Icaridina apresentaram valores de  $52,5 \pm 3,7$  para formulação Nano\_ICAR1% e a amostra Nano\_ICAR3% apresentou um valor de  $73,7 \pm 0,1$ .

**Figura 14.** Eficiência de encapsulação (%) da Nanocápsulas Poliméricas em função do tempo (0, 15, 21, 30, 60 e 90 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de  $p < 0,05$  (One Way ANOVA – Tukey) para a análise de variância dos Tempos (15, 21, 30, 60 e 90 dias) em relação ao Tempo 0.



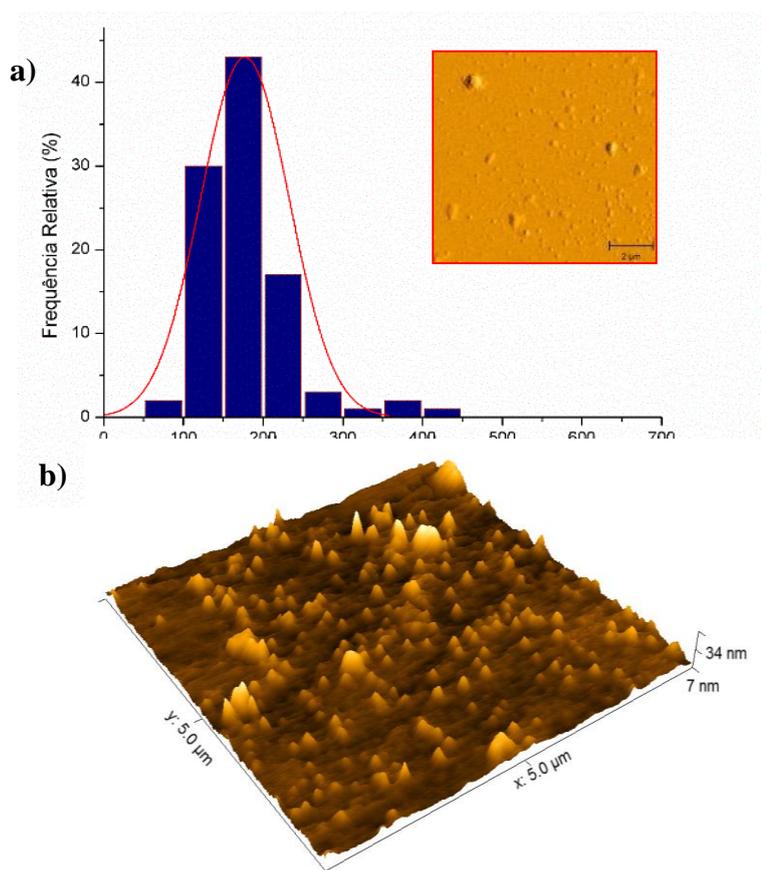
Alguns fatores como a afinidade do fármaco pelo polímero, volume da superfície hidrofóbica e/ou a solubilidade do princípio ativo em água são alguns dos fatores que podem afetar a eficiência de encapsulação de sistemas nanoparticulados (ZHANG et al. 2004). Através desta análise podemos observar que as nanocápsulas contendo geraniol apresentaram uma maior eficiência de encapsulação quando comparado com as nanocápsulas contendo icaridina. Este parâmetro pode estar relacionado com uma diferença de solubilidade entre o geraniol ( $100 \text{ mg/L } 25^\circ \text{C}$ ) e icaridina ( $8,6 \text{ g/L } 20^\circ \text{C}$ ), outro fator determinante que podemos considerar são os valores de vapor de pressão dos princípios ativos,  $3,0 \times 10^{-2} \text{ mmHg } (25^\circ \text{C})$  para geraniol e  $4,43 \times 10^{-4} \text{ mmHg } (25^\circ \text{C})$  para a icaridina, os quais podem ser relevantes durante o processo de encapsulação.

Apesar das variações estatisticamente significativas apresentadas, as nanocápsulas desenvolvidas apresentam uma alta estabilidade na eficiência de encapsulação até o período de 90 dias, destacando as formulações Nano\_GER1%; Nano\_GER3% e a amostra Nano\_ICA3%. Contudo todos os sistemas desenvolvidos apresentaram eficiência de encapsulação acima dos 50% mantendo-se estável durante o período de estabilidade, corroborando a permanências dos ativos na matriz polimérica; assim; tornando os sistemas nanoestruturados relevantes quanto ao rendimento de cada princípio ativo ao fim do processo de nanoencapsulação.

#### 4.9 Microscopia de Força Atômica (MFA)

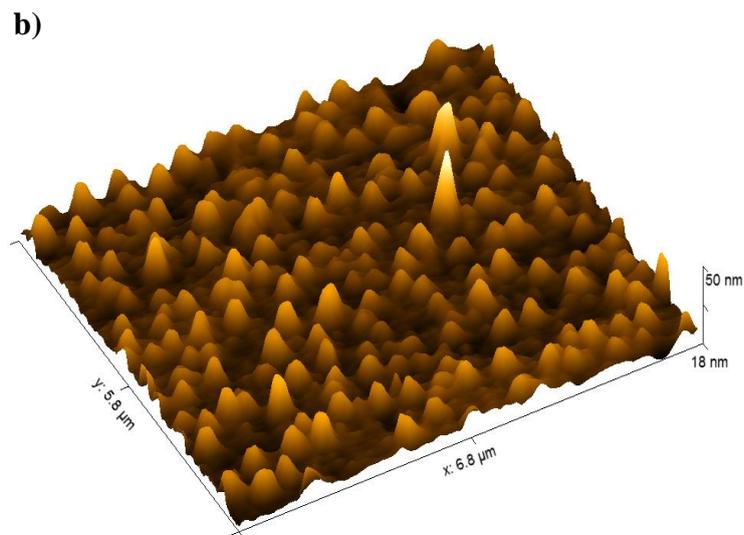
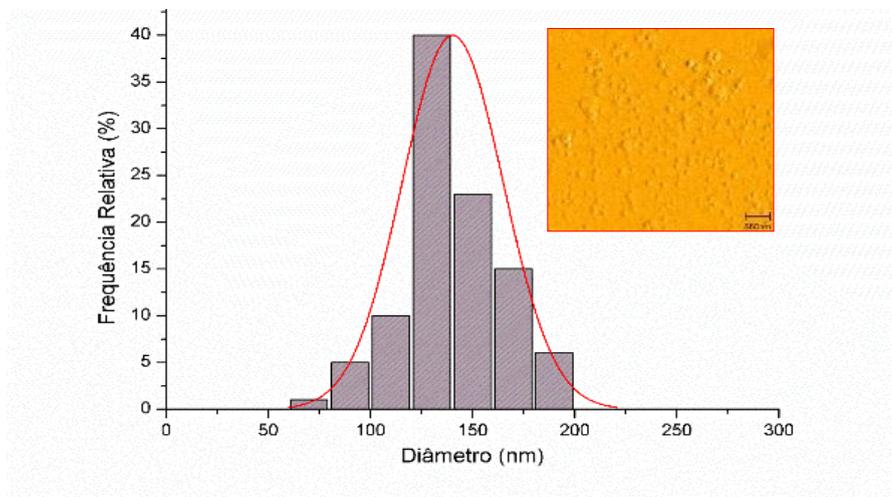
A técnica de AFM foi utilizada para analisar a morfologia e distribuição das nanocápsulas. A Figura 15 apresenta os resultados obtidos por análise de AFM para as nanocápsulas Nano\_Ger3%. Com base na Figura 13.b pode-se observar estruturas esféricas as quais apresentam em sua maioria uma homogeneidade na distribuição de tamanho 198 nm (Figura 13.a), este dado corrobora com os valores do índice de polidispersão encontrado por DLS, assim visualizando que as nanocápsulas desenvolvidas não apresentam um caráter de agregação.

**Figura 15** . Representação do **a)** Gráfico de distribuição de Tamanho (nm) em relação a Frenquência Relativa (%) e **b)** Topografia referente a formulação Nano\_GER3%.



A Figura 16 apresenta os resultados obtidos da formulação Nano\_ICA3%, como se pode observar as nanocápsulas apresentam uma morfologia esférica (Figura 14.b), com uma homogeneidade na distribuição de tamanho e tamanho médio de aproximadamente 148 nm (Figura 14.a). A diferença de tamanho das nanocápsulas em relação ao diâmetro analisado por DLS pode ser atribuído a diversos fatores; tais como; agregação ou achatamento das nanopartículas quando são depositadas e secas sobre a superfície de mica, assim originando populações heterogêneas (LEITE et al. 2005).

**Figura 16.** Representação do **a)** Gráfico de distribuição de Tamanho (nm) em relação a Freqüência Relativa (%) e **b)** Topografia referente a formulação Nano\_ICAR3%.



Com base na análise pela técnica de AFM foi possível observar que as nanocápsulas avaliadas possuem geometria muito próxima a esférica, este fenômeno pode estar associado ao processo de desenvolvimento quanto a expansão térmica em sua região devido a absorção de radiação. Em estudo realizado por Silva et al.,(2010) foi realizada análise por AFM de nanopartículas de alginato contendo o herbicida clomazone apresentaram características morfológicas e de distribuição, os quais também foram compatíveis com os resultados de polidispersão obtidos por DLS.

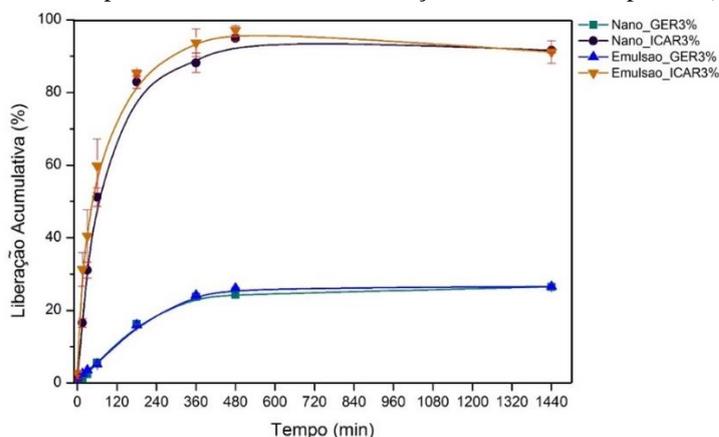
Os resultados de AFM demonstraram que as nanocapsulas contendo icaridina e geraniol apresentaram morfologia esférica, como desejado, elucidando a parede da matriz polimérica. Os valores de diâmetro foram menores em comparação aos resultados obtidos por DLS, este processo pode estar atribuído ao processo de diluição e secagem necessário para realização da análise.

#### 4.10 Ensaio cinética de liberação e modelagem matemática

Os ensaios de cinética de liberação foram realizados utilizando a metodologia citada no item 3.4. Após a realização dos ensaios e análise por CLAE os valores das área obtidas foram convertidos em porcentagem e posteriormente o gráfico foi desenvolvido expressando a liberação cumulativa (%) em função do tempo. Os sistemas de liberação controlada tem por objetivo manter uma concentração constante do ativo disponível por um tempo estabelecido (ROGOBETE et al., 2016).

O perfil de cinética de liberação das nanocápsulas e das emulsões contendo icaridina e geraniol estão representados na Figura 17. Os resultados demonstraram que amostra Nano\_ICAR3% liberou 50% de seu ativo em aproximadamente 75 minutos (3,1 horas); já as nanocápsulas contendo geraniol liberou apenas 7% de seu ativo neste mesmo tempo, mantendo uma liberação de apenas 26% em 24h. Este resultado está diretamente relacionado com o perfil de eficiência de encapsulação, o qual o sistema nanoestruturado contendo icaridina possui um menor valor de eficiência de encapsulação significando que a mesma possui uma maior fração de ativo livre conferindo uma rápida liberação do ativo.

**Figura 17.** Ensaios de liberação cumulativa das nanocápsulas Nano\_GER3%; Nano\_ICAR3%; Emulsão\_GER3% e Emulsão\_ICAR3% realizada em temperatura de 32 °C. Determinação realizada em triplicata (n=3).



Perfis de liberação semelhantes foram encontrados para as emulsões de geraniol e icaridina preparadas a fim de avaliar e comparar ambos sistemas. A amostra Emulsão\_ICAR3% liberou 50% de seu ativo em aproximadamente 47 minutos (1,9 horas), esta diferença de no tempo de liberação pode estar diretamente relacionado pela interação do ativo pela matriz polimérica onde acaba retardando a liberação em comparação a emulsão. Em relação aos sistemas contendo o ativo geraniol foi possível observar que as nanocápsulas e a emulsão apresentaram um perfil de liberação semelhantes, porém este fato pode estar associado a formação de micelas que ao interagirem com a membrana lipofílica possuiu uma afinidade pelo meio receptor levando a passagem do ativo.

A liberação dos ativos nanoencapsulados está diretamente ligado a estrutura da partícula assim como o polímero utilizado na formação da parede polimérica. O ensaio mostrou que as nanocápsulas com icaridina possui uma liberação mais rápida em relação ao sistema nanoestruturado contendo geraniol. Este resultado pode estar relacionado a eficiência de encapsulação onde os resultados demonstrados no item 4.8 mostraram que as nanocápsulas contendo icaridina apresentaram uma menor eficiência de encapsulação comparado as nanopartículas poliméricas com geraniol. Assim é possível associar que ao possuir uma menor eficiência de encapsulação consequentemente possui uma maior taxa de ativo livre, sendo essa liberada de forma mais rápida. O resultado dos perfis de liberação dos sistemas nanoestruturados é satisfatório ao correlacionarmos ao desenvolvimento de um repelente envolvendo ambos ativos, o qual terá uma liberação rápida das nanocápsulas contendo icaridina; consequentemente conferindo uma proteção inicial, juntamente com uma liberação gradual e prolongada das nanocápsulas contendo geraniol.

Os perfis de liberação das nanocápsulas poliméricas desenvolvidas foram avaliadas a partir dos modelos cinéticos de Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell e de Primeira Ordem. Os resultados estão representados na Tabela 6. Os modelos cinéticos de liberação são obtidos através de interpretações matemáticas; para a liberação de drogas e/ou ativos esses modelos são importantes para prever o mecanismo de liberação, assim como a concentração no sítio de ação, o que é determinante para a eficácia do sistema nanoestruturado (JAHROMI, et al. 2020).

**Tabela 6.** Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para os distintos modelos matemáticos empregados para a cinética de liberação das nanocápsulas contendo os ativos geraniol e icaridina.

AMOSTRAS	Modelos Matemáticos								
	Higuchi		Korsmeyer-Peppas			Hixson-Crowell		Primeira Ordem	
	$R^2$	k	$R^2$	k	n	$R^2$	k	$R^2$	k
Nano_ICAR3%	0,891	8,730	0,941	16,259	0,269	<b>0,964</b>	0,0051	0,930	0,0187
Nano_GER3%	0,907	4,556	0,822	1,4308	0,436	<b>0,999</b>	0,0036	<b>0,998</b>	0,0114

$R^2$ = Coeficiente de correlação; k= Constante de liberação

Os encapsulantes poliméricos promovem a liberação controlada de ativos através de três mecanismos; **i)** liberação controlada por degradação/erosão **ii)** liberação controlada por difusão ou por **iii)** ativação. As nanopartículas poliméricas podem liberar seu ativo encapsulado através de mais de um mecanismo de liberação, os quais podem atuar simultaneamente que podem se identificados pelos modelos matemáticos.

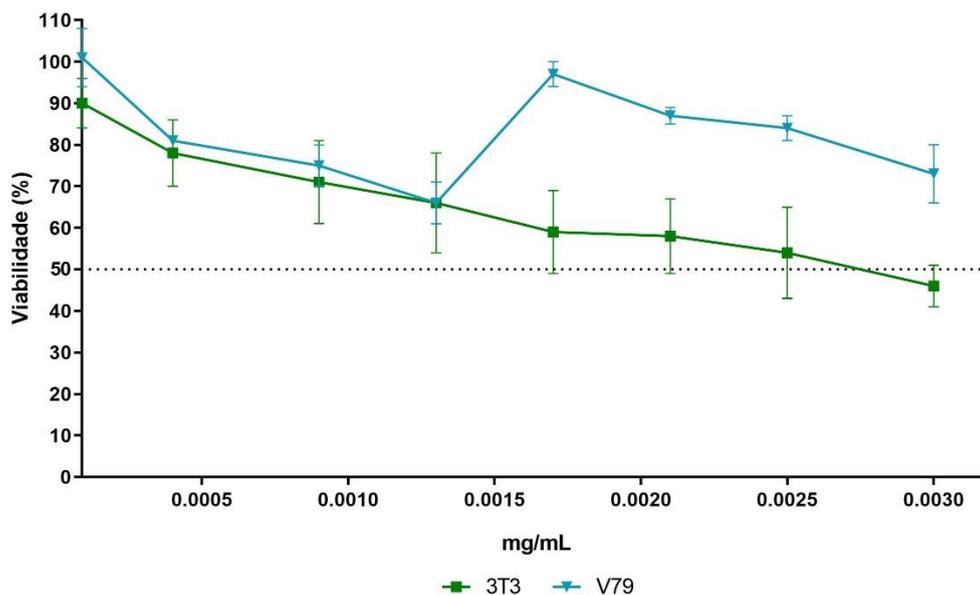
A partir dos resultados demonstrados na Tabela 6 foi possível observar que as nanocápsulas desenvolvidas apresentaram cinética de liberação mais próximo ao modelo matemático de Hixson-Crowell seguido pela cinética de primeira ordem. O modelo de Hixson-Crowell sugere que a liberação dos ativos é limitada através da dissolução das partículas no qual ocorre uma alteração no diâmetro e na área superficial das nanopartículas podendo atribuir o princípio de liberação do ativo a taxa de erosão da matriz polimérica (REZK, et al. 2019). Ao ajustar a cinética de liberação para o modelo de primeira-ordem Nano\_GER3% apresentou coeficiente de determinação ( $R^2=0,998$ ); ou seja; a velocidade de liberação é dependente da concentração do ativo, sendo que valores semelhantes da constante de liberação das nanocápsulas contendo geraniol e icaridina sugerem que a liberação destes ativos ocorrem em uma única etapa sem a presença do efeito *burst*, o qual pode indicar que todo o ativo é encapsulado corroborando com os valores de eficiência de encapsulação (ROCHIN-WONG; et al. 2018).

#### 4.11 Ensaio de Atividade Mitocondrial – MTT

Os estudos de viabilidade celular foram realizados para avaliar os efeitos e segurança das nanocápsulas poliméricas frente a linhagens celulares específicas mimetizando a via de exposição na pele e por inalação (MARUYAMA et al., 2016). A avaliação dos efeitos de citotoxicidade das nanopartículas por meio do ensaio MTT que indicia a atividade mitocondrial das linhagens celulares 3T3 e V79 após exposição às formulações. Para esta avaliação foram utilizadas as formulações Nano\_SemAtivo e a Nano\_GER/ICAR3%; a qual é resultante de uma mistura 1:1 das formulações Nano\_GER3% e Nano\_ICAR3%.

Os resultados de citotoxicidade da Nano\_SemAtivo são representados na figura 18. Foi possível observar que as nanocápsulas mostraram viabilidade celular semelhantes frente as linhagens celulares. Na menor concentração equivalente a 0,00009 mg/mL foi possível observar uma viabilidade celular acima de 90%; essa viabilidade sofreu um decréscimo com o decorrer do aumento da concentração; onde a linhagem celular 3T3 apresentou uma viabilidade celular superior a 50% até a concentração 0,0025 mg/mL.

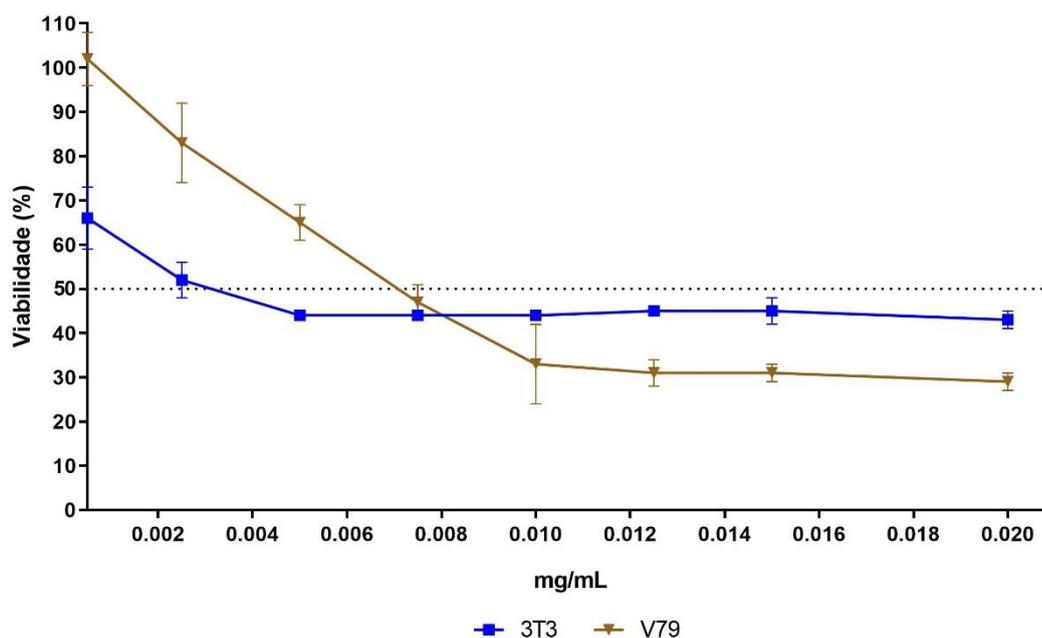
**Figura 18.** Avaliação da citotoxicidade das formulações Nano\_CONTROL em linhagens celulares 3T3 e V79.



O resultado obtido demonstra que as nanocápsulas sem ativo não apresentam um efeito significativo sobre a viabilidade celular frente as linhagens celulares 3T3 e V79. O PCL, polímero de revestimento que forma a matriz polimérica das nanocápsulas desenvolvidas é um material biocompatível e biodegradável amplamente utilizado no desenvolvimento micro e nanoesferas para aplicação biológica (SINHA, et al., 2004; GRILLO, et al., 2012).

Na Figura 19 estão representados os resultados de viabilidade celular das linhagens celulares 3T3 e V79 frente a formulação Nano\_GER/ICA3% após a exposição (24h). Observar-se que a linhagem celular 3T3 inicialmente na menor concentração apresentou uma viabilidade 66%; já na concentração de 0,0025 mg/mL houve uma viabilidade de 50% mantendo-se uma viabilidade estável até a concentração de 0.02 mg/mL a qual apresentou uma viabilidade de 43%. Para a linhagem V79 foi observado que na concentração 0,0005 mg/mL e 0,005 mg/mL apresentou 100% e 65% de viabilidade celular respectivamente, porém diferente da linhagem 3T3, alcançou 50% de viabilidade com uma concentração 0,0075 mg/mL.

**Figura 19.** Avaliação da citotoxicidade das formulações Nano\_GER/ICAR\_3% em linhagens celulares 3T3 e V79.



Os resultados demonstraram que após a encapsulação dos ativos geraniol e icaridina houve um decréscimo na viabilidade celular em concentrações menores em comparação a concentração do polímero que constituem a Nano\_SemAtivo. As linhagens celulares utilizadas mostraram um comportamento diferente em relação a formulação Nano\_GER/ICAR3%, segundo Batista-Gallepa et al., (2018) a linhagem V79 apresenta um alta sensibilidade em comparação a linhagem 3T3, o que provavelmente resultou em uma menor viabilidade celular.

Um estudo realizado por Queiroz et al., (2017) avaliou a citotoxicidade do geraniol pelo método MTT em células de hepatócitos humanos (HepG2) mostraram uma diminuição da viabilidade celular para menos de 70% na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  ou 0,025  $\text{mg/mL}$ , este resultado estaria relacionado ao efeito inibitório do geraniol (50 e 200  $\mu\text{M}$ ) na via do mevalonato quanto da biossíntese de fosfatidilcolina. Os resultados mostram que a formulação Nano\_GER/ICAR3% possui uma viabilidade superior a 60% em concentrações > 0,005  $\text{mg/mL}$  conferindo uma menor citotoxicidade em relação ao geraniol livre; este resultado pode estar associado ao processo de encapsulação dos ativos; uma vez que o sistema possui o geraniol e a icaridina que ao possuiu uma liberação controlada e conseqüentemente reduzirá a sua toxicidade.

#### 4.12 Ensaio Cometa – Avaliação de Genotoxicidade

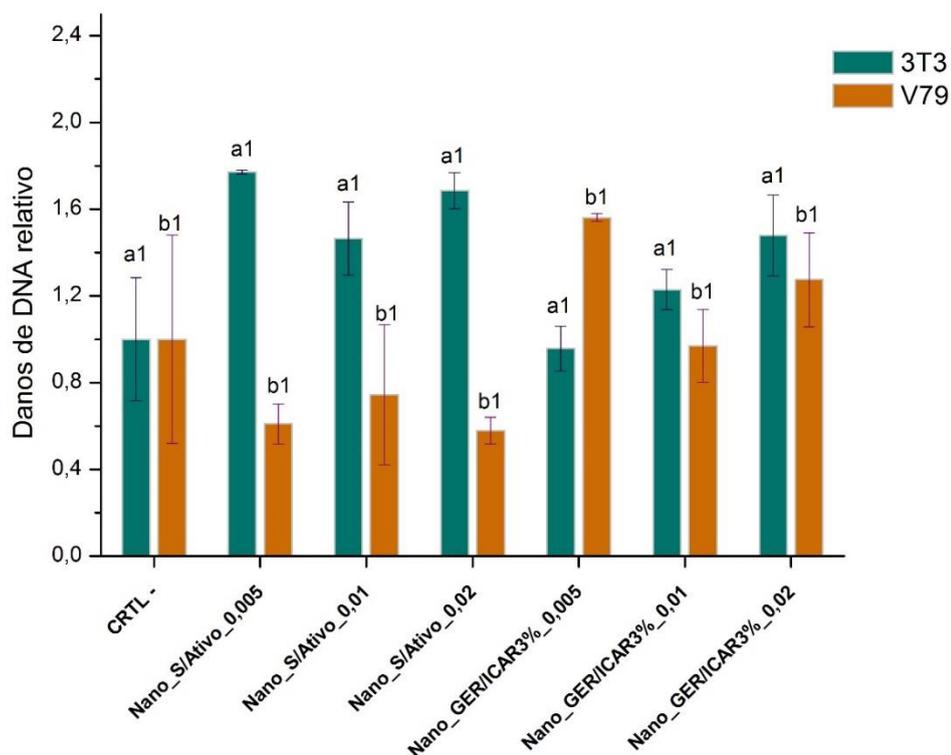
O ensaio cometa é um teste amplamente utilizado na avaliação da genotoxicidade, capaz de detectar quebras de DNA simples e duplas que são identificadas pelos fragmentos de DNA de baixa massa molecular danificados e carregados negativamente, formando um rastro semelhante a uma cauda

de cometa; quanto maior o dano; maior será a intensidade da cauda (UDROIU; SGURA, 2017).

As análises de genotoxicidade (Figura20) com a linhagem celular 3T3 expostas as nanopartículas CONTROLE (S/Ativo) e das contendo geraniol e icaridina (1:1) expostas por 1 hora mostraram um não mostram aumento significativos de danos de DNA em relação ao controle negativo (Figura 18). Resultado semelhantes foram encontrados na linhagem celular V79, as quais não apresentaram variação significativa em relação ao grupo controle negativo, indicando que o sistema nanoestruturado não causa danos ao DNA das linhagens utilizadas.

A análise entre as diferentes concentrações não mostrou diferença significativa, indicando que dentro das concentrações escolhidas a formulação final da mistura de nanocápsulas poliméricas não causaram danos ao DNA na exposição por 1h. Segundo Huk et. al (2014) quanto menor o período de exposição das células ao ensaio cometa, maiores são as chances de apresentar dano primário. Esse fator está relacionado a incapacidade das células realizarem o reparo de danos ao DNA em períodos curtos de exposição.

**Figura 20.** Avaliação do danos de DNA pelo ensaio cometa em linhagens celulares: 3T3 e V79 expostas às concentrações de 0,005; 0,01 e 0,02 mg/mL da formulação Nano\_GER/ICAR3% e Nano\_S/Ativo. Números iguais não apresentam significância estatística ( $p > 0,05$ ).



Os estudos de genotoxicidade sugerem a interação das nanopartículas e o DNA, os quais demonstram os possíveis danos que estas partículas causariam no DNA. A avaliação da genotoxicidade de nanomateriais ainda apresentam desafios devido ao tamanho, área de superfície e a disposição desconhecida destas nanoestruturas em sistemas biológicos. A utilização do ensaio cometa na

avaliação da genotoxicidade está sujeito a respostas variáveis devido ao uso de diversos métodos e sistemas celulares os quais podem variar na capacidade metabólica e no reparo do DNA (ELESPURU, et al., 2018). Os resultados de genotoxicidade das nanocápsulas contendo geraniol e icaridina frente às linhagens celulares 3T3 e V79 demonstraram que os sistemas nanoestruturados apresentaram danos de DNA relativamente próximo ao controle negativo, o qual caracteriza baixo danos ao DNA. Contudo a avaliação de nanomateriais em sistemas biológicos necessita de maior variedade de ensaios a fim de avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade conferindo esta tecnologia segura ao serem expostas ao ser humano e ao ambiente.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou o desenvolvimento, caracterização físico-química, avaliação da cinética de liberação, citotoxicidade e genotoxicidade de nanocápsulas poliméricas contendo geraniol e icaridina. Os resultados encontrados permitiram concluir que o sistema nanoestruturado desenvolvidos a partir da técnica de nanoprecipitação com evaporação do solvente mostrou-se tecnicamente viável quanto a execução e estabilidade das nanopartículas.

As características físico-químicas das nanocápsulas como tamanho de diâmetro médio, pH, polidispersão, eficiência de encapsulação, análise térmica (DSC), FTIR e estudo de estabilidade mostraram resultados satisfatório para este sistema nanoestruturado.

A cinética de liberação das nanopartículas sugeriu que as nanocápsulas contendo geraniol e icaridina seguem os modelos matemáticos de Hixon-Crowell e cinética de primeira-ordem sendo a liberação controlada pela taxa de erosão da matriz polimérica e/ou concentração dos ativos. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que as nanocápsulas poliméricas desenvolvidas apresentam uma maior viabilidade celular em concentrações <0,005 mg/mL para a linhagem V79 e em concentrações < 0,0025 mg/mL para a linhagem celular 3T3. A avaliação da genotoxicidade demonstrou que o sistema nanoestruturado não apresentou danos ao material genético das linhagens 3T3 e V79 significativamente estatísticos em relação ao controle.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho abre a possibilidade para o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado contendo os ativos geraniol e icaridina em baixas concentrações, ao contrário dos repelentes atualmente disponíveis no mercado, visando a atividade repelente frente ao *Aedes aegypti*, conferindo uma liberação modificada e prolongada e através da nanotecnologia alcançar uma maior eficácia e segurança.

## 6 REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-1713, 2006.

ABRIATA, J. P. et al. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 347-355, 2019.

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)> Acesso em: 02 de fevereiro de 2020.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 19 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acesso em: 19 janeiro de 2020.

ARAGÃO, C. F. et al. Circulation of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* in Maranhao, Northeast Brazil. **Acta tropica**, v. 186, p. 1-4, 2018.

BEZERRA, E. B. et al. Comportamento reológico do Bio-PE e do PCL na presença do PEGAA e PEGMA. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, n. 1, 2017.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BOECKH, J. et al. Acylated 1, 3- aminopropanols as repellents against bloodsucking arthropods. **Pesticide Science**, v. 48, n. 4, p. 359-373, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 13, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v.51, n.14, Abril/2020 Disponível em : <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/April/03/Boletim-epidemiologico-SVS-14.pdf> > Acesso em: 28 de Abril de 2020.

BROWN, M. et al. Repelentes de insetos: uma visão geral. **Jornal da Academia Americana de Dermatologia** , v. 36, n. 2, p. 243-249, 1997.

BRUSCHI, M. L. **Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems**. Woodhead Publishing, 2015. p. 63-86.

CATAURO, M. et al. Sol–gel synthesis and characterization of SiO<sub>2</sub>/PCL hybrid materials containing quercetin as new materials for antioxidant implants. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 945-952, 2016.

CHARLTON, N. P. et al. The toxicity of picaridin containing insect repellent reported to the National Poison Data System. **Clinical toxicology**, v. 54, n. 8, p. 655-658, 2016.

CLAYTON, K. N. et al. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. **Biomicrofluidics**, v. 10, n. 5, p. 054107, 2016.

COLLINS A. he comet assay for DNA damage and repair: principles, application and limitations. **Mol.**

**Biotech**, v. 26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A. et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 30, n. 2, p. 139-146, 1997.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; HORSKÁ, A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. **Acta Biochim Pol**, 48:661-614, 2001.

COLLINS, A.; FLEMING, I. M.; GEDIK, C. M. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercolloid nucleoid DNA by human cell extract. *Biochim. Biophys. Acta.* 1219, 724-727, 1994.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771-784, 2017.

DANAIEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DE LIMA, R. et al. Avaliação da genotoxicidade de micropartículas poliméricas contendo herbicida ametrina. **Jornal de Ciência e Engenharia Ambiental. A**, v. 1, n. 4A, 2012.

DURÁN-LOBATO, M. et al. Comparative study of chitosan-and PEG-coated lipid and PLGA nanoparticles as oral delivery systems for cannabinoids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, p. 61, 2015.

ELBAN, F. et al. Reliability and agreement of skin barrier measurements in a geriatric care setting. **Journal of Tissue Viability**, 2020.

ELESPURU, Rosalie et al. Genotoxicity assessment of nanomaterials: recommendations on best practices, assays, and methods. **Toxicological Sciences**, v. 164, n. 2, p. 391-416, 2018.

FILIFE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates; **Pharm. Res.** 27, 796, 2010

FONTANIVE, V. C. P. et al. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, 2014.

FRANCHI, L. P. et al. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 571-580, 2012.

FREIRE, N. F. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*). 2017. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Industrial). UFBA, Salvador, 2017.

GONÇALVES, Giovana M.; BRIANEZI, Gabrielli; MIOT, Hélio Amante. The pH of the main Brazilian commercial moisturizers and liquid soaps: considerations on the repair of the skin barrier. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 736-738, 2017.

GOULART, S. O. et al. DENGUE NO BRASIL: Gestão de políticas públicas de controle e erradicação. **Revista Estudo & Debate**, v. 23, n. 2, 2016.

HASHIM, I. I. A. et al. Pivotal role of Acitretin nanovesicular gel for effective treatment of psoriasis: ex vivo–in vivo evaluation study. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 1059, 2018.

HOSTÝNEK, J. J.; MAIBACH, H. I. Is there evidence that geraniol causes allergic contact dermatitis?. **Exogenous Dermatology**, v. 3, n. 6, p. 318-331, 2004.

HUK, Anna et al. Is the toxic potential of nanosilver dependent on its size?. **Particle and fibre toxicology**, v. 11, n. 1, p. 65, 2014.

KARMAKAR, S. et al. Clove (*Syzygium aromaticum* Linn) extract rich in eugenol and eugenol derivatives shows bone-preserving efficacy. **Natural product research**, v. 26, n. 6, p. 500-509, 2012.

KATZ, T. M. ; Miller, J. H. ; HEBERT, A. A. Repelentes de insetos: perspectivas históricas e novos desenvolvimentos. **Jornal da Academia Americana de Dermatologia** , v. 58, n. 5, p. 865-871, 2008.

KLUN, J. A.; KHRIMIAN, A.; DEBBOUN, M. Repellent and deterrent effects of SS220, Picaridin, and Deet suppress human blood feeding by *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Phlebotomus papatasi*. **Journal of medical entomology**, v. 43, n. 1, p. 34-39, 2006.

JAHROMI, L. P. et al. A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03451, 2020.

LASERRA, S. et al. Solid lipid nanoparticles loaded with lipoyl–memantine codrug: preparation and characterization. **International journal of pharmaceutics**, v. 485, n. 1-2, p. 183-191, 2015.

LEE, C. H. et al., Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsule carriers with sustained drug release: single dose for long-term glaucoma treatment. **Nanoscale**, v. 9, n. 32, p. 11754-11764, 2017.

LIRA, M. H. P. et al. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. **Journal of Essential Oil Research**, p. 1-11, 2020.

LIANG, X. W. et al. Penetration of nanoparticles into human skin. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 35, p. 6353-6366, 2013.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LIU, T.; WU, D. Simultaneous determination of some ultraviolet- absorbing chemicals in sunscreen cosmetics using a high- performance liquid chromatography method. **International journal of cosmetic science**, v. 33, n. 5, p. 408-415, 2011.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

MALIKMAMMADOV, E. et al. Materiais baseados em PCL e PCL em aplicações biomédicas. **Journal of Biomaterials science, edição Polymer** , v. 29, n. 7-9, p. 863-893, 2018.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Zetasizer nano series. User Manual. Malvern, 2005.

MARUYAMA, C. R. et al. Nanoparticles based on chitosan as carriers for the combined herbicides imazapic and imazapyr. **Scientific reports**, v. 6, p. 19768, 2016.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MENEZES, P. P. et al. Complexos de p-ciclodextrina no estado sólido contendo geraniol. **Thermochimica acta**, v. 548, p. 45-50, 2012.

MIOT, H. A. et al. Comparison among homemade repellents made with cloves, picaridin, andiroba, and soybean oil against *Aedes aegypti* bites. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 793-794, 2011.

MORA-HUERTAS, C. E. et al. Electrokinetic properties of poly- $\epsilon$ -caprolactone-based nanoparticles prepared by nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: a comparative study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 6, p. 876, 2012.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Poly (D, L- lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MÜLLER, G. C. et al. Indoor protection against mosquito and sand fly bites: a comparison between citronella, linalool, and geraniol candles. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, n. 1, p. 150-153, 2008.

MUMCUOGLU, K. Y. et al. Repellency of essential oils and their components to the human body louse, *Pediculus humanus humanus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 78, n. 3, p. 309-314, 1996.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Database. Geraniol, CID=637566, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geraniol>> (accessed on Apr. 24, 2020)

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Database. Icaridin, CID=125098, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Icaridin> (accessed on Apr. 24, 2020)

NAUCKE, T. J. et al. Field evaluation of the efficacy of proprietary repellent formulations with IR3535® and Picaridin against *Aedes aegypti*. **Parasitology research**, v. 101, n. 1, p. 169, 2007.

PAVAN, B. et al. Geraniol pharmacokinetics, bioavailability and its multiple effects on the liver antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzymes. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 18, 2018.

PEREIRA, A. E. S. et al. Application of poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of hazardous materials**, v. 268, p. 207-215, 2014.

RAȚĂ, D. M. et al. "In vitro" behaviour of aptamer-functionalized polymeric nanocapsules loaded with 5-fluorouracil for targeted therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109828, 2019.

QUEIROZ, T. B. et al. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.

REEVES, W. K.; MILLER, M. M. Aqueous 2% geraniol as a mosquito repellent failed against *Aedes aegypti* on ponies. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 3, p. 340-341, 2010.

REZK, A. I. et al. Drug release and kinetic models of anticancer drug (BTZ) from a pH-responsive alginate polydopamine hydrogel: Towards cancer chemotherapy. **International journal of biological**

**macromolecules**, v. 141, p. 388-400, 2019.

RIBAS, J.; CARREÑO, A. M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 1, p. 33-38, 2010.

ROGOBETE, A. F. et al. New aspects of controlled release systems for local anaesthetics. A Review. **Trends in Anaesthesia and Critical Care**, v. 9, p. 27-34, 2016.

SAKULKU, U. et al. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International journal of pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 105-111, 2009.

SALVEKAR, A. V. et al. Shape/temperature memory phenomena in un-crosslinked poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL). **European Polymer Journal**, v. 72, p. 282-295, 2015.

SANTOS, P. L. et al. Preparation, characterization, and pharmacological activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) leaf essential oil of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

SANTOS, S. R. L. et al. Efeitos tóxicos e relações estrutura-toxicidade de fenilpropanóides, terpenos e compostos relacionados em larvas de *Aedes aegypti*. **Doenças transmitidas por vetores e zoonóticos**, v. 10, n. 10, p. 1049-1054, 2010.

SBQ – Sociedade Brasileira de Química. Geraniol. 2016. Disponível em: <<http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=molecula.201>> Acesso em: 27 de Janeiro de 2020.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J. V.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p. 80-85, 2005.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin pharmacology and physiology**, v. 19, n. 6, p. 296-302, 2006.

SHARMA, P. K. et al. Biochemical characteristics of a novel vegetative tissue geraniol acetyltransferase from a monoterpene oil grass (*Palmarosa*, *Cymbopogon martinii* var. *Motia*) leaf. **Plant science**, v. 203, p. 63-73, 2013.

SILVA, F. C. F. et al. Polímeros Hidrossolúveis: um estudo teórico. **ANAIS SIMPAC**, v. 8, n. 1, 2018.

SILVA, M. S. et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SINGH N.P., MCCOY M. T., TICE R. R., SCHNEIDER E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91.

SINGH, S. P. et al. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 2, p. 338-350, 2010.

SINHA, V. R. et al. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International**

**journal of pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.

SONGKRO, S. et al. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repellent. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 72, n. 3-4, p. 339-355, 2012.

SONVICO, F. et al. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International journal of pharmaceutics**, v. 324, n. 1, p. 67-73, 2006.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros: parte I. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 96-100, 2012.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SOUZA, P. M. S. et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. Aedes aegypti vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 191-209, 2019.

SOTELO-BOYÁS, M.; CORREA-PACHECO, Z.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; GÓMEZ Y GÓMEZ, Y. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 409–414, 1 out. 2017a.

STEFANI, G. P. et al. Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 1, p. 81-89, 2009.

TABARI, M. A. et al. Toxicity of  $\beta$ -citronellol, geraniol and linalool from Pelargonium roseum essential oil against the West Nile and filariasis vector Culex pipiens (Diptera: Culicidae). **Research in veterinary science**, v. 114, p. 36-40, 2017.

TICE, Raymond R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

UDROIU, I.; SGURA, A. Cytogenetic tests for animal production: state of the art and perspectives. **Animal genetics**, v. 48, n. 5, p. 505-515, 2017.

UTER, W. Contact allergy to fragrances: current clinical and regulatory trends. **Allergologie select**, v. 1, n. 2, p. 190, 2017.

VALDEZ, L. D.; SIBONA, G. Javier; CONDAT, C. A. Impacto das chuvas nas populações de Aedes aegypti. **Modelagem Ecológica**, v. 385, p. 96-105, 2018.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WIRTZ, R. A. et al. Mosquito area repellents: laboratory testing of candidate materials against Aedes aegypti. **Mosquito News**, v. 40, n. 3, p. 432-439, 1980.

XUE, R.; ALI, A.; BARNARD, D. R. Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellents in

aerosol sprays to adult mosquitoes. 2003.

ZANETTI, M. et al. Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, p. 198-207, 2019.

ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ZHANG, Y. et al. Preparation, characterization and application of pyrene-loaded methoxy poly (ethylene glycol)–poly (lactic acid) copolymer nanoparticles. **Colloid and Polymer Science**, v. 282, n. 12, p. 1323-1328, 2004.

ZORZI, G. K. et al. Biomaterials for nanotechnology-based formulations targeting ocular gene therapy. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 74-84, 2017.