

## **SILICONE COMO MATRIZ POLIMÉRICA PARA INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NATURAIS COM PROPRIEDADES REPELENTES DE INSETOS**

Melanie Calderine<sup>1</sup>, Hugo Oda<sup>1</sup>, Nathália V. Reiter<sup>1</sup>, Claudemir Monteiro Jr<sup>1</sup>, Andréia B. N. de Andrade<sup>1</sup>, Sizue O. Rogero<sup>1</sup>, José R. Rogero<sup>1</sup>, Sandra Goraieb<sup>2</sup>, Ademar B. Lugão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo (SP), Brasil

<sup>2</sup>Millebolleblu Cosméticos Ltda, Paulínia (SP), Brasil

E-mail: sorogero@ipen.br

***Resumo.** Doenças transmitidas por artrópodes, como malária, febre amarela, dengue, entre outras, constituem importantes problemas na saúde pública. Os mosquitos hematófagos podem transmitir agentes infecciosos por inoculação no ato da picada. Os repelentes de uso tópico são uma das alternativas para afastar esses insetos. Muitas pessoas apresentam reações alérgicas ou mesmo intoxicação pelos repelentes tradicionais. Baseado neste fato o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma matriz polimérica adequada para imobilização e incorporação de óleos essenciais naturais que apresentam propriedades repelentes. Os estudos foram realizados em uma matriz de silicone grau médico MED-4735 reticulada por radiação ionizante na dose de 25kGy, sendo realizada então, a caracterização físico-química da matriz obtida pelos ensaios de fração gel e intumescimento, bem como a caracterização biológica “in vitro” pelo teste de citotoxicidade utilizando a técnica de captação de vermelho neutro. Os resultados obtidos demonstraram que o silicone além de não apresentar citotoxicidade mostrou propriedades físico-químicas adequadas, podendo ser utilizado como matriz para imobilização de óleos essenciais naturais*

***Palavras-chave:** Silicone, Óleos essenciais, Caracterização físico-química, Radiação ionizante*

### **1. INTRODUÇÃO**

As doenças transmitidas por picadas de insetos são consideradas um problema em saúde pública, em especial dengue e febre amarela, ambas transmitidas pelos artrópodes do gênero *Aedes* e malária transmitida pelo gênero *Anopheles* que ocorrem em áreas de risco potencial. Além das doenças, as picadas dos insetos podem causar desconforto principalmente em crianças com hipersensibilidade que podem promover irritação local, prurido, pápulas, vesículas, estrófulo, infecção secundária local, celulite, dor, distúrbios de sono [STEFANI e col., 2009].

A saliva dos insetos hematófagos certamente assegura o elo estabelecido pelo hábito hematofágico, acoplando os três principais elementos de uma cadeia epidemiológica: o vetor, o parasito e o hospedeiro [SILVA, 2009].

Considerando que uma única picada de um inseto contaminado pode provocar alguma doença e que vacinas e quimioprofilaxia não estão ainda disponíveis para todos os casos, passa a ter importância o uso individual de repelentes [STEFANI, e col., 2009].

Muitos fatores influenciam na eficácia do repelente como, frequência e uniformidade de aplicação, número e espécies de insetos e atratividade do usuário para os artrópodes sugadores de sangue. Abrasão da roupa, evaporação e absorção da superfície da pele, suor, chuva,

temperaturas mais elevadas, ou um ambiente com vento podem reduzir os efeitos do repelente [Mark S. Fradin, 1998].

O principal produto comercializado atualmente como repelente de insetos tem como princípio ativo o DEET (N,N-dietil-meta-toluamida e N,N-dietil-3-metilbenzamida), porém de acordo com a ANVISA, existem algumas restrições quanto ao uso deste produto visto que a partir de estudos de biodisponibilidade, as preparações repelentes evidenciaram níveis de absorção na ordem de 9 a 56% nas primeiras horas além de que o mecanismo de ação do DEET ainda não foi esclarecido, e que algumas hipóteses a respeito do assunto estão associadas à capacidade de promover indução neuronal, sendo as crianças mais sensíveis que os adultos. Desta forma, a ANVISA determina que seja proibido o uso de produtos contendo DEET em crianças menores de 2 anos e em crianças de 2 a 12 anos a concentração não deve ultrapassar o limite de 10%, restrita a apenas três aplicações diárias, evitando-se o uso prolongado.

Diversos estudos vêm sendo realizados no sentido de se desenvolver novos produtos repelentes que atendam aos critérios de um produto ideal e com baixa toxicidade. Os pesquisadores estão direcionando os estudos para óleos essenciais de plantas, com propriedades repelentes de mosquitos e tem verificado que os terpenos (limonóides) são os principais responsáveis pela atividade medicinal e inseticida além de mostrar repelência a insetos [Negrelle e Gomes, 2007]

Diante desses fatos este trabalho teve como objetivo desenvolver uma matriz polimérica com possibilidade de incorporar óleos essenciais naturais voláteis com propriedade repelente para mosquitos.

Na escolha de um material a ser usado como dispositivo, deve se considerar a finalidade do uso, as suas características e propriedades química, toxicológica, física, elétrica, morfológica e mecânica. A biocompatibilidade dos materiais usados em dispositivos médicos para uso humano deve ser avaliada de acordo com a eficácia e a finalidade de uso e, para que seja considerado um biomaterial, estes devem ser atóxicos, funcionais, biocompatíveis e esterilizáveis. Na avaliação, deve ser levado em conta o material de fabricação, aditivos usados, contaminantes e resíduos do processo, substâncias lixiviáveis, produtos de degradação, outros compostos e suas interações com o produto final, bem como suas propriedades e características [ISO 10993, 1992].

Dentre os biomateriais utilizados destacam-se os polímeros, dos quais o silicone grau médico, poly(dimethylsiloxane) (PDMS), é bastante empregado. Trata-se de um elastômero impermeável à água, não tóxico para as células e permeável a gases que pode ser usado em diferentes aplicações como dispositivos médicos, implantes e produtos de liberação controlada de princípios ativos [Karlsson e col., 2002; Sia e col., 2003].

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Foi utilizado o silicone grau médico da Nusil®, MED 4735, bicomponente, contendo ou não amido de mandioca do fabricante Lorenz, para obtenção de uma matriz polimérica adequada para incorporação de óleos essenciais de plantas.

### **2.1 Preparo da matriz**

A formulação foi preparada na proporção 1:1 das partes A e B do silicone com adição de 10% de amido de mandioca. O silicone foi homogeneizado dentro de um saco plástico transparente, em calandra. Após homogeneização do silicone foi adicionado o amido e a mistura passada novamente em calandra até completa homogeneização. A mistura homogênea obtida de silicone e silicone contendo amido foi transformada em filmes pela passagem na

calandra e estes filmes empacotados adequadamente, foram enviados para irradiação na fonte de Co-60 (Gammacell 200, Atomic Energy of Canada Ltd, CAN) numa dose de 25 kGy e taxa de dose de 2,28 kGy/h, ao Centro de Tecnologia das Radiações – CTR/IPEN.

## 2.2 Caracterização físico-química

A caracterização da matriz quanto aos parâmetros de fração gel e intumescimento fornece dados importantes que determinam a funcionalidade do produto final. Sendo que, a fração gel permite avaliar o nível de reticulação da matriz utilizando-se extrator de Soxhlet e solvente para remoção da porção solúvel. O teste de intumescimento avalia a capacidade da matriz em absorver solventes.

**Fração gel.** Amostras de aproximadamente 0,3g das matrizes preparadas em triplicata foram pesadas e embaladas em tecido tipo rede e colocadas em extrator Soxhlet utilizando como solvente o xileno por um período de 40 horas. Após este período as amostras foram mantidas em estufa a 50°C até peso constante. O cálculo da fração gel foi feito utilizando-se a Eq. (1):

$$\% \text{ FG} = (\text{mf}/\text{mi}) \times 100 \quad (1)$$

Onde  $m_i$  = massa inicial e  $m_f$  = massa final

**Intumescimento.** Foram pesadas 3 amostras com cerca de 0,3g de cada matriz. As amostras foram mergulhadas em xileno e medidas da massa foram realizadas a cada hora durante as 6 primeiras horas e após 24 horas do início do ensaio. O cálculo da % de intumescimento foi feito utilizando-se a Eq. (2):

$$\% \text{ Intumescimento} = (\text{mf} - \text{mi}/\text{mi}) \times 100 \quad (2)$$

Onde  $m_i$  = massa inicial e  $m_f$  = massa final

## 2.3 Caracterização biológica “in vitro”

Os testes de citotoxicidade envolvem o estudo do efeito tóxico que pode estar relacionado com morte celular, alterações na permeabilidade da membrana, inibição enzimática entre outras alterações celulares através de técnica que utiliza cultura de células de linhagens estabelecidas provenientes de bancos celulares como a American Type Culture Collection (ATCC) e que pode ser mensurada quantitativamente através de lise celular, inibição de crescimento, entre outros efeitos causados pelo material testado. A necessidade de um material ser biocompatível está baseada nos efeitos adversos que podem causar como necrose ou reabsorção de tecidos, reações celulares e infecções, além de hipersensibilidade, toxicidade e carcinogenicidade, com isso, o material a ser utilizado deve ser testado quanto a sua citotoxicidade, onde este não pode ser afetado pelo meio fisiológico.

O teste *in vitro* de citotoxicidade serve como meio de triagem para uma primeira avaliação quanto a biocompatibilidade do material e apresenta como vantagens o rápido resultado e a minimização do uso de animais [ISO 10993, 1992].

**Teste de citotoxicidade.** Seguindo normas ISO e metodologia descrita anteriormente por Rogero e col., os extratos obtidos das amostras imersas em meio de cultura celular foram

colocadas em contato com cultura de células de mamíferos e a toxicidade foi medida pela capacidade das células vivas e intactas de incorporarem e armazenarem nos lisossomos o corante vital vermelho neutro [Rogero e col., 2003].

A linhagem celular utilizada foi a NCTC Clone 929 de células de tecido conectivo de camundongo, originária da American Type Culture Collection (ATCC CCL 1). O meio de cultura foi o meio de Eagle (MEM), adicionado de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (MEM-uso).

Após o crescimento confluyente da cultura celular em garrafa de cultura, as células foram destacadas utilizando-se uma solução de tripsina 0,2% em tampão fosfato pH 7,4 (PBS). O número de células foi contado e a suspensão celular foi acertada para  $3,5 \times 10^5$  células por mL. Para o preparo da microplaca com células em cultura foram distribuídas 200µL desta suspensão celular em cada poço ( $7 \times 10^4$  céls/poço). A placa foi incubada em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h, a fim de atingir a confluência desejada. Decorrido esse período de incubação, o meio de cultura foi desprezado e substituído pelas diluições (100, 50, 25, 12,5 e 6,25%) dos extratos das amostras e dos controles, em triplicata. O controle positivo empregado foi o látex de borracha natural na proporção de 1 cm<sup>2</sup>/mL do MEM-uso e o controle negativo foi o polietileno de alta densidade (HDPE), na proporção de 0,5g em 5mL MEM-uso. Em cada microplaca são reservados 6 poços para o controle de células do ensaio e a substituição do meio de cultura foi feita por MEM-uso fresco. A microplaca foi deixada em incubadora a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>, durante 24h. Após este período os extratos foram substituídos pelo meio de cultura contendo vermelho neutro e a placa foi deixada por 3h para a incorporação do corante vital. Decorrido este tempo a microplaca foi lavada duas vezes com PBS e uma vez com solução de lavagem. Distribuiu-se 200µL da solução de extração em cada poço e foi realizada a leitura da microplaca no espectrofotômetro leitor de ELISA Sunrise da Tecan, após agitação por 10 minutos, em 540nm e filtro de referência de 620nm. Obtidos os resultados da leitura em densidade ótica, foram feitos os cálculos de % de viabilidade celular em relação ao controle de células, consideradas como 100%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes de silicone e silicone contendo amido, obtidos após a irradiação, pela observação táctil e visual apresentaram reticulação e elasticidade adequadas para o propósito deste trabalho.

Os resultados da fração gel estão apresentados na Tabela 1. A fração gel do silicone contendo 10% de amido apresentou resultado pouco menor que o silicone puro, não comprometendo a sua reticulação.

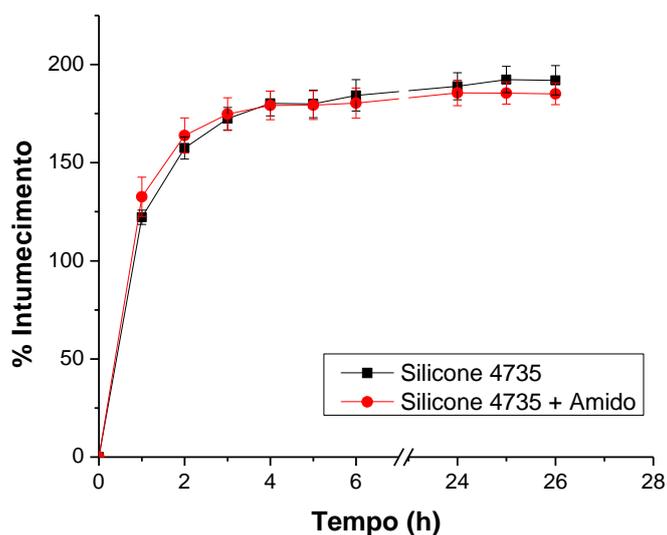
**Tabela 1. Resultados do ensaio de fração gel das matrizes de silicone**

Amostra	Massa inicial (g)		Massa final (g)		Fração gel (%)	
	Silicone	Silicone + amido	Silicone	Silicone + amido	Silicone	Silicone + amido
1	0,2925	0,3070	0,2814	0,2936	96,2	95,6
2	0,3234	0,3122	0,3111	0,2998	96,2	96,0
3	0,3065	0,3065	0,3045	0,2938	99,3	95,9
Média					97,3	95,8
± dp					± 1,8	± 0,2

Os resultados do teste de intumescimento estão apresentados na Tabela 2 e Fig.1, respectivamente. Após uma hora de ensaio as amostras apresentaram intumescimento acima de 100%, aumentando com o tempo e estabilizando após 24h, num nível de 185% para o silicone contendo amido e 190% para o silicone puro, como pode ser observado no gráfico da Fig. 1.

**Tabela 2. Resultados do ensaio de intumescimento das matrizes de silicone**

Tempo (h)	% Intumecimento	
	Silicone 4735	Silicone 4735 + Amido
1	122,2 ± 3,7	132,6 ± 10,0
2	157,5 ± 5,6	163,8 ± 9,0
3	172,4 ± 5,7	174,8 ± 8,3
4	180,2 ± 6,3	179,2 ± 7,3
5	180,0 ± 7,0	179,3 ± 7,3
6	184,3 ± 8,0	180,4 ± 7,7
24	189,0 ± 6,9	185,6 ± 6,5
25	192,4 ± 6,7	185,5 ± 5,7
26	192,0 ± 7,5	185,1 ± 5,5

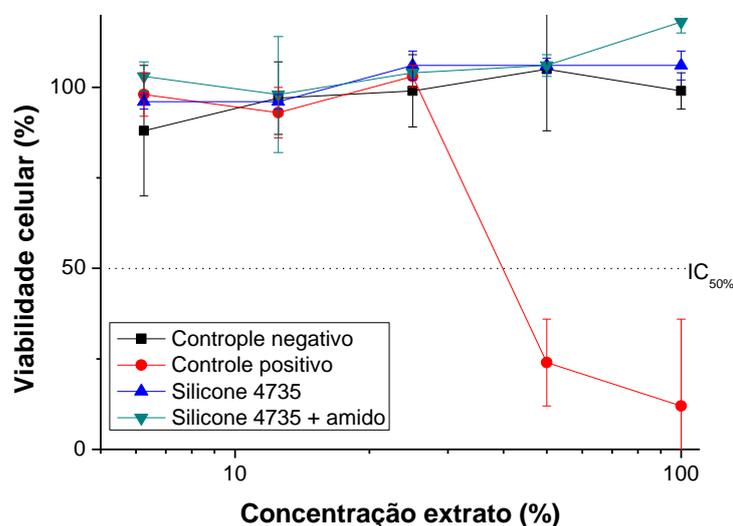


**Figura 1. Curvas de intumescimento do silicone Med 4735 contendo ou não amido**

Os resultados do ensaio de citotoxicidade estão apresentados na Tabela 3 e as curvas de viabilidade celular obtidas estão na Fig. 2. O índice de citotoxicidade do controle positivo foi de 42. As amostras de silicone testadas mostraram comportamento semelhante ao controle negativo, não citotóxica.

**Tabela 3. Resultados de viabilidade celular do ensaio de citotoxicidade das matrizes de silicone**

Concentração Extrato (%)	% Viabilidade Celular $\pm$ cv			
	Controle negativo	Controle Positivo	Silicone 4735	Silicone 4735 + amido
100	99 $\pm$ 5	12 $\pm$ 24	106 $\pm$ 4	118 $\pm$ 3
50	105 $\pm$ 17	24 $\pm$ 12	106 $\pm$ 2	106 $\pm$ 3
25	99 $\pm$ 10	103 $\pm$ 3	106 $\pm$ 4	104 $\pm$ 0
12,5	97 $\pm$ 10	93 $\pm$ 7	96 $\pm$ 2	98 $\pm$ 16
6,25	88 $\pm$ 18	98 $\pm$ 6	96 $\pm$ 2	103 $\pm$ 4



**Figura 2. Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade das matrizes de silicone pelo método de incorporação do vermelho neutro**

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que o silicone além de não apresentar citotoxicidade mostrou propriedades físico-químicas adequadas, podendo ser utilizado como matriz para imobilização de óleos essenciais naturais encapsulados no amido.

#### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelas bolsas de iniciação tecnológica; à FAPESP pelo apoio financeiro através do Projeto PIPE 07/59161-2; aos Engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira pela irradiação das amostras; à Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz pela preparação da placa de cultura celular.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Disponível em:

[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/cosmeticos!/ut/p/c4/04\\_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B\\_A3cvU\\_2CbEdFAIexhfl!/?WCM\\_PORTLET=PC\\_7\\_CG\\_AH47L00GOE90IOR99UI13000\\_WCM&WCM\\_GLOBAL\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/anvisa/inicio/cosmeticos/publicacao+cosmeticos/utilizacao+do+deet+e+outras+substancias+em+repelentes+para+insetos](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/cosmeticos!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B_A3cvU_2CbEdFAIexhfl!/?WCM_PORTLET=PC_7_CG_AH47L00GOE90IOR99UI13000_WCM&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/anvisa/anvisa/inicio/cosmeticos/publicacao+cosmeticos/utilizacao+do+deet+e+outras+substancias+em+repelentes+para+insetos)

Buddy Ratner, Allan Hoffman, Frederic Schoen and Jack Lemons (1996), “*Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*”, Academic Press (ed), California.

International Standard Organization (ISO): Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.

Karlsson, A. e Albertsson, A.C. (2002), “New selective method for quantification of organosilanol groups in silicone pre-elastomers”, *Biomacromolecules*. 3, 850-856.

Mark S. Fradin, MD (1998), “Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide”. *Ann Intern Med*. 128, 931-940.

Negrelle, R.R.B.; Gomes, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (2007), “Chemical composition and biological activities”, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9(1), 80-92.

Rogero, S.O., Lugão, A.B., Ikeda, T.I. e Cruz, A.S. (2003), “Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias”, *Mater. Res.* 6(3), 317-320.

Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Miyamaru, L. e Cruz, A.S. (2003). “Biocompatibility study of polymeric biomaterials”, *Artificial Organs*, 27(5), 424-427.

Sia, S.K., Whitesides, G.M. (2003), “Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies”, *Electrophoresis*. 24, 3563–3576.

Silva, F.S. (2009), “A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos”, *Rev. Tropica – Cie. Agr.Biol.* 3(3), 3-17.

Stefani, G. P., Pastorino, A.C., Castro, A.P.B.M., Fomim, A.B.F., Jacob, C.M.A. (2009), “Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças”, *Rev Paul Pediatr*, 27(1), 81-9.

## SILICONE COMO MATRIZ POLIMÉRICA PARA INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NATURAIS COM PROPRIEDADES REPELENTE DE INSETOS

Melanie Calderine<sup>1</sup>, Hugo Oda<sup>1</sup>, Nathália V. Reiter<sup>1</sup>, Claudemir Monteiro Jr<sup>1</sup>, Andréia B. N. de Andrade<sup>1</sup>, Sizue O. Rogero<sup>1</sup>, José R. Rogero<sup>1</sup>, Sandra Goraieb<sup>2</sup>, Ademar B. Lugão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo (SP), Brasil

<sup>2</sup>Millebolleblu Cosméticos Ltda, Paulínia (SP), Brasil

E-mail: sorogero@ipen.br

**Abstract.** Diseases transmitted by arthropods, such as malaria, yellow fever, dengue, among others, are important issues in public health. Haematophage mosquitoes can transmit infectious agents by inoculation at bite action. Use topic repellents are one of the alternatives to repel these insects. Many people show allergic reactions or even intoxication by traditional repellents. Based on this fact the goal of this work was the development of a polymeric matrix suitable for immobilization and incorporation of natural essential oils that have repellent properties. The studies were conducted utilizing medical grade silicone MED- 4735 cross-linked by ionizing radiation at 25kGy dose, being performed then the physical-chemical characterization by fraction gel and swelling test, as well as "in vitro" biological characterization by cytotoxicity test using the neutral red uptake technique. The results obtained showed that the silicone beyond presented no cytotoxicity showed appropriate physical-chemical properties and can be used as a matrix for the immobilization of natural essential oils

**Keywords:** Silicone, Essencial oils, Physical-chemical characterization, Ionizing radiation