

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Juliana dos Santos

**DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO, ESTUDOS DE PERMEAÇÃO
CUTÂNEA E POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR DE
FORMULAÇÕES DE REPELENTES À BASE DE N',N'-dietil-m-
toluamida**

Santa Maria, RS
2019

Juliana dos Santos

**DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO, ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA E
POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR DE FORMULAÇÕES DE REPELENTES À
BASE DE N',N'-dietil-m-toluamida**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Andréa Inês Horn Adams

Santa Maria, RS
2019

Santos, Juliana dos
DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO, ESTUDOS DE PERMEAÇÃO
CUTÂNEA E POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR DE FORMULAÇÕES DE
REPELENTES À BASE DE N',N'-dietil-m-toluamida / Juliana
dos Santos.- 2019.

76 p.; 30 cm

Orientadora: Andréa Inês Horn Adams
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. DEET 2. Repelentes 3. Validação 4.
Penetração/permeação I. Inês Horn Adams, Andréa II. Título.

Juliana dos Santos

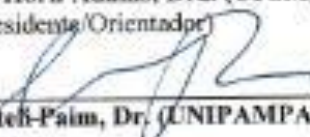
**DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO, ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA E
POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR DE FORMULAÇÕES DE REPELENTES À
BASE DE N',N'-dietil-m-toluamida**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 10 de janeiro de 2019:



Andréa Inês Horn Adams, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Clésio Soldaten-Paim, Dr. (UNIPAMPA)



Danielle Rubert Nogueira Librelotto, Dra. (UFSM)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Gilberto e Elizabete, responsáveis por tudo que sou. Os amo com todo meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Federal de Santa Maria pelo ensino público e de qualidade desde minha graduação. Tenho muito orgulho em fazer parte desta instituição.

Meus pais, Gilberto e Elizabete, que não medem esforços para me ver conquistando meus objetivos. Minha avó Lenir pelas orações e exemplo de coragem.

A minha orientadora, professora Andréa Adams, por quem tenho profunda admiração e respeito. Sua humanidade e dedicação são exemplo para todos os que com ela convivem. Obrigada por não medir esforços para que tivéssemos acesso as melhores condições de pesquisa. Mais que orientadora, tenho certeza que ao longo desses anos construímos uma amizade.

A todas as colegas de LABCQ, que estão ou já passaram por aqui, pela convivência diária, rodas de chimarrão resolutivas de problemas e momentos de descontração. Minhas lindas ICs Rebeca e Alieni que me ajudaram tanto durante a realização desse trabalho. Geovana, que chegou no finalzinho e também foi importante. Laís, tuas piadas bilíngues ajudaram a melhorar meu inglês e espanhol consideravelmente, obrigada pela amizade dentro e fora do lab. Priscila, tu merecias uma página inteirinha só para ti, obrigada por ser minha mãe científica, e até hoje me socorrer quando preciso. Tenho orgulho da amizade que construímos. Suelen, fica difícil te enquadrar em alguma dessas categorias de agradecimento, já que é minha colega de lab, amiga, confidente, e por último, mas não menos importante, comadre. Tua presença diária foi sempre imprescindível para que a sanidade fosse mantida e os problemas resolvidos. Obrigada por existir e me dar a honra de ser tua amiga.

Nadine, minha irmã de coração, que divide comigo o teto, as angústias e vitórias. Obrigada por ser meu pedacinho racional e um exemplo de coragem. Nada que eu escrevesse aqui traduziria o que construímos. Nós, sempre!

Meus amigos que foram meu porto seguro e a válvula de escape durante esse tempo. Vinícia e Vinícius minha dupla dinâmica. Bruna e Luis Gustavo amigos desde os primórdios de 2012. Meus amigos do bingo Aline, Matheus, Jonatan, Fran, Verônica, Susana e Leísa. Amanda, obrigada pelo nosso encontro de almas.

Cristine, minha amiga desde o ensino médio e que esteve sempre ao meu lado. Lucas, meu primo/amigo/irmão, obrigada pelo incentivo e por compartilhar comigo conquistas, desafios e esse temperamento que só bisa Carolina entenderia.

A todos que de uma forma ou de outra estiveram presentes nessa caminhada, meu muito obrigada!

RESUMO

DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO, ESTUDOS DE PERMEACÃO CUTÂNEA E POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR DE FORMULAÇÕES DE REPELENTES À BASE DE N',N'-dietil-m-toluamida

AUTORA: Juliana dos Santos
ORIENTADORA: Andréa Inês Horn Adams

A N',N'-dietil-m-toluamida (DEET) é a substância repelente mais utilizada no combate a mosquitos vetores de doenças como a dengue, febre amarela e chikungunya. No Brasil, o DEET é encontrado no mercado nas formas de aerossol, solução, loção e gel, em concentrações que vão de 6,65 a 25%. Até 2015, a monografia farmacopeica americana preconizava o doseamento do DEET na matéria-prima e em solução por espectroscopia no infravermelho, uma técnica pouco utilizada para essa finalidade. Na edição de 2016, esse método foi substituído por método de CLAE. Porém, ainda não constam monografias para outras formulações. Apesar do longo tempo no mercado, não se encontram disponíveis estudos comparativos quanto à penetração/permeação das formulações disponíveis, assim como estudos de irritação ocular por meio de métodos alternativos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi validar método analítico por CLAE-UV para o doseamento do DEET em loção, gel e solução, bem como avaliar comparativamente o efeito da composição da formulação na penetração/permeação da substância através das camadas pele, e por fim avaliar o potencial de irritação ocular de formulações comerciais de DEET pelo método alternativo HET-CAM. O método analítico foi desenvolvido em sistema cromatográfico Shimadzu, equipado com detector PDA, fase estacionária C18, fase móvel composta por metanol, acetonitrila e água pH 4,5, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 270 nm. O método demonstrou-se seletivo, confirmado através de testes de degradação forçada, já que em todas as condições de estresse a qual as amostras foram submetidas o pico do DEET apresentou pureza adequada e houve boa resolução entre os picos. O método foi linear na faixa estudada (2,5-100 µg mL⁻¹) e preciso, visto que os DPRs nos dois níveis estudados (repetibilidade e precisão intermediária) foram < 2%. A recuperação média para a exatidão esteve dentro do recomendado (98-102%). A robustez foi comprovada por meio de delineamento fatorial 2³, já que nenhum dos fatores estudados individualmente ou sua combinação foi capaz de afetar significativamente o doseamento do DEET (p>0,05). Considerando a via de administração, foi realizado estudo de fotoestabilidade sob radiação UVC. O DEET apresentou boa estabilidade e o estudo da cinética de degradação sobre luz UVC apresentou cinética de ordem zero. O estudo de penetração/permeação cutânea foi realizado em células do tipo *Franz*, utilizando pele de porco como membrana e tampão fosfato pH 7,4 adicionado de 0,5% de polissorbato 80 como meio receptor. Todas as formulações foram capazes de atravessar as camadas da pele, atingindo o meio receptor. A quantidade de DEET permeada foi dependente da formulação, sendo observada a ordem loção > gel > solução (p<0,05). Para a avaliação do potencial de irritação ocular, sete amostras de repelentes à base de DEET foram utilizadas e a maioria das formulações apresentou classificação como “irritante” ou “muito irritante”.

Palavras-chave: DEET. Repelentes. Validação. Penetração/permeação. HET-CAM

ABSTRACT

ANALYTICAL DEVELOPMENT, CUTANEOUS PERMEATION AND OCULAR IRRITATIVE POTENTIAL STUDIES OF FORMULATIONS OF N',N'-diethyl-m-toluamide BASED REPELLENTS

AUTHOR: Juliana dos Santos
ADVISOR: Andréa Inês Horn Adams

N', N'-diethyl-m-toluamide (DEET) is the most commonly repellent used against mosquito vectors of diseases such as dengue, yellow fever and chikungunya. In Brazil, DEET is found on the market in aerosol, solution, lotion and gel forms, in concentrations ranging from 6.65 to 25%. Until 2015, the pharmacopoeial method for DEET assay in bulk and solution used infrared spectroscopy, a technique little used for this purpose. In 2016 edition, this method was changed to an HPLC method. However, there is no pharmacopoeial method for the other forms. Despite the long time in the market, comparative studies on the penetration/permeation of different forms are not available, as well as studies of ocular irritation by alternative methods. In this scenario, the objective of this work was to validate an HPLC-UV method for the DEET assay in lotion, gel and solution, to evaluate the effect of the composition of the formulation on the penetration/permeation of the substance through the skin layers, and finally assess the potential for ocular irritation of formulations containing this substance available on the market by the alternative method HET-CAM. The analytical method was developed in Shimadzu chromatographic system, equipped with PDA detector, using C18 stationary phase, mobile phase composed of methanol, acetonitrile and water pH 4.5, flow rate of 1.0 mL min⁻¹ and detection at 270 nm. The method specificity was confirmed by forced degradation tests, since in all the stress conditions used the DEET peak purity was index appropriate and good resolution between the peaks was observed. The method was linear in the range studied (2.5-100 µg mL⁻¹) and showed good precision, since the DPRs in the two levels studied (repeatability and intermediate accuracy) were <2%. The average recovery for accuracy was within the recommended value (98-102%). Robustness was confirmed by factorial design 2³, because none of the single factors or the combination of them significantly affected the DEET assay (p> 0.05). Considering the administration route, the photostability of DEET was studied under UVC radiation. The DEET presented good photostability and it was observed zero order kinetic in the experimental conditions. The skin penetration/permeation study was performed on Franz type cells using porcine skin as a membrane and phosphate buffer pH 7.4 with 0.5% polysorbate 80 as the receptor medium. All formulations were able to cross through the skin layers, reaching the receptor medium. The amount of DEET permeated was dependent of the formulation, being lotion > gel > solution (p<0.05). For the evaluation of ocular irritation potential, seven samples of DEET-based repellents were used and most of them were classified as "very irritant" or "irritant".

Keywords: DEET. Repllents. Validation. Penetrarion/permeation. HET-CAM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 - Estrutura química do DEET..... 21
- Figura 2 - Rotas de transformação metabólica do DEET..... 24

MANUSCRITO

- Figure 1 - Chemical structure of DEET..... 37
- Figure 2 - Typical chromatograms obtained using the optimized conditions for HPLC method (a)Standard; (b) Lotion; (c) Gel; (d) Solution. MP: methylparaben; PP: propylparaben..... 45
- Figure 3 - Chromatograms obtained during forced degradation studies (a) DEET sample solution without degradation; (b) alkaline hydrolysis; (c) acidic hydrolysis; (d) UVA-light; (e) UVC-light; (f) thermal degradation; (g) oxidative degradation..... 47
- Figure 4 - Pareto chart to robustness study for HPLC method. Smaller bars than the t-critical value indicate lack of significance of the factor considered ($\alpha = 5\%$)..... 50
- Figure 5 - DEET degradation profile in UVC kinetics study at times 0, 12, 24, 48, 72 and 96 hours, for the lotion, gel and solution..... 51
- Figure 6 - Amount of DEET retained in *stratum corneum*, epidermis and dermis after 8 hours from DEET in lotion (LOT), DEET in gel (GEL) and DEET in solution (SOL). The results are expressed as mean \pm standard error (n =4)..... 53

APÊNDICE A

- Figura 1 - Curva concentração *versus* área obtida para o estudo da linearidade na faixa de 2,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 69

APÊNDICE D

- Figura 1 - Perfil de degradação do DEET no estudo de cinética de degradação UVC, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, para a ordem zero..... 74
- Figura 2 - Perfil de degradação do DEET no estudo de cinética de degradação UVC, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, para a ordem zero..... 74
- Figura 3 - Perfil de degradação do DEET no estudo de cinética de degradação UVC, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, para a ordem zero..... 75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

APÊNDICE E

- Figura 1- Célula vertical do tipo Franz, utilizada no estudo de penetração/permeação cutânea, com suas partes individualizadas..... 76
- Figura 2 Célula vertical do tipo Franz, utilizada no estudo de penetração/permeação cutânea, montada..... 76

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 -	Stress conditions used in forced degradation test and residual content of DEET under each condition (n = 3/condition).....	46
Table 2 -	Results obtained in repeatability and intermediary precision for different formulations.....	49
Table 3 -	Results to additional samples analyzed by validated method (n=3/formulation).....	50
Table 4 -	Ocular irritation rate and consequent classification to studied formulation by HET-CAM method.....	54

APÊNDICE A

Tabela 1 -	Avaliação da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos para o estudo da linearidade.....	69
Tabela 2 -	Análise de variância (ANOVA) para 3 retas utilizadas no estudo da linearidade.....	69

APÊNDICE B

Tabela 1 -	Estudo da exatidão do método analítico para a forma farmacêutica loção.....	70
Tabela 2 -	Estudo da exatidão do método analítico para a forma farmacêutica gel.....	70
Tabela 3 -	Estudo da exatidão do método analítico para a forma farmacêutica solução.....	71

APÊNDICE C

Tabela 1 -	Planejamento fatorial completo e resultados da análise da robustez para a loção.....	72
Tabela 2 -	Planejamento fatorial completo e resultados da análise da robustez para o gel.....	72
Tabela 3 -	Planejamento fatorial completo e resultados da análise da robustez para a solução.....	73

LISTA DE QUADROS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1	Repelentes disponíveis comercialmente no Brasil, concentrações e tempo de ação estimado.....	19
Quadro 2	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	27
Quadro 3	Métodos analíticos existentes para o doseamento de DEET em matrizes biológicas e produtos farmacêuticos.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Bovine corneal opacity and permeability
CAS	Chemical Abstracts Service
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia a líquido de Alta Eficiência
DEET	N',N'-dietil-m-toluamida
EC	Eletroforese capilar
HET-CAM	Hen's egg chorioallantoic membrane test
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Ministério da Saúde
NRO	Neurônio receptor olfatório
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
RO	Receptor Odorante
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO	17
3.2 REPELENTES DE INSETOS.....	18
3.3 DEET	21
3.3.1 Aspectos gerais.....	21
3.3.2 Características físico-químicas	21
3.3.3 Mecanismo de ação	22
3.3.4 Farmacocinética.....	23
3.3.5 Toxicidade	24
3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	26
3.5 FOTOESTABILIDADE.....	29
3.6 PENETRAÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	31
3.7 TESTES DE IRRITAÇÃO OCULAR	32
4. MANUSCRITO	35
5. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A – DADOS PARA O ESTUDO DA LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO VALIDADO POR CLAE.....	69
APÊNDICE B – DADOS PARA O ESTUDO DA EXATIDÃO DO MÉTODO POR CLAE.....	70
APÊNDICE C – DADOS PARA O ESTUDO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO VALIDADO POR CLAE.....	72
APÊNDICE D – ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO SOB RADIAÇÃO UVC	74
APÊNDICE E – ESTUDO DE PENETRAÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	76

1 INTRODUÇÃO

A transmissão de doenças pela picada de mosquitos, principalmente em zonas tropicais, tem levado a população a buscar produtos repelentes ou outros que exterminem esses insetos (BRASIL, 2002). Das 2500 espécies diferentes de pernilongos do planeta, 400 são identificadas como *Anopheles sp.*, e perto de 50 são vetores da malária. Pode-se citar também os *Culex sp.*, conhecidos como pernilongos caseiros, e os *Aedes sp.*, vetores da febre amarela, da dengue (no Brasil, o primeiro caso foi identificado no início do século XX), da febre chikungunya (reportada no Brasil pela primeira vez em 2014) e da zika (os primeiros casos foram notificados em 2015) (BRASIL, 2016a).

Em indivíduos com hipersensibilidade, além de vetores de doenças infecciosas, os insetos podem causar desconforto por suas picadas. Os problemas envolvem irritação local, prurido, pápulas, infecção secundária local, celulite, dor e até mesmo distúrbios do sono (CONCEIÇÃO, 2015; STEFANI et al., 2009). Além de pernilongos, outros artrópodes causadores de doenças humanas são encontrados no Brasil, como carrapatos, vespas, formigas, abelhas, entre outros (STEFANI et al., 2009). Conseqüentemente, o uso de repelentes representa importante hábito entre a população tanto no âmbito da comodidade como na prevenção de doenças.

Uma das substâncias mais usadas como repelente de insetos é a *N, N*-dietil-*m*-toluamida (DEET). Seu lançamento ocorreu nos Estados Unidos no ano de 1946, sendo que no Brasil seu uso é autorizado desde a década de 1950. Como repelentes conhecidos no mercado brasileiro que contêm DEET como substância ativa podem ser citados Autan®, OFF® e Repelex®, disponibilizados como spray, loção, gel e aerossol. Com relação ao uso, a legislação brasileira não permite o uso desse repelente em crianças menores de dois anos (BRASIL, 2013) e pode até ser considerado tóxico para crianças menores de doze anos, caso a posologia recomendada não seja cumprida.

No que se refere a métodos analíticos, a Farmacopeia Americana, até 2015, apresentava monografia para o doseamento do DEET em matéria-prima e solução tópica por espectroscopia no infravermelho, usando dissulfeto de carbono como solvente de análise (USP 38, 2015). Porém, na USP 39 (2016), essa técnica de doseamento foi substituída pela cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta (CLAE-UV), para a matéria-prima e solução. No entanto, ainda inexitem monografias farmacopeicas para as formulações de DEET em loção e gel. A literatura científica apresenta métodos analíticos

para doseamento do DEET em várias matrizes. Smallwood e colaboradores (1992), Abu-Qare e Abou-Donia (2001a), Kasichayanula e colaboradores (2005) e Sun & Zang (2017) desenvolveram métodos para matrizes biológicas por CLAE-UV. Kuklenyik e colaboradores (2013) e Wu e colaboradores (1979) validaram métodos para matrizes biológicas utilizando CLAE-MS e cromatografia gasosa (CG-MS), respectivamente. Pietrogrande e Basaglia (2007) e Song e colaboradores (2009) desenvolveram método analítico por CLAE-MS para o doseamento de DEET e demais produtos de cuidado pessoal na análise de efluentes ambientais. Ainda assim, nenhum dos métodos citados foi aplicado ao doseamento das formulações disponíveis comercialmente.

O DEET tem permeação cutânea já descrita, atingindo o sistema circulatório, sendo metabolizado e excretado principalmente na urina (FELDMAN; MAIBACH, 1970; SELIM et al., 1995; SUDAKIN; TREVTHAN, 2003; WU et al., 1979). O etanol atua como um promotor de absorção (LANE, 2013) e está presente em grande parte das formulações repelentes. Sendo assim, estudos de permeação foram realizados comparando o efeito do DEET isolado, ou diluído em proporções de solventes orgânicos como etanol e acetona sobre a permeação/penetração (ROSS; SHAH, 2000; QIU; McCALL, JUN; 1998). Outros buscaram avaliar o efeito do uso simultâneo de repelentes e fotoprotetores sobre a permeação/penetração (CHEN et al., 2010; KASICHAYANULA et al., 2007; WANG; GU, 2007). Quando se trata da permeação do DEET em suas formulações e a comparação entre elas, Stinecipher e Shah (1997) publicaram um estudo comparando a permeação de três soluções e uma loção contendo o repelente, em célula de difusão do tipo Franz, objetivando também verificar a influência da formulação. Neste estudo, foram apenas quantificados os níveis de DEET no compartimento receptor, como indicativo da penetração/permeação através da pele, não tendo sido quantificado o DEET em cada estrato cutâneo. Ao final das 36 horas da análise, os seguintes níveis de DEET foram quantificados no meio receptor: solução 95% ($54,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), solução 52,25% ($46,24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), loção 6,2% ($37,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), e solução 6,65% ($21,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). A permeação do DEET é indesejada devido a sua neurotoxicidade já relatada (ROY; GOSWAMI; PAL, 2017), bem como casos de convulsões (TENENBEIN, 1987) e influência no desenvolvimento fetal (WICKERHAM et al., 2012), tanto em modelos animais quanto humanos.

Face à ausência de método farmacopeico para doseamento do DEET em parte das formulações disponíveis no mercado brasileiro, à possível toxicidade decorrente da alta permeabilidade e à suscetibilidade de contato ocular dos usuários durante ou após a aplicação, esse trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico

simples, aplicável ao doseamento de DEET nas preparações solução, gel e loção, assim como estudos de permeação e irritação ocular dessas preparações.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade por CLAE para doseamento de DEET em repelentes disponíveis comercialmente e realizar estudos de irritação ocular e permeação/penetração cutânea de diferentes preparações disponíveis no mercado nacional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade por CLAE de fase reversa para o doseamento de DEET em repelentes disponíveis comercialmente nas formas farmacêuticas solução, gel e loção;
- Realizar estudo de fotoestabilidade dos produtos em estudo frente à radiação UVC, bem como determinar a cinética de degradação das formulações em estudo;
- Comparar a permeação/penetração cutânea das diferentes formulações à base de DEET em células de difusão tipo Franz;
- Estudar o potencial de irritação ocular de diferentes formulações pelo método alternativo HET-CAM.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO

Doenças transmitidas por vetores são doenças humanas causadas por parasitas, vírus e bactérias que são transmitidas por mosquitos, flebotomíneos, triatomíneos, moscas negras, carrapatos, ácaros, caracóis e piolhos. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que as doenças transmitidas por vetores representam mais de 17% de todas as doenças infecciosas, causando mais de 700.000 mortes anualmente. Mais de 3,9 bilhões de pessoas em mais de 128 países correm o risco de contrair dengue, com mais de 96 milhões de casos estimados por ano (OMS, 2017).

Os vírus transmitidos por picadas de insetos, principalmente mosquitos, são conhecidos por arbovírus. As arboviroses estão presentes principalmente em regiões de clima tropical, onde além das condições climáticas ideais para o desenvolvimento de insetos contribuem o desmatamento, a migração populacional, a ocupação desordenada de áreas urbanas e a precariedade das condições sanitárias. O aquecimento global tem se demonstrado um fator que proporciona a distribuição de doenças para regiões além das tropicais, como por exemplo, alguns países de clima temperado (LIMA-CAMARA, 2016; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). O fato é que, desde 2014, os principais surtos de dengue, malária, febre amarela, chikungunya e zika afetam populações, acabam com vidas e sobrecarregam os sistemas de saúde de muitos países (OMS, 2017).

Segundo dados do Instituto Evandro Chagas, órgão ligado ao Ministério da Saúde (MS), nas últimas três décadas o número de arbovírus catalogados no Brasil dobrou, e desses, pelo menos 37 são capazes de causar doenças. São exemplos de arbovírus a dengue, febre amarela, febre chikungunya, zika, febre de Mayaro e febre do Nilo ocidental.

Dengue, febre chikungunya e zika, transmitidas pelo *Aedes aegypti*, fazem parte da Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, do MS (BRASIL, 2016b). Tais doenças são de particular interesse visto que são endêmicas. No Brasil, a dengue tem relatos de casos desde o início do século XX, sendo que o primeiro caso confirmado na década de 80. Em 2014 e 2015, foram registrados os primeiros casos de febre chikungunya e zika autóctones no Brasil. Juntas, essas três patologias representam um grave problema de saúde pública para a população brasileira (BRASIL, 2018a).

Dados do MS de novembro de 2018 revelam que somente nesse ano já foram registrados 143.224 casos de dengue, sendo eles 261 casos de dengue grave, 130 óbitos

confirmados e 162 óbitos sob investigação. Para febre chikungunya foram confirmados 60.913 casos, 34 óbitos e 52 sendo investigados. Já para zika, registraram-se 3.308 casos e 2 óbitos. Ainda foram registrados 398 casos de zika em gestantes, as quais apresentam riscos ainda maiores em função de casos de microcefalia possivelmente associados ao vírus zika (BRASIL, 2018b).

O controle de tais doenças se dá principalmente pelo controle dos mosquitos vetores, impedindo sua proliferação. No caso da existência do mosquito, o controle se dá usando roupas adequadas, minimizando a exposição da pele ou o uso de inseticidas e repelentes de insetos, já que somente para a febre amarela existe vacina disponível na rede pública de saúde.

3.2 REPELENTES DE INSETOS

Os repelentes de insetos são produtos cosméticos classe II, usados no controle de artrópodes que são potenciais vetores de doenças, tais como a dengue, zika, febre chikungunya (transmitidas pelo *Aedes aegypti*) e febre amarela. Ao contrário dos inseticidas, os repelentes não têm função de eliminar os insetos. Eles agem formando uma camada na pele do usuário, o que mantém o inseto afastado (CONCEIÇÃO, 2015; STEFANI et al., 2009).

Produtos cosméticos classe II exigem comprovação de segurança e eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (BRASIL, 2005). A comprovação de segurança de produtos cosméticos repelentes de insetos se dá no ato da solicitação de registro, no qual a empresa solicitante deve apresentar, no mínimo, estudos de irritação cutânea primária acumulada, sensibilização cutânea e fotossensibilização realizadas no produto acabado (BRASIL, 2013). Já a comprovação da eficácia se dá pela apresentação, no ato da solicitação do registro, de estudos de eficácia do produto, realizados de acordo com metodologias validadas pela OMS ou pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e reconhecidas internacionalmente (BRASIL, 2013; EPA, 2016). Um dos testes de eficácia validado pela EPA, envolve a submissão do antebraço de voluntários em uma gaiola contendo mosquitos fêmeas. Aproximadamente após 30 minutos da aplicação do produto a ser testado, usando luvas nas mãos, expõe-se o antebraço tratado a intervalos/tempo de exposição pré-definidos, como por exemplo, cinco minutos de exposição a cada 30 minutos, e assim, são avaliadas as picadas do mosquito decorrentes desta exposição (EPA, 2010).

Deletre e colaboradores (2016) classificaram os repelentes em cinco grupos em função do comportamento apresentado pelo inseto quando exposto a este. Sendo assim, é possível que os repelentes atuem (1) causando movimentos orientados para longe da fonte de odor; (2) causando movimentos para longe do hospedeiro após ter havido contato; (3) evitando ou interrompendo o comportamento de alimentação do inseto; (4) mascarando o odor, por diminuir a atratividade do hospedeiro ou afetar a detecção e localização deste pelo mosquito ou ainda, (5) modificando a forma, cor ou ocultando o hospedeiro.

Os princípios ativos dos repelentes recomendados pela OMS são: (a) DEET, usada em crianças entre 2 e 12 anos na concentração máxima de 10%, e acima de 10% para maiores de 12 anos. O período de proteção máximo é de cerca de 6 horas; (b) icaridina (KB3023; 1-ácido piperidinocarboxílico 2-(2-hidroxi-1-etil)-1-metilpropilester), cujo uso é indicado para crianças a partir de 6 meses na versão gel, e a partir de 2 anos de idade na versão spray, em concentração de 25% e cujo período de proteção chega a 10 horas; e (c) IR 3535 (butilacetilaminopropionato de etila) 30%, permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para crianças acima de 6 meses. Seu período de proteção é de 4 horas.

Além das substâncias repelentes já citadas, pode-se incluir a capsaicina e a permetrina. Há também repelentes de origem vegetal, os quais são obtidos a partir dos óleos de citronela, andiroba, cedro, eucalipto e soja (KATZ; MILLER; HEBERT, 2008). Os repelentes a base de citronela, andiroba, óleo de cravo, entre outros de origem vegetal, não possuem comprovação de eficácia nem a aprovação pela ANVISA (BRASIL, 2016a).

No Quadro 1 são listados os repelentes disponíveis no Brasil. Pode-se observar que as formas de apresentação são variadas, assim como a concentração de substância ativa.

Quadro 1 – Repelentes disponíveis comercialmente no Brasil, concentrações e tempo de ação estimado

(continua)

Substância ativa	Produto (fabricante)	Formas de apresentação e concentração (%)*	Idade permitida*	Tempo de ação estimado
DEET	OFF Family (Johnson & Son)	Loção (7,79) Spray (6,65)	>2 anos	Até 2 horas
	OFF Family (Johnson & Son)	Aerossol (15)	>12 anos	Até 6 horas

OFF kids (Johnson & Son)	Loção (7,1) Spray (7,1)	>2anos	Até 2 horas
OFF Refresh (Johnson & Son)	Spray (15)	>12anos	Até 5 horas
OFF Cosmetic (Johnson & Son)	Loção (7,1)	>2 anos	Até 2 horas
OFF Longa Duração (Johnson & Son)	Aerossol (25)	>12 anos	Até 8 horas
Super Repelex (Reckitt Benckiser)	Spray (6,79) Loção (6,79) Aerossol (11)	>2 anos >2 anos >12 anos	Até 4 horas Até 3 horas Até 4 horas
Super Repelex kids (Reckitt Benckiser)	Gel (7,34)	>2 anos	Até 3 horas
Super Repelex Active Ação Prolongada (Reckitt Benckiser)	Spray (14,55)	>12 anos	Até 2,5 horas
Super Repelex Citronela (Reckitt Benckiser)	Spray (6,79) Loção (6,79)	>2 anos	Até 3 horas
No inset (Flora produtos de higiene)	Solução (8,5%)	>2 anos	Até 4 horas
Xô (Cimed)	Solução (8,05%)	>2 anos	Até 2 horas
Affast (Cimed)	Solução (5%)	>2 anos	Até 2 horas
Icaridina	Exposis infantil (Osler)	Gel (20)	>6 meses Até 10 horas
	Exposis Extreme (Osler)	Spray (25)	>2 anos Até 10 horas
	Exposis infantil (Osler)	Spray (25)	>2 anos Até 10 horas
	Exposis Spray (Osler)	Spray (25)	>2 anos Até 10 horas
	SBP Advanced	Gel e spray **	>6 meses Até 5 horas
	SBP Advanced Kids	Spray **	>6 meses **
IR3535 (Johnson & Johnson)	Loção antimosquito Loção**	>6 meses	Até 4 horas

*informações fornecidas pelo fabricante; **concentração não fornecida pela empresa fabricante
Adaptado de STEFANI, 2009

3.3 DEET

3.3.1 Aspectos gerais

O DEET é uma das mais antigas substâncias repelentes existentes. Sua descoberta data dos anos 40 quando foi sintetizada pelo Departamento da Agricultura americano, para o uso do exército. No ano de 1957 seu uso pela população civil foi liberado (BROWN; HEBERT, 1997; KATZ; MILLER; HEBERT 2008).

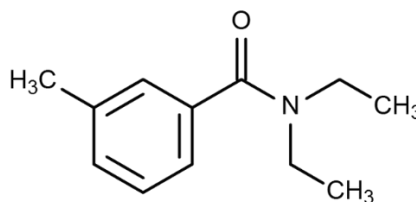
O DEET é eficiente na repelência de mosquitos e carrapatos, e pode ser encontrado no mercado brasileiro e no exterior em concentrações que vão de 4 a 100%. Em altas concentrações, porém, o DEET pode ser tóxico, principalmente para crianças menores de 12 anos. Nesse sentido, a legislação brasileira permite o uso de repelentes que contenham DEET somente em crianças de dois a doze anos de idade, desde que a concentração do ingrediente ativo não seja superior a 10% e que a aplicação não seja superior a três vezes ao dia, evitando-se o uso prolongado. Além disso, repelentes que possuam uma concentração maior do que 30% podem ser usados apenas por maiores de 12 anos de idade desde que estudos de avaliação de risco em humanos sejam conduzidos (BRASIL, 2013).

Quanto a forma de apresentação, no Brasil, o DEET pode ser encontrado em solução, loção, gel e aerossol. Já no exterior também existe na forma de creme, roll-on, espumas e lenços (TAVARES et al., 2018).

3.3.2 Características físico-químicas

O DEET (Figura 1) é uma carbonamida aromática dissustituída. Sua matéria-prima apresenta-se como líquido incolor, de odor leve e agradável (USP, 2016).

Figura 1 – Estrutura química do DEET



Fonte: CHEMICALIZE, 2018

Algumas características físico-químicas do DEET estão apresentadas abaixo (CHEMICALIZE, 2018; DRUG BANK, 2018; SCIFINDER, 2018):

CAS: 134-62-3

Fórmula química: C₁₂H₁₇NO

Massa molecular: 191,27 g.mol⁻¹

Densidade: 0,0997 g mL⁻¹

Ponto de ebulição: 288 – 292°C

Log P: 2,50

Solubilidade: praticamente insolúvel em água e glicerina. Miscível com álcool, álcool isopropílico, éter, clorofórmio e dissulfeto de carbono (USP, 2016).

3.3.3 Mecanismo de ação

O DEET é classificado como um repelente mascarante de odor, pois interfere na detecção/localização ou diminui a atratividade do hospedeiro com relação ao inseto (DELETRE et al., 2016). Porém, o mecanismo de ação exato de como o DEET modula os receptores específicos em insetos ainda são desconhecidos ou incompreendidos (LEGEAY et al., 2018), ainda que existam diversos estudos que tentam elucidar como o DEET age nos receptores olfativos, tanto como agonistas ou como antagonistas. Um dos consensos é de que a excitação/inibição dos receptores olfativos de ácido láctico está diretamente ligada à percepção dos odores (DICKENS; BOHBOT, 2013). Estudo realizado por Davis e Sokolove demonstrou que o DEET diminui a sensibilidade dos neurônios receptores olfatórios (NROs) dos insetos ao ácido láctico, componente do suor humano, modificando ou bloqueando a resposta dos NROs, que normalmente seriam sensíveis a tais atrativos (DAVIS; SOKOLOVE, 1976). Em estudo com *A. aegypti* ficou demonstrado que o DEET e outros repelentes estimulam receptores odorantes (ROs) específicos, ou ainda bloqueiam as respostas desses ROs a atrativos. Isso faz com que as mensagens recebidas pelo sistema nervoso central fiquem confusas, e os insetos desorientados (BOHBOT; DICKENS, 2010). Syed e Leal demonstraram que o DEET pode agir como um sequestrante de outros componentes atrativos aos mosquitos, presentes na pele humana como o octanol, levando a menores respostas dos receptores de octanol em mosquitos *A. aegypti* (SYED; LEAL, 2009). Uma hipótese adicional é que uma interação direta entre o DEET e receptores gustativos possa suprimir o comportamento alimentar dos insetos (LEE; KIM; MONTELL, 2010).

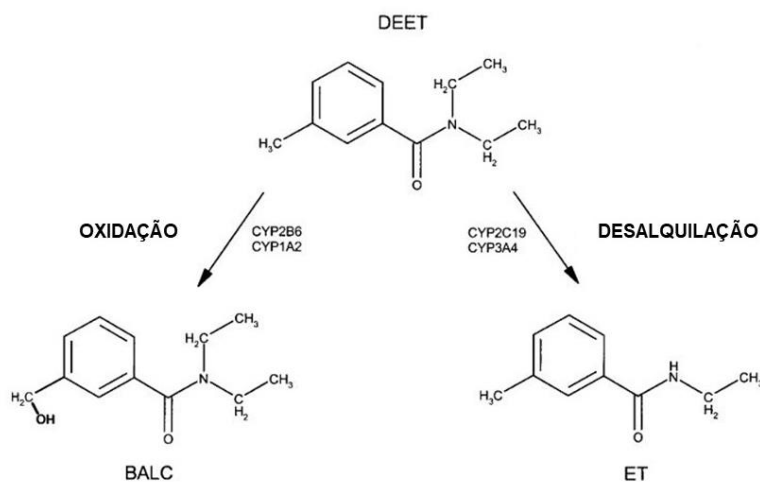
3.3.4 Farmacocinética

A farmacocinética do DEET é descrita em cães e humanos. Cães da raça beagle foram usados para estudar a farmacocinética do DEET a partir das vias intravenosa e dérmica (QIU; JUN; TAO, 1997). A farmacocinética do DEET foi linear no intervalo de doses de 2,5-6,0 mg/kg, com uma meia vida de eliminação de 2,56 h. O volume de distribuição no estado estacionário, depuração sistemática e tempo médio de permanência indicaram que o DEET foi submetido a extensa distribuição extravascular e rápida eliminação. Após a aplicação dérmica de uma loção comercial a 15 mg de DEET/kg, as concentrações plasmáticas de DEET atingiram o pico no intervalo de 1-2 h após a aplicação. A biodisponibilidade transdérmica de DEET e o tempo médio de absorção foram 18,3% e 2,05 h, respectivamente.

Feldmann e Maibach (1970) relataram que 16,7% da dose aplicada, de um a solução preparada em acetona, no antebraço de quatro voluntários foi absorvida. A absorção de DEET radiomarcado no antebraço de homens foi investigada sob condições controladas (SELIM et al., 1995). O percentual de absorção do DEET de grau técnico foi de 5,6%, enquanto que a solução a 15% em etanol, apresentou absorção de 8,4%, indicando o etanol como um promotor de absorção. A maior parte absorvida foi excretada em 12 horas na urina, sendo que em 24 horas a totalidade já estava excretada, totalmente metabolizada. Metabólitos urinários de DEET foram identificados ao longo de 36 horas após a exposição de 10,4g de uma formulação comercial (WU et al., 1979). O composto principal foi detectado por 18 horas após exposição. De maneira geral, o metabolismo de DEET pode diferir conforme as diferentes aplicações diárias ou níveis altos de exposição dérmica do produto (SUDAKIN; TREVTHAN, 2003).

A maioria das informações sobre o metabolismo do DEET é derivado de estudos em animais. Com base nas reações de transformação metabólica que foram identificadas no rato (SCHOENIG et al., 1996), duas vias principais foram identificadas (Figura 2). Uma reação envolve hidroxilação oxidativa do grupo metila aromática na posição meta, produzindo N, N-dietil-m-hidroximetilbenzamida (BALC). A outra reação principal envolve desalquilação de um grupo N-etila, produzindo N-etil-m-toluamida (ET). Podem também ocorrer reações subsequentes de oxidação, hidroxilação e glucuronidação, o que pode explicar os metabólitos adicionais (por exemplo, N, N-dietil-m-carboxilbenzamida) que foram detectados em humanos (SELIM et al., 1995; WU et al., 1979).

Figura 2 – Rotas de transformação metabólica do DEET



Adaptado de SUDAKIN; TREVTHAN, 2003.

3.3.5 Toxicidade

Estudos evidenciaram efeitos neurotóxicos do DEET, sendo sugerido que esse efeito seja mediado pela indução da apoptose neuronal (ABU-QARE; ABOU-DONIA, 2001b). Verschoyole e colaboradores (1992) verificaram a ocorrência de mielopatia espongiforme em ratos, quando esses foram expostos a doses orais de 1-3 g/kg de DEET. Quando uma dose próxima à DL50 oral (2,170 e 3,664 mg/kg) foi administrada em ratos, os mesmos apresentaram uma diminuição na reatividade e tônus muscular. Espasmos de cabeça e corpo também puderam ser observados (EPA, 1998). Em outro estudo utilizando ratos (CHANEY; ROCKHOLD; HUME, 2002), a administração intraperitoneal de uma dose de DEET 300 mg/kg aumentou o volume e diminuiu a pressão sanguínea. Com uma dose ainda maior (500 mg/kg) houve diminuição da taxa respiratória e cardíaca. A aplicação dérmica subcrônica de DEET em ratos adultos resultou em morte celular neuronal difusa no córtex cerebral, no hipocampo e cerebelo, levando a muitas anormalidades fisiológicas, farmacológicas e comportamentais, particularmente disfunção de memória e déficits motores e de aprendizagem (ABDEL-RAHMAN; SHETTY; ABOU-DONIA, 2001).

Casos de intoxicação por DEET em humanos estão relacionados à ingestão de altas concentrações do produto, e as consequências mais comuns relatadas são hipotensão, convulsões e coma após uma hora da ingestão (TENENBEIN, 1987). A ingestão de uma solução de DEET 40%, por seis vezes, levou um paciente de 37 anos à parada cardíaca e morte. Ele ainda apresentou acidemia, taquicardia, hipotensão e edema cerebral (WILES et

al., 2014). Wickerham e colaboradores (2012) analisaram o sangue do cordão umbilical de 112 bebês nascidos a termo, e detectaram a presença de DEET em 73% deles, além de outros pesticidas. Os autores sugeriram que a exposição a esses produtos afetou o crescimento fetal. Um caso de encefalopatia também já foi descrito após a exposição dermal de uma criança de 18 meses de vida frente a um repelente contendo 17,6% de DEET (BRIASSOULIS; NARLIOGLOU; HATZIS, 2001).

A indução de isoformas da enzima CYP pelo DEET e a citotoxicidade em hepatócitos humanos primários também foram estudadas (DAS et al., 2008). O DEET induziu significativamente a expressão de RNAm de CYP3A4, CYP2B6, CYP2A6 e CYP1A2 em hepatócitos humanos primários. Em função disso, o estudo sugeriu que o DEET pode ser prejudicial à saúde humana. Efeitos genotóxicos significativos do DEET também foram observados quando estudados em células da mucosa nasal humana. Tal efeito demonstrou-se dependente da dose aplicada (TISCH et al., 2002). A aplicação do DEET em crianças não é recomendada pois mesmo com a administração de doses baixas foram relatados efeitos como convulsões e dificuldades respiratórias (BRIASSOULIS; NARLIOGLOU; HATZIS, 2001).

Os Estados Unidos possuem um sistema de vigilância pós-comercialização que registra eventos médicos associados ao DEET. Osimitz e colaboradores (2010) avaliaram os dados reportados no período de 1995 a 2001, que totalizaram 242 casos de gravidade moderada a grave. Deste total, 36 (14,9%) apresentaram fortes indícios de estarem associados ao uso do repelente, enquanto 157 (65%) foram possivelmente relacionados ao contato com DEET. Dos casos restantes, 49 (20,2%) não tiveram sua causalidade determinada em função da insuficiência dos dados. Casos que atingiram crianças de 19 anos ou menos representaram 41% dos casos. Ainda, 42% das crianças apresentaram convulsões moderadas ou graves. Os dados analisados não indicaram uma relação entre a gravidade do caso e a concentração de DEET, ou até mesmo ao uso concomitante a outros medicamentos. Tendo em vista os dados disponíveis, os autores consideraram o risco de episódios neurológicos graves relacionados ao uso de repelentes à base de DEET bastante baixo (OSIMITZ et al., 2010).

Embora a icaridina, outra substância recomendada pela OMS para uso como repelente, esteja disponível no mercado dos EUA desde 2005, poucos dados estão disponíveis para documentar a toxicidade relacionada a este produto e é amplamente baseado em estudos em animais (CHARLTON et al., 2016). A icaridina possui baixa toxicidade em ratos e camundongos após administração oral (DL50: 4743 mg / kg), e em ratos após exposição dérmica (LD50:> 5000 mg / kg) e exposição por inalação (DL50:> 4364 mg / kg) (OMS, 2000). Em coelhos, não apresenta irritação dérmica e limitada irritação ocular (OMS, 2000;

EPA, 2005). A icaridina não mostrou sensibilização cutânea ou fototoxicidade (OMS, 2000; EPA, 2005). Em um teste de toxicidade dermal aguda, nenhum sinal de neurotoxicidade anatômica comportamental ou patológica foi observado em 2000 mg / kg (OMS, 2000; EPA, 2005). Já o IR3535 teve a segurança comprovada em extensos estudos toxicológicos (toxicidade aguda, irritação aguda, sensibilização, exposição repetida, genotoxicidade e citotoxicidade) (BROSCHARD et al., 2013).

3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Técnicas como a CG, CLAE e a eletroforese capilar (EC) se destacam na química analítica pela capacidade inerente de separar compostos químicos e pela habilidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, biológicas, farmacêuticas e em alimentos (RIBANI, 2004). Para que tais metodologias sejam empregadas, os métodos aplicados a elas precisam estar previamente validados para que então possam ser reproduzíveis, representem exatamente o que está em análise, e demonstrem que o método é adequado ao uso pretendido (BARROS, 2002; BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Os parâmetros analíticos que devem ser avaliados durante a validação de um método levam em conta o tipo de metodologia e sua aplicação. Para técnicas analíticas que fazem uso de CLAE, os compêndios oficiais especificam os parâmetros a serem analisados, sendo eles (BRASIL, 2017; ICH, 2005):

- Seletividade;
- Linearidade;
- Intervalo;
- Precisão;
- Limite de detecção;
- Limite de quantificação;
- Exatidão;
- Robustez.

É importante ressaltar que nem todos os parâmetros indicados precisam ser avaliados. Dependendo da finalidade do método é exigido um conjunto de testes específicos, conforme o exposto no Quadro 2.

Uma qualidade também importante para um método analítico é que ele seja indicativo de estabilidade, ou seja, consiga detectar e quantificar os produtos de degradação formados quando da degradação real da substância em estudo. Para que se obtenham esses prováveis

produtos de degradação é preciso causar a degradação em maior escala, expondo a substância a condições mais extremas que aquelas praticadas nos estudos de estabilidade de longa duração. Tais testes são chamados de estudo de degradação forçada (BRASIL, 2015). Portanto, para desenvolver um método analítico indicativo de estabilidade, os estudos de degradação forçada são um importante aliado. O desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade se faz necessário principalmente após a divulgação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº53 pela ANVISA (BRASIL, 2015), que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. É importante ressaltar que o DEET não se classifica como um medicamento e sim como um cosmético, mas espera-se dele um comportamento estável, já que entrará em contato com o paciente de maneira semelhante a um medicamento.

Quadro 2 – Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento - dissolução (quantificação) - uniformidade de conteúdo -potência
		Quantitativo	Ensaio-limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim ⁽¹⁾	Não	Sim ⁽¹⁾
Seletividade ⁽²⁾	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Não ⁽³⁾	Sim	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não ⁽³⁾
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

⁽¹⁾Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

⁽²⁾Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

⁽³⁾Pode ser necessário em alguns casos.

Fonte: RDC 166 (BRASIL, 2017)

Até o ano de 2015, a USP trazia monografia para o doseamento do DEET em matéria-prima e em solução por espectroscopia por infravermelho, técnica pouco usual para esse fim, visto que essa técnica é reconhecidamente utilizada para identificação de compostos por diferenciar grupos funcionais (REICH, 2005). Porém, em 2016, a mesma farmacopeia trouxe monografia para o doseamento de DEET em matéria-prima e solução por CLAE-UV, utilizando como fase móvel mistura de uma solução de ácido fosfórico 0,1% e metanol na proporção 45:55, coluna C18 (4,6 mm x 15 cm; 3,5 µm) e detecção em 235 nm (USP 39, 2016).

Também são encontrados na literatura métodos aplicados, principalmente, a diversas matrizes biológicas, os quais estão sumarizados no Quadro 3. Além dos já citados, que são métodos de CLAE, há outros desenvolvidos por cromatografia gasosa, acoplados a detector de massas, voltados à análise do DEET em urina ou na análise de efluentes.

Para as formulações de DEET, porém, não há descrito na literatura método analítico validado indicativo de estabilidade, que seja capaz de analisar todas as formulações disponíveis, incluindo as formas farmacêuticas loção, solução e gel.

Quadro 3 – Métodos analíticos existentes para o doseamento de DEET em matrizes biológicas e produtos farmacêuticos

(continua)

Aplicação	Fase móvel	Coluna	Detecção	Autor
Urina	MeOH:H ₂ O (62:38)	C8	UV 240 nm	SMALLWOOD et al., 1992
Plasma	ACN:Acetato de amônio pH 4,5, 0,03 M (36:64)	C8	UV 220 nm	QIU; JUN, 1996
Plasma e urina	ACN:H ₂ O, pH 3,2 (gradiente)	C18	UV 251 nm	ABU-QARE; ABOU- DONIA, 2001a
Plasma, urina pele	MeOH:H ₂ O pH 2,83 (gradiente)	C18	UV 254 nm	KASICHAYANULA et al., 2005
Urina	MeOH:ácido acético 0,1% (10:90)	Fenil	Massas	KUKLENYIK et al., 2013

(conclusão)

Aplicação	Fase móvel	Coluna	Deteção	Autor
Solução	MeOH:H ₂ O (57:43)	C18	UV 220 nm	SIBAJA; FANDARUFF; DELGADO, 2013
Gel com lipossomas	Tampão Acetato de amônio 0,03M pH 4,5:ACN (60:40)	C18	UV 250 nm	MIRANDA, 2005
Emulsões	ACN:MeOH: H ₂ O pH 2,8 (65:20:15)	C18	UV 254 nm	WANG et al., 2014
Microcápsulas	ACN: H ₂ O (50:50)	C8	UV 190 nm	KARR; SPEAKER; KASTING, 2012
Resíduos ambientais	MeOH: ACN: Tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (15:15:70)	C18	Massas	SONG et al., 2009
Resíduos ambientais	ACN: H ₂ O (55:45)	C18	UV 210 nm	MA, 2017

3.5 FOTOESTABILIDADE

A exposição de fármacos e ativos cosméticos às radiações visível e UV é inevitável, principalmente após aplicação tópica do produto. Sendo assim, produtos que sejam fotossensíveis podem degradar, tornando ineficaz a aplicação tópica de muitas substâncias (PAESE et al., 2009; TURSILLI et al., 2007).

O estudo de fotoestabilidade é atualmente uma importante ferramenta para sugerir a estabilidade de fármacos e formas farmacêuticas dentro da indústria (SILVA et al., 2009). A avaliação da fotoestabilidade, prevista nos estudos de degradação forçada (ICH, 2003), consiste em duas etapas: testes de degradação forçada e testes confirmatórios (ICH, 1996).

O teste de degradação forçada envolve o fármaco isolado ou em suspensão/solução, disposto em recipientes transparentes e quimicamente inertes (ICH, 1996). Soluções do fármaco são mais susceptíveis e particularmente relevantes na compreensão do

comportamento do produto em solução. Podem ser usadas várias condições de exposição, que dependerão da fotossensibilidade da substância e da intensidade das fontes de radiação empregadas (TØNNESEN, 2004). Se nos estudos de degradação forçada não forem observados produtos de degradação, não são necessários estudos confirmatórios (ICH, 1996).

Os estudos confirmatórios são, normalmente, realizados de modo sequencial, iniciando-se pelo produto totalmente exposto, o produto protegido pela embalagem primária e então pela embalagem secundária. O teste deve ser conduzido até que os resultados demonstrem que o produto esteja adequadamente protegido da luz (TØNNESEN, 2004; ICH, 1996).

Nos últimos anos, os estudos de fotoestabilidade vêm se destacando no cenário da pesquisa dos produtos farmacêuticos. Isso se deve ao crescente aumento do número de fármacos fotolábeis reportados e às exigências dos estudos de estabilidade, pelos órgãos regulatórios, para o registro e comercialização de medicamentos (TØNNESEN, 2004).

As fontes de radiação empregadas nos testes de fotoestabilidade estão descritas na legislação vigente (BRASIL, 2012). Pode ser utilizada uma fonte de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65, como uma lâmpada fluorescente artificial combinando emissão visível e UV. A amostra pode ainda ser exposta à combinação da lâmpada branca fluorescente fria, similar à ISO 10977 e da lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350nm e 370nm.

Conceição (2015) avaliou a estabilidade de repelentes comerciais, bem como sua associação com filtros solares, frente a radiações UVA e UVB durante 8 horas, por espectroscopia Raman, técnica espectroscópica vibracional que permite a identificação de grupos funcionais através do espalhamento de luz monocromática, pela determinação a natureza das ligações químicas presentes (MILLEN; DE FARIA; TEMPERINI, 2005). Os resultados indicaram que o DEET isolado não apresentou fotodegradação após a exposição às radiações, evidenciado pela manutenção do perfil dos picos de Raman. Por sua vez, a formulação contendo DEET em meio etanólico apresentou alterações no espectro de Raman, sugerindo uma provável degradação e a interferência desse solvente na estabilidade da substância.

3.6 PENETRAÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando um total de 5% do peso corporal, e tem a capacidade de absorver diversas substâncias que penetram até as estruturas mais profundas e que, portanto, podem atingir a corrente circulatória. Suas principais funções são regular a pressão sanguínea e conferir proteção, como por exemplo, contra a perda de substâncias endógenas, ou ameaças do ambiente como temperaturas extremas, substâncias tóxicas, radiação UV (AULTON, 2005; BARRY, 1983; WILLIAMS, 2012).

Estima-se que a via transepidérmica seja a principal via de permeação de fármacos (SUHONEN et al., 1998). Assim, a absorção percutânea via transepidérmica envolve a difusão através do estrato córneo, das células viáveis da epiderme e, finalmente, das camadas superiores da derme até à microcirculação. O passo determinante da absorção cutânea é a penetração através do estrato córneo. As proteínas desta camada constituem uma camada descontínua, enquanto que a fase lipídica é contínua. Existem três vias passivas, pelas quais uma molécula pode atravessar o estrato córneo: intercelular, transcelular e via apêndices (MORAES, 2015).

Na administração de medicamentos ou cosméticos pela via cutânea, é necessário que haja acúmulo de substância ativa na pele, seja o produto de ação sistêmica ou ação tópica. Assim, o conhecimento sobre o fluxo de fármacos através da pele é imprescindível e testes de penetração/permeação cutânea tornam-se necessários (OECD, 2004a).

Os estudos *in vitro* têm ganhado força, primeiramente pela não necessidade do uso de animais vivos durante o experimento. O ensaio de penetração/permeação *in vitro* mais comumente realizado é o que utiliza células de difusão, do tipo Franz. Basicamente, a célula de difusão é constituída de uma parte superior denominada compartimento doador e uma parte inferior, o compartimento receptor, separados por uma membrana, que consiste em membrana da pele de mamíferos, como seres humanos, rato e porco. A pele humana é considerada o padrão ouro para os estudos de permeação *in vitro*. Já a pele de porco é uma das mais utilizadas em função da sua estrutura semelhante com a pele humana (BARBERO; FRASCH, 2009; DIEMBECK et al., 1999; MORAES, 2015; OECD 2004a).

É importante que as condições termodinâmicas, principalmente a temperatura do meio receptor, sejam controladas durante todo o experimento e a superfície da pele na célula de difusão deve ser mantidas a 32 ± 1 °C, simulando temperatura normal da pele (OECD, 2004).

O DEET tem alta penetração/permeação cutânea, com absorção sistêmica e uma gama de reações adversas locais e sistêmicas decorrentes de sua utilização relatadas

(STINECIPHER; SHAH, 1997). Estudos de permeação já descritos do DEET incluem testes com o composto em solução, ou da solução associada a filtros solares, como a oxibenzona (KASICHAYAULA et al., 2007; WANG; GU, 2007), e ainda a influência de solventes como o etanol na sua absorção (STINECIPHER; SHAH, 1997).

3.7 TESTES DE IRRITAÇÃO OCULAR

Cosméticos e produtos de uso tópico podem entrar em contato com a região dos olhos e demais mucosas e assim, causar irritação a essa região sensível do corpo humano. Essa propriedade irritativa pode ser atribuída às características tanto da substância majoritária quanto da composição da formulação. Diferentes mecanismos estão envolvidos no processo de irritação ocular, sendo a desnaturação de proteínas uma das mais descritas, já que causa opacidade da córnea. Os tensoativos são um dos principais componentes das formulações com capacidade de desnaturação de proteínas, em função da sua natureza química, a qual possui alta afinidade com as macromoléculas (MITJANS; INFANTE; VINARDELL, 2008).

Nos anos de 1940 foram desenvolvidos por Draize testes que visavam prever a irritação de substâncias que por ventura entrassem em contato com a pele e os olhos. O coelho foi usado como modelo animal para o teste ocular, tendo em vista sua alta suscetibilidade à irritação. Assim, as formulações que são testadas como potenciais irritantes de mucosas são aplicadas na córnea do coelho e as mudanças na córnea, conjuntiva e íris são observadas durante determinado tempo, comumente até 96 horas de contato, mas podendo ser observado em tempos maiores. Para cada formulação estudada são usados até 6 animais, podendo ser reduzido a quatro se ocorrem danos oculares severos (DRAIZE; GEOFFREY; CALVERY, 1944). Passados pouco mais de 30 anos após a proposição desses testes, já haviam críticas em função do uso excessivo de animais, dos danos causados a eles e da baixa correlação entre os resultados encontrados em coelhos e humanos (MAUL; SEARS, 1976).

A irritação ocular do DEET foi estudada por meio de teste de Draize (MACRAE et al., 1984). O estudo avaliou comparativamente soluções da substância a 100%, 100% etanol, e uma solução a etanol:DEET (80:20). Diferentes volumes também foram aplicados 10, 30 ou 100 µL. Ao longo de 168 horas, largura da córnea, inchaço conjuntival, opacidade da córnea e reação da íris foram medidos. Ao final de cada tempo, cada olho era corado com fluoresceína a fim de verificar a extensão do dano, sendo que a capacidade de re-epitelização da córnea após o dano também foi determinada. O estudo demonstrou que o volume de 10 µL foi melhor para prever a toxicidade, as soluções mais tóxicas foram etanol:DEET (80:20), DEET

100% e etanol 100%, respectivamente. Apesar de todas as substâncias testadas apresentarem toxicidade ocular, a reversão do dano foi obtida após 10 dias.

Ao longo dos anos, como alternativa aos testes usando animais, surgiram testes que pretendem prever a irritação ocular de substâncias *in vitro*. Os modelos utilizados podem ser classificados em 5 categorias (LEE; HWANG; LIM, 2017): modelos *ex vivo* oculares, *ex vivo* não oculares, químicos, celulares e 3D de epitélio humano reconstruído semelhante a córnea. Os testes mais utilizados para identificar produtos pouco ou severamente irritantes são o BCOP (do inglês *bovine corneal opacity and permeability*) (GAUTHERON et al., 1994), classificado como modelo *ex vivo* oculares e o HET-CAM (*Hen's egg chorioallantoic membrane test*) (LUEPKE, 1985), modelo *ex vivo* não ocular. O BCOP é um modelo experimental reconhecido pela OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) (OECD, 2009).

O HET-CAM é um dos métodos mais utilizados dentre os desenvolvidos e representa um bom método para avaliar formulações de diferentes substâncias. Apresenta vantagens como a rapidez na obtenção dos resultados, boa sensibilidade e uma redução no número de animais utilizados (VINARDELL; MACIAN, 1994). A metodologia utiliza ovos embrionados fertilizados de galinhas no 10º dia de incubação, período no qual o sistema nervoso do animal ainda não está formado e não possibilita a percepção da dor. Na membrana cório-alantóide, localizada na câmara superior dos ovos, onde estão desenvolvidos vasos sanguíneos, é aplicada a formulação que se pretende testar e reações irritativas como hemorragia, coagulação e vasoconstrição são observadas. De acordo com o tempo no qual essas reações ocorrem, elas são relacionadas a um *score* que então fornecerá o grau de irritação ocular.

Ao longo dos anos, estudos têm demonstrado a aplicabilidade do HET-CAM na detecção de substâncias com potencial irritativo, principalmente materiais solúveis em água, com especial destaque aos tensoativos. Cosméticos e produtos de aplicação tópica são produtos frequentemente testados.

Xampus possuem alta quantidade de tensoativos que tem por função aumentar a espuma formada. Em estudo de 2017, Derouiche e testou 6 diferentes produtos, sendo 4 adultos e 2 infantis, estando as amostras diluídas ou não, os resultados demonstraram que o HET-CAM é um teste confiável e prático para controlar o potencial de irritação ocular de xampus (DEROUICHE; ABDENNOUR, 2017).

Ao comparar o potencial de irritação ocular de removedores de maquiagem por meio de diferentes testes *in vitro*, dentre eles o HET-CAM, Debbasch e colaboradores relacionaram os ensaios com achados clínicos. Os resultados do HET-CAM e dos ensaios clínicos foram

correlacionados com alguns sinais clínicos como prurido, queimação e vermelhidão, mas os autores não consideraram essa relação relevante já que o HET-CAM classificou todas as amostras testadas como potenciais irritantes, enquanto os mesmos produtos tiveram boa aceitação no ensaio clínico (DEBBASCH et al., 2005).

4. MANUSCRITO

A partir dos resultados obtidos durante a realização desse projeto, elaborou-se o manuscrito aqui apresentado, o qual será submetido a periódico científico (a decidir). São apresentados os resultados advindos dos estudos de validação, dos testes de penetração/permeação cutânea e irritação ocular, conduzidos comparativamente entre os repelentes à base de DEET. Os resultados foram obtidos por experimentos realizados no Laboratório de Avaliação Biofarmacêutica e Controle de Qualidade (LABCQ), localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

DEET repellents: analytical development, *in vitro* skin penetration/permeation and *in vitro* ocular irritant potential of different formulations

SANTOS, J¹; LOURENÇO, RL²; ADAMS, AIH²

¹Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

²Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Address all correspondence to Prof. Dr. Andréa I. H. Adams. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av Roraima, 1000. Santa Maria/RS - CEP 97105-900. Tel.: +55

55 3220 8661 Fax: +55 55 3220 8248 E-mail: andrea.i.h.adams@gmail.com

Abstract:

N',N'-diethyl-m-toluamide (DEET) is the most used repellent substance around the world. In this study a simple, isocratic and stability-indicating HPLC method was validated to assay DEET in lotion, gel and solution, by the same analytical conditions, which were: C-18 column, mobile phase composed by methanol, acetonitrile and water pH 4.5 (45:10:45), flow rate at 1 mL min⁻¹ and detection at 270 nm. Forced degradation test was applied to all the formulations studied and improved the method specificity. The method was linear in the range of 2.5 to 100 µg mL⁻¹, precise in the levels of repeatability and intermediate precision, accurate and robust. The UVC light was the main degradation pathway among those tested in the specificity study and it showed zero-order degradation kinetics for the three formulations. The *in vitro* skin penetration/permeation using the vertical Franz cell in pig skin showed that all the formulations penetration/permeation through the skin layers. The lotion penetration/permeation was higher than the observed for gel and solution (p <0.05), that can be due to its qualitative composition. The *in vitro* ocular irritant potential test indicated that all the products evaluated can be considered severe irritants. The developed method was applied to assay others marketed formulations, demonstrating a good applicability.

INTRODUCTION

N,N-diethyl-*m*-toluamide (DEET, Fig. 1) is the most common repellent substance used in the combat against insect vectors of diseases such as yellow fever, dengue, zyka and chikungunya (ISLAM et al., 2017; STRICKMAN, 2006). DEET was synthesized in 1946 for use by the US Army and it was only allowed to use by civil population in 1957 (BROWN; HEBERT, 1997; KATZ; MILLER; HEBERT, 2008). This substance acts by masking the host odor, reducing the mosquito power to locate the host or even by decreasing the host attractiveness by the mosquito (DELETRE et al., 2016; DICKENS; BOHBOT, 2013). The DEET-based repellents are marketed around the world as aerosol, solution, lotion, gel, patches, in concentrations ranging from 4 to 99% (ROY; GOSWAMI; PAL, 2017; TAVARES et al., 2018).

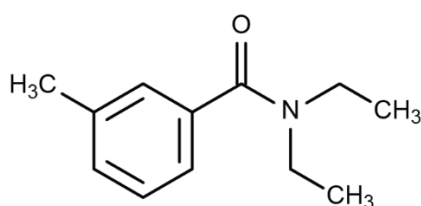


Figure 1 – Chemical structure of DEET

The United States Pharmacopoeia (USP 38, 2015) monographs used to recommend the DEET assay by IV spectrometry. In the most recently edition, it was changed to an HPLC method, that uses a solution of 0.1% phosphoric acid and methanol in the ratio 45:55, as mobile phase, column C18 (4.6 mm x 15 cm, 3.5 μ m) and detection at 235 nm, but the monographs are referent only to DEET drug substance and solution (USP 39, 2016). Some methods are reported in literature to assay DEET solution (SIBAJA; FANDARUFF; DELGADO, 2013), emulsion (WANG et al., 2014) and microcapsules (KARR; SPEAKER; KASTING, 2012), but none of them are stability indicative methods. Analytical methods for the determination of DEET in biological matrices and environmental residues are also described in the literature by HPLC-MS (KUKLENYIK et al., 2013; SONG et al., 2009), HPLC-UV (ABU-QARE; ABOU-DONIA, 2001; KASICHAYANULA et al., 2005; MA et al., 2017; SMALLWOOD; DEBORD; LOWRY, 1992; TAY et al., 2009; YU et al., 2017) and GC-MS (KAPELEWSKA; KOTOWSKA; WIŚNIEWSKA, 2016; ZHANG et al., 2018).

As well as other products applied topically, the repellents API can cross biological barriers, reach the systemic circulation and then cause damages (FARAHMAND; MAIBACH, 2009; TSAKOVSKA et al., 2017). The subchronic dermal application of DEET in adult rats resulted in death of diffuse neuronal cell in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum, leading to many physiological, pharmacological and behavioral abnormalities, particularly memory dysfunction and motor and learning deficits (ABDEL-RAHMAN; SHETTY; ABOU-DONIA, 2001). DEET also caused encephalopathy when was topically applied in an 18-month-old boy (BRIASSOULIS, 2001). Studies about the DEET penetration/permeation evidenced that it presents high skin permeation leading to local and systemic effects, especially with products that contains ethanol as solvent (STINECIPHER; SHAH, 1997), or by the concomitant application of sunscreens, due synergistic percutaneous permeation of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone (KASICHAYANULA et al., 2007; WANG; GU, 2007). So far, studies about the DEET permeation from different formulations have not been reported in literature.

In addition to the potential problems caused by skin permeation, repellents can accidentally reach the eyes and cause irritation. Macrae et al. described the ocular irritation potential of the DEET in bulk by the Draize ocular test (MACRAE et al., 1984). Alternatives to *in vivo* tests have been described and have their use defended and the Hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM) has been widely disseminated as a valid model replacing the Draize ocular test.

In this scenario, our study aimed to develop and to validate a simple HPLC method to assay DEET in different formulations. In addition, to study the effect of the formulation type in the DEET skin permeation and to evaluate the ocular irritation potential by HET-CAM method.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

DEET standard (98.8%) was obtained from Merck-Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Methanol, acetonitrile and ethanol (HPLC grade) were purchased from Merck-Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (St Louis, USA) and Panreac (Barcelona, Spain), respectively. Ultrapure water was obtained from a Megapurity Water Purification System. Phosphoric acid, used to adjust the mobile phase pH, was purchased from Tedia (Fairfield, USA).

The following commercial repellents were acquired in the local market (Santa Maria, Brazil): Repelex[®] lotion, Repelex[®] gel Kids, Repelex[®] solution (Reckitt Benckiser, Berkshire, United Kingdom) OFF[®] lotion, OFF[®] solution, OFF[®] refresh solution (Johnson & Son, Ontario, Canada), Affast solution (Cimed, São Paulo, Brazil) Xô[®] solution (Cimed, São Paulo, Brazil) and No inset (Flora Produtos de Higiene e Beleza, Luiziânia, Brazil) solution, and named as F1 to F9. Formulations F1 (lotion), F2 (gel) and F3 (solution) were used in the method validation and they have the following qualitative composition: (F1) DEET 6.79%; cyclomethicone; PPG-6-C12-15; aloe barbadensis leaf powder; cetearyl alcohol; sodium hydroxide; water; phenoxyethanol; methylparaben; ethylparaben; propylparaben; petrolatum; parfum; amyl cinnammal; benzyl benzoate; cinnamyl alcohol; citronellol; limonene; eugenol; geraniol; hexyl cinnamal; hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde; isoeugenol; linalool; (F2) DEET 7.34%; alcohol; hydroxypropylcellulose; parfum; aqua; linalool; geraniol; limonene; (F3) DEET 6.79%; alcohol; isopropyl myristate; parfum; isoeugenol; linalool; amyl cinnamal; benzyl benzoate; cinnamyl alcohol; citronelol; limonene; eugenol; hexyl cinnamal; hydroxyisohexyl-3-cyclohexene-carboxaldehyde.

Chromatographic system

A Shimadzu LC-System (Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AT pump, SPD-M20A detector (DAD detector), DGU-20A5 degasser, CBM-20A system controller, SIL-20A HT auto sampler and LC-Solution software were used. An RP-18-column (Inertsil ODS-3, 150 mm x 4,6 mm; 5 μ m) (Tokyo, Japan) was employed and the mobile phase consisted of a mixture of methanol, acetonitrile and acidic water (pH 4.5) (45:10:45), at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The pH was adjusted with phosphoric acid before the mixture to the organic solvents, the injection volume was 50 μ L and the detection was at 270 nm.

Preparation of standard and sample solutions

The DEET stock standard solution was prepared with ethanol in the concentration of 1000 μ g mL⁻¹. The next dilution was made with mobile phase until the working concentration of 50 μ g mL⁻¹.

To assay DEET in lotion (F1) and gel (F2), the density of each product was determined with the aid of a pycnometer. Then, a quantity of each product equivalent to 25 mg of DEET was accurately weighed in a 25 mL volumetric flask and 15 mL of ethanol were added. The resulting solution was shaken by 5 minutes to extract DEET, the volume was made up with ethanol and subsequent dilution to 50 μ g mL⁻¹ was made with mobile phase. To

assay DEET in solution (F3), a volume corresponding to 25 mg of DEET was transferred to a 25 mL volumetric flask and ethanol was added to complete the volume. Subsequent dilution was made with mobile phase until the working concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Before analysis all solutions were filtered with a $0.45 \mu\text{m}$ nylon.

System suitability

The system suitability was determined according the recommendations of the United States Pharmacopoeia (USP, 2016) with the help of Shimadzu Lab Solution Software, to confirm that the equipment was suitable for the analysis to be performed. After injection of six replicates of standard solution at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, parameters such as retention time, theoretical plates, asymmetry and capacity factor were analyzed and the $\text{RSD} < 2\%$ value was considered satisfactory.

Method validation

The method was validated according the current guidelines (BRASIL, 2017; ICH, 2005) using the DEET lotion, gel and solution (F1, F2 and F3). The parameters evaluated were specificity, linearity, limits of detection and quantitation, precision, accuracy and robustness.

Specificity

The stability-indicating capability of the method was evaluated by submitting sample solutions in ethanol at $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the three formulations under study to forced degradation conditions using acid, basic, oxidative, photolytic and thermal conditions.

To promote acidic and alkaline hydrolysis, 1 mL of DEET sample solution was mixed with 5M hydrochloric acid (HCl) or 5M sodium hydroxide (NaOH) and remained during 10 days and 5 days, respectively, at room temperature. After this time, the solutions were neutralized as necessary before analysis and diluted with the mobile phase. To evaluate the occurrence of oxidative degradation, two milliliters of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 30% was added to 1 mL of sample solution and was maintained at room temperature for 10 days. To promote thermal stress, 2.5 mL of samples solutions were kept during 8 hours, in a stove at 60°C . For photodegradation, one milliliter of sample solution was exposed to UVA and UVC radiation during 7 minutes and 24 hours, respectively. In the case of UVA light, for comparison, the products were also exposed as received. The time of 7 minutes is equivalent to 807 W h/m^2 and follows the ICH guideline (ICH, 1996), that establishes energy not less

than 200 W h/m². The lamp energy was determined with UV measurement equipment (model GUVV-T10S7-L, Genuine UV Technology, Daejeon, Korea). At the end of all the degradation treatments, the solutions were diluted if necessary to theoretical concentration of 50 µg mL⁻¹ with mobile phase and the drug content was measured. The DEET peak purity was verified by the PDA detector and peak purity index above 0.995 was considered acceptable (GAWANDE; BOTHARA; MARATHE, 2017).

Linearity and Limits of Detection (LOD) and Limits of Quantification (LOQ)

Linearity was studied by the analysis of three independent analytical curves with DEET standard in the range of 2.5 to 100 µg mL⁻¹, totalizing six points. The obtained results were plotted in a graph of analyte concentration (µg mL⁻¹) versus response (peak area). Both regression equation and the correlation coefficient (r) were obtained by the ordinary least squares method. The obtained data were further statistically analyzed to prove that they met the assumptions for a linear regression. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine how well the model fit the data ($\alpha=0.05$). Ryan-Joiner, Durbin-Watson and Cochran tests were performed to assess normality, independence, and residuals homoscedasticity, respectively. The values for the LOD and LOQ were calculated according to the following equations: $LOD= 3.3(\sigma/ \alpha)$ and $LOQ= 10(\sigma/ \alpha)$, where σ is the standard deviation of the y-axis intercept and α corresponds to the mean slope, all obtained from three independent regression lines. The values were expressed as concentration (µg mL⁻¹).

Precision

Precision was estimated in two levels: repeatability and intermediate precision. For repeatability, six independent samples at 50 µg mL⁻¹ were prepared as described in the section of "Preparation of standard and sample solution", in the same day, by a single analyst. Intermediate precision was evaluated by preparing other six samples, changing the day and the analyst. Relative standard deviation (RSD) inferior than 2% was considered suitable.

Accuracy

Accuracy was assessed by the recovery method, where known amounts of DEET standard were added to the sample solutions that were at fixed concentration (30 µg mL⁻¹) aiming to prepare solutions with 80, 100 and 120% (40, 50 and 60 µg mL⁻¹) of the usual working concentration (50 µg mL⁻¹), which were named R1, R2 and R3 respectively. Each level was prepared in triplicate and the DEET recovery was calculated and expressed as a

percentage of the theoretical concentration (BRASIL, 2017). Recovery values in the range of $100 \pm 2\%$ of the target value were considered acceptable (SHABIR, 2003).

Robustness

Method robustness was evaluated by a factorial design 2^3 (three factors with two levels). The variables studied were the pH of aqueous phase (4.0, 4.5 and 5.0), ratio of aqueous phase (40, 45 and 50%) and mobile phase flow rate (0.8, 1.0 and 1.2 mL min⁻¹). The experimental design and analysis were performed employing the statistical software Minitab 17[®] (Pennsylvania, USA) and the results were expressed based on DEET assay.

Application of the developed method

Aiming to assess the applicability of the developed method, formulations F4 (lotion), F5, F6, F7, F8 and F9 (solutions) were analyzed by the validated method in triplicate. They were prepared as established in the section “Preparation of standard and sample solutions”.

Photodegradation kinetics

Photodegradation kinetics was studied under UVC light (254 nm). Samples solutions were prepared in the concentration of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1 mL was transferred to a quartz cell and exposed throughout a 96 hours period in a mirrored light chamber. In time intervals of 0, 12, 24, 48, 72 and 96 hours the samples were diluted to theoretical concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and analyzed. Samples protected from light were exposed to the same conditions to evaluate the interference of the heat inside the chamber.

The graphic method was used to determine the reaction order, plotting the DEET concentration *versus* time, log of concentration *versus* time and reciprocal of concentration *versus* time, indicating respectively zero, first and second order. Correlation coefficient (r) closer to one was chosen to describe the model (YOSHIOKA; STELLA, 2002). Parameters such as like degradation rate constant (k), t_{50} and t_{90} were calculated.

***In vitro* skin penetration/permeation**

An *in vitro* skin penetration/permeation study was performed using Franz-type diffusion cells (3.14 cm² diffusion surface and 9.0 mL receptor volume). Fresh abdominal pig skin was used as the membrane and was obtained from a local abattoir (Erechim, Brazil). Before the study, the visible hairs were shaved and the subcutaneous fat was removed. The skin was washed with distilled water and dried with soft paper. Pieces of skin were cut in circles and were stored at -18 °C until the time of use. To perform the experiment, the skin

pieces were clamped between the donor and the acceptor compartment of the diffusion cell. The receptor medium was composed by phosphate buffer pH 7.4 containing 0.5% polysorbate 80, which was chosen to warranty the DEET sink condition. About 70 mg (corresponding to an infinite dose) of each formulation (LOT, GEL and SOL) was applied to the skin surface. During 8 hours, the cells (n= 4/formulation) were maintained in a thermostatic bath at $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$, with continuous stirring of the receptor fluid at 200 rpm. At the end of this period, the cells were disassembled, the formulation excess was removed with cotton and the DEET distribution in the skin was investigated.

Stratum corneum was removed by tape stripping using 18 successive tapes (Scotch tape 3M, USA). Epidermis and dermis were separated by heating the skin in a water bath (60°C) during 60 s. DEET was extracted from each skin layer with mobile phase, followed by vortex mixing during 2 min and sonication (15 min). In addition, aliquots of the receptor medium were collected and assayed for DEET content, as well as the cotton wool that was used to remove the formulation excess. The samples were assayed by the HPLC method already described. The method was previously validated, being linear in the range of $0.5\text{--}50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Recovery (%) was evaluated by the analyses of the amount of DEET assayed in full skin samples previously contaminated with a known amount of DEET in solution (0.5 , 5.0 and $50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) and subjected to the same experimental described above. High drug recovery was obtained from the full pig skin ($96.14 \pm 0.48\%$). Furthermore, specificity was tested for all sample matrixes (tape strip, viable dermis and dermis) and there was not observed any interference of components of these matrixes in the chromatographic peak of DEET. Formulations F1, F2 and F3 were used in this study.

***In vitro* ocular irritation test**

Hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM) was chosen to study the ocular irritation *in vitro* and the protocol followed the recommended by the INVITTOX (INVITTOX, 1992). For this, embryonated chicken eggs at the tenth day of incubation, kept at $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and relative humidity 70%, were obtained from a local poultry farm (Teutônia, Brazil). The eggshell around the air chamber region was removed with the help of a fine forceps. Carefully, the inner membrane was removed exposing the chorioallantoic membrane (CAM). Then, 0.3 mL of each formulation was applied over the CAM (n= 4/formulation). After 20 seconds the membrane was washed with sodium chloride (NaCl) 0.9% and reactions such as hemorrhage, vasoconstriction, and coagulation were observed during 300 seconds. The time for the appearance of each reaction was monitored and recorded, in seconds. NaCl

0.9% and sodium hydroxide (NaOH) 0.1M were used as negative and positive control, respectively. The irritation score (IS) was calculated according to Eq 1.

$$IS = 5 \times \frac{(301 - h)}{300} + 7 \times \frac{(301 - v)}{300} + 9 \times \frac{(301 - c)}{300}$$

where h = hemorrhage time; v = vasoconstriction time, and c = coagulation time.

According to the IS values, the formulations were classified as no irritant (0-0.9), slight irritant (1-4.9), moderate irritant (5-8.9) and severe irritant (9-21). Formulations F1 to F7 were evaluated by this test.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post-hoc* test at 5% of significance, with help of statistical software RStudio® (Massachusetts, USA). Ryan-Joiner, Durbin-Watson and Cochran tests were performed with helps of ActionStat Software (São Carlos, Brazil).

RESULTS AND DISCUSSION

Method optimization

Initially, the DEET wavelength detection was determined, by the analysis of standard solutions prepared in different solvents. In all conditions, DEET exhibited a maximum absorption at 270 nm that was used during the analyzes. Lotion was chosen to establish the analytical conditions because it has the more complex composition, especially regarding the presence of parabens that have UV absorbance (OCAÑA-GONZÁLEZ et al., 2015) and then could interfere in the DEET quantitation. In initial tests, we try a mobile phase composed by methanol and water pH 4.5 (60:40), but the DEET peak presents a front. Such this mobile phase also did not provide a good separation between DEET and propylparaben, making the DEET peak impure. In order to separate the peaks of DEET and propylparaben, the proportion of aqueous phase was increased, however the peaks remained without good resolution between them, and the retention time was higher, which was also not desired. So, we decide to add acetonitrile to the mobile phase. The use of acetonitrile aimed to decrease the retention time of DEET and improve the chromatographic parameters. Good resolution between DEET and excipients was obtained by a mobile phase composed by methanol,

acetonitrile and water pH 4.5 (45:10:45), flow rate 1.0 mL min⁻¹, with a C-18 column. In this condition, the DEET retention time was around 11 minutes (Fig. 2) and good separation between DEET and propylparaben was observed (resolution > 2.0).

System suitability

By the six replicate injections of a standard solution, the following chromatographic parameters were obtained: retention time 11.4 min (RSD = 0.44%), theoretical plates 7425 (RSD = 1.05%); asymmetry 1.1 (RSD = 0.3%) capacity factor 9.0 (RSD = 0.6%). The data indicated that the LC system produces reproducible results and the suitability of the analytical conditions in providing good chromatographic parameters.

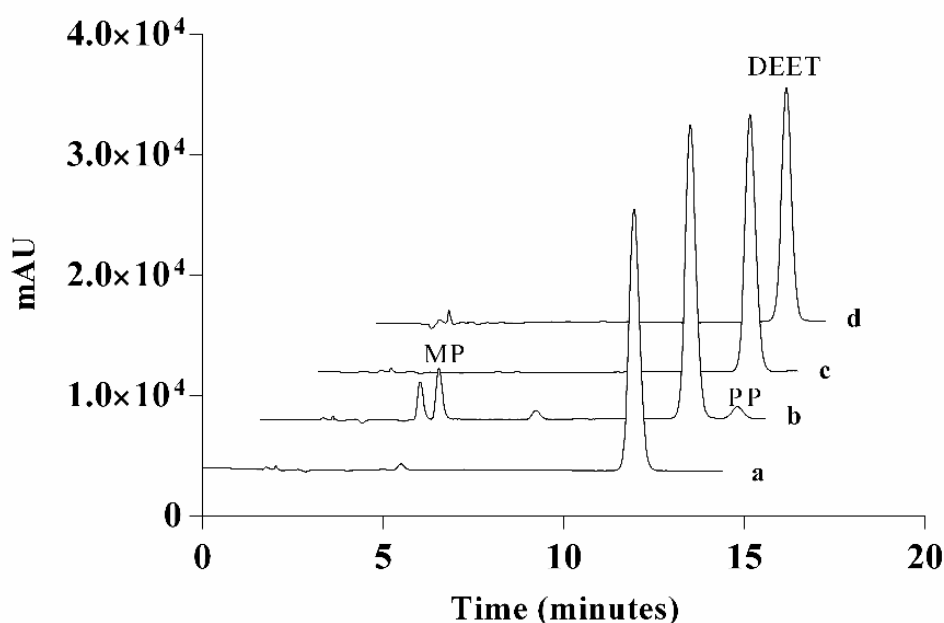


Figure 2- Typical chromatograms obtained using the optimized conditions. (a) DEET standard; (b) Lotion; (c) Gel; (d) Solution. MP: methylparaben; PP: propylparaben.

Method validation

To establish the stability-indicating capacity of the method, forced degradation studies were performed by keeping aliquots of sample solutions of the three different formulations in evaluation in contact with potential degradants substances, aiming to obtain 15 to 20% of degradation (ALSANTE et al., 2007; BRASIL, 2015). In previous studies, milder conditions were tested, as 1M NaOH and HCl, at different times, as well oxidative degradation at different concentrations and times, but none of that provided degradation in the expected range. Thus, more drastic conditions were used in the final forced degradation study. The

alkaline medium 5M/5 days and the UVC radiation/24 hours provided greater degradation in comparison to all the other conditions (Table 1). In conditions where additional peaks were observed (Figure 3), the degradation products did not affect the DEET detection and quantitation, since the analyte peak remained pure (peak purity index > 0.9999), demonstrating the method specificity. The analysis of the blank solution allowed to evaluate the interference of the solvents in the formation of additional peaks. In this way, it was noticed that the additional peaks formed in the acid degradation, as well as some of the basic degradation, were due to the reaction of the solvents as degrading, having nothing to do with DEET.

The standard solution was also submitted to the two conditions that provided greater degradation. After 24 hours under UVC light, the DEET residual content in the standard solution was 86.8% and after five days in contact with 5 M NaOH the was about 96.8%. Both values are similar to the ones observed with the formulations, suggesting that the excipients have no influence on the DEET degradation, in these experimental conditions.

Table 1 – Stress conditions used in forced degradation test and residual content of DEET under each condition (n = 3/condition)

Stress condition	DEET residual content (%) ± SD		
	Lotion	Gel	Solution
5M NaOH, 5 days	97.38 ± 0.04	95.88 ± 1.17	93.76 ± 1.20
5M HCl, 10 days	99.89 ± 0.93	99.60 ± 3.17	98.10 ± 1.31
30% H ₂ O ₂ , 10 days	98.50 ± 1.52	100.11 ± 3.79	96.21 ± 1.15
UVA, 7 min*	98.79 ± 0.78	99.36 ± 1.02	97.16 ± 0.27
UVA without dilution, 7 min*	102.33 ± 0.77	100.99 ± 0.81	98.83 ± 0.15
UVC, 24 hours	84.56 ± 1.15	87.05 ± 2.18	83.14 ± 1.23
60°C/8 hours	100.69 ± 0.22	102.12 ± 1.34	99.75 ± 0.86

*7 minutes = 807 W h/m²

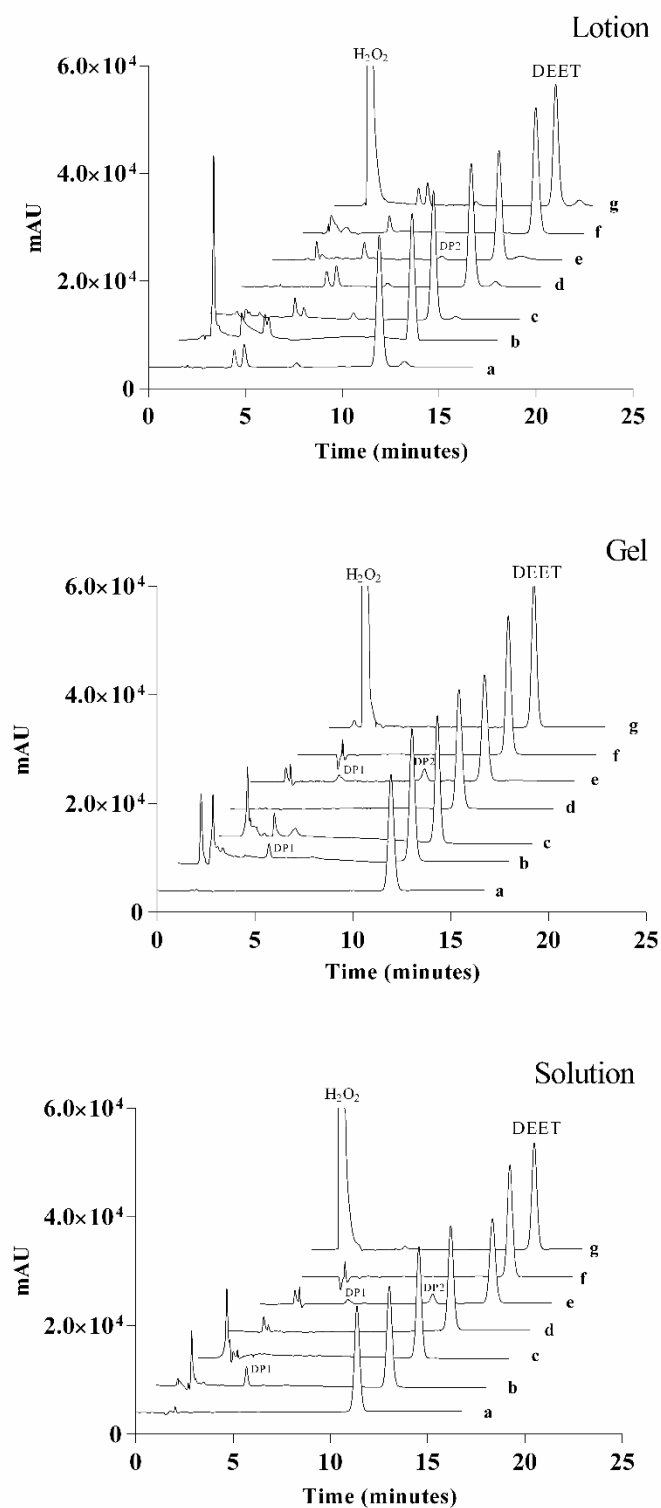


Figure 3- Chromatograms obtained during forced degradation studies. (a) DEET sample solution without degradation; (b) alkaline hydrolysis; (c) acidic hydrolysis; (d) UVA-light; (e) UVC-light; (f) thermal degradation; (g) oxidative degradation. DP1 – degradation product 1; DP2 – degradation product 2.

Satisfactory linearity was observed over the concentration range of 2.5 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Normality of residuals distribution was proved by Ryan-Joiner test ($p > 0.05$). Independence of residuals was verified using the Durbin-Watson test. There was no correlation between the residuals and there was no effect of any treatment on the subsequent treatment ($p > 0.05$). The homoscedasticity was proved by the Cochran test ($p > 0.05$) indicating that the residual variance across all levels was constant. By linear regression model, the correlation coefficient was 0.9996 and the equation $y = 8979.1x - 3544.4$, with intercept equal to zero ($p > 0.05$), demonstrated the presence of linear correlation ($F_{\text{calculated}} = 4676 > F_{\text{critical}} = 4.96$) and absence of linearity deviation ($F_{\text{calculated}} = 1.17 < F_{\text{critical}} = 3.71$), by analysis of variance (ANOVA) at a confidence level of 95%. These results confirm the method linearity in the range evaluated. The calculated results of LOD and LOQ were 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 2.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively.

The precision was studied in the levels of repeatability ($n = 6$) and intermediate precision ($n = 12$). In repeatability, six independent samples were analyzed in the same day by the same analyst, and to the intermediate precision other six samples were assayed, totalizing 12 samples/formulation. Both repeatability and intermediate precision levels showed low RSD values ($< 2\%$), confirming the good precision of the method applied to the three formulations (Table 2).

The accuracy was assessed by the recovery method, by calculating the recovery percentage of variable levels of DEET standard added in the beginning of the sample preparation. The mean recoveries ($n = 9$ /formulation) were 99.6% for the lotion (RSD = 1.2%), 99.5% for the gel (RSD = 1.4%) and 100.2% for the solution (RSD = 1.4%), which are within the established limits of 98-102%. Robustness was assessed by a full factorial design, changing the pH of aqueous phase, the ratio of aqueous phase and the mobile phase flow rate. Although DEET does not have ionizable groups, changes in the pH of aqueous phase could affect the excipients ionization and therefore to cause some interference in the DEET assay. The results obtained indicated no significant effect of individual factors or of their interaction ($p > 0.05$). This is illustrated by Pareto chart (Figure 4), which consists of bars with a length proportional to the absolute value of the estimated effect divided by the pseudo-standard error defined by Lenth (Lenth's PSE) (LENTH, 1989). When an interaction between two or more factors occurs, this is indicated by a bar with their combination. The chart also includes a vertical line containing the t-critical value for $\alpha = 0.05$. Smaller bars than the t-critical value indicate lack of significance of the factor considered.

Table 2 - Results obtained in repeatability and intermediary precision for different formulations.

Sample	Repeatability (%)					
	LOTION		GEL		SOLUTION	
	Day 1 Analyst 1	Day 2 Analyst 2	Day 1 Analyst 1	Day 2 Analyst 2	Day 1 Analyst 1	Day 2 Analyst 2
1	102.37	104.54	100.62	99.82	86.25	86.18
2	101.14	102.39	98.35	99.68	86.16	87.21
3	101.74	101.55	98.55	99.59	85.62	86.17
4	100.22	104.88	99.74	99.28	85.11	87.31
5	99.92	104.61	100.69	98.46	85.87	87.06
6	100.23	100.92	99.62	98.87	86.53	86.90
Mean (%) ± SD	100.94 ± 0.98	103.15 ± 1.74	99.60 ± 0.99	99.28 ± 0.53	85.92 ± 0.51	86.81 ± 0.51
RSD	0.97	1.69	1.00	0.53	0.59	0.58
Intermediate precision ±						
SD	102.04 ± 1.77		99.44 ± 0.77		86.37 ± 0.67	
RSD	1.74		0.78		0.77	

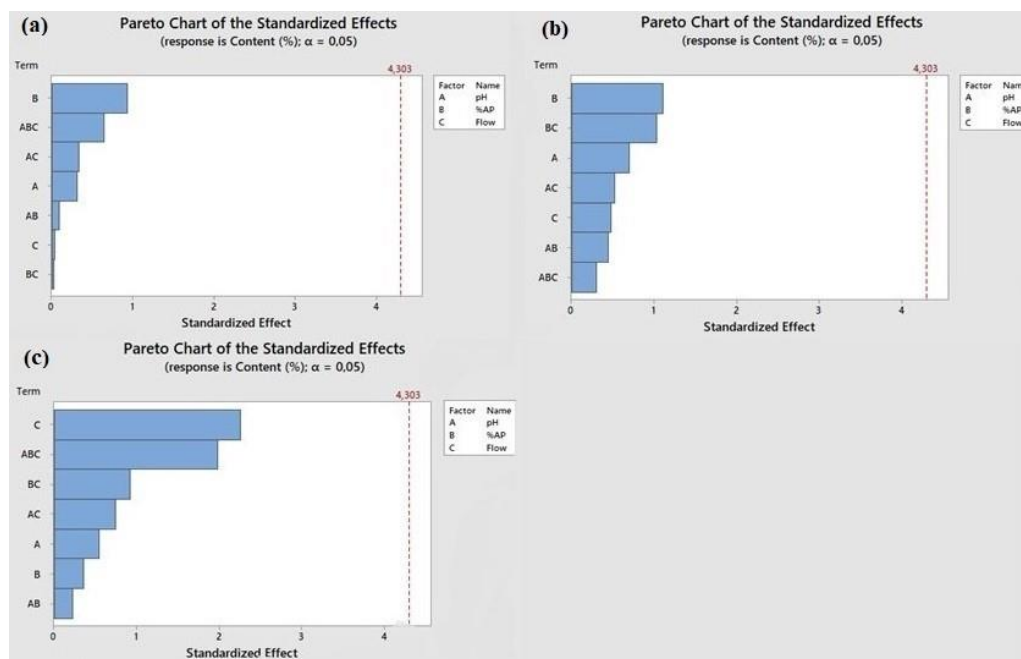


Figure 4 – Pareto chart to robustness study (a) Lotion; (b) Gel; (c) Solution. Smaller bars than the t-critical value indicate lack of significance of the factor considered ($\alpha = 5\%$). %AP: percentual of aqueous phase

Application of the developed method

Aiming to evaluate the applicability of the validated method, six additional samples, of different brands were analyzed in triplicate (Table 3). The DEET peak purity was checked in all the analyses, to confirm the absence of excipients interference of these new formulations, being > 0.9999 in all the cases. It was observed that one of the samples assayed (F5) did not meet the pharmacopeial requirement, whose establishes the DEET assay between 92.0 to 108.0% of the labeled content.

Table 3 – Analytical results of additional samples analyzed by validated method (n=3/formulation).

Sample	Pharmaceutical form	Assay (%) \pm SD	RSD (%)
F4	lotion	103.17 \pm 0.94	0.91
F5	solution	81.79 \pm 1.01	1.24
F6	solution	98.78 \pm 1.81	1.83
F7	solution	99.16 \pm 0.85	0.86
F8	solution	94.85 \pm 1.34	1.41
F9	solution	98.23 \pm 0.79	0.80

UVC photodegradation kinetics

In the forced degradation tests UVC radiation provided the greater DEET degradation value between the other conditions used. Although most UVC radiation is filtered by ozone in the upper atmosphere, the study of the chemical and biological effects of this radiation has been rising not only for better knowledge of the photochemistry of this radiation but also because of the damage caused by it (MOORE, 2004). In addition, the administration route of DEET reinforces the relevance of this evaluation.

Over 96 hours samples were analyzed at times 0, 12, 24, 48, 72 and 96 hours (Fig. 5). The degradation kinetic of the three analyzed formulations was determined to define the reaction order (zero, first, or second order) and the reaction rate (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001). Analysis of the correlation coefficients that were obtained by plotting the drug concentration *versus* time, log of drug concentration *versus* time and the inverse of concentration *versus* time indicated that all the formulations degraded following zero order kinetics, with a linear relation between concentration versus time, represented by the equation $C = C_0 - kt$. The slope of the straight line indicated the reaction constant (k) and expresses the fraction of drug that reacts per time; from the k value, the $t_{90\%}$ and $t_{50\%}$ were estimated. The following data were obtained: lotion, $k = 0.5878 \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{90\%} = 17.01\text{h}$, $t_{50\%} = 85.06\text{h}$; gel, $k = 0.4214 \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{90\%} = 23.73\text{h}$, $t_{50\%} = 118.62\text{h}$; solution, $k = 0.6214 \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{90\%} = 16.09\text{h}$, $t_{50\%} = 80.46\text{h}$. This data indicated that the solution degraded faster than lotion and gel. Even so, these results confirmed the high photostability of DEET formulations, because even under UVC radiation, the $t_{90\%}$ value for the three formulations was higher than the products reapplication intervals, which range from 3 h to 4 h.

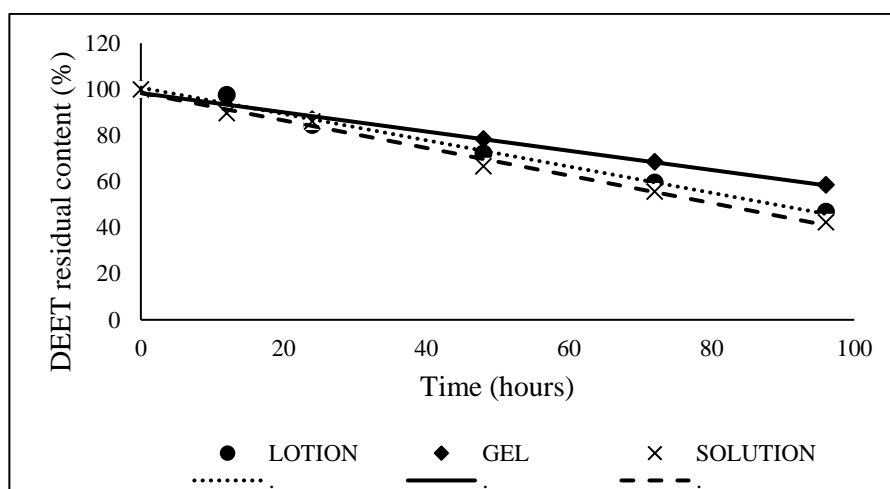


Figure 5 – DEET degradation profile in UVC kinetics study at times 0, 12, 24, 48, 72 and 96 hours, for the lotion, gel and solution.

***In vitro* skin penetration/permeation**

The permeation of substances in the skin depends on the physico-chemical characteristics of the substance, the inherent characteristics of the formulation and also on the physiological conditions of the application site (KAUSHIK; COSTACHE; MICHNIAK-KOHN, 2010). DEET has some characteristics that facilitate its permeation, such as low molecular weight (MW = 191.3 Da) and moderate lipophilicity (log P = 2.5) (KARR; SPEAKER; KASTING, 2012).

To determine the drug localization and to quantify the DEET delivered to each skin layer after the applying of three different formulations (lotion, gel and solution), an *in vitro* study was performed using vertical Franz diffusion cells and porcine skin as biological membrane. DEET was analyzed in the *stratum corneum*, by the tape stripping technique, and in the epidermis and dermis, using skin extraction techniques

The receptor compartment was also analyzed and DEET was detected demonstrating that the drug was able to permeate the skin from the three formulations. The following values were found: lotion, 148.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; gel, 67.17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and solution, 7.08 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. About the distribution through the skin layers, from the lotion DEET was homogeneously distributed through the skin layers, with no difference between its concentrations in stratum corneum, epidermis and dermis ($p > 0.05$). The gel and the solution showed higher levels of DEET retained in the stratum corneum when compared to the other skin layers ($p < 0.05$) (Fig. 5). The lower drug levels found in the dermis suggest that lower DEET systemic absorption can be expected from the solution and the gel.

Additionally, the cotton used to remove the excess formulation remaining in contact with the skin at the end of 8 hours was also analyzed. As expected, lower DEET level was found to the formulation that presented the higher permeation value: lotion 4934 $\mu\text{g mL}^{-1}$, gel 24087 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and solution 45436 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Permeation through the stratum corneum is the limiting barrier for the dermal absorption of substances. Once the substance crosses this barrier, it can more easily reach the other skin layers (LANE, 2013). Increasing the skin hydrate, in general, may increase the transdermal delivery of hydrophilic and lipophilic substances. This can be obtained by tissue occluding, to avoid transepidermal water loss, or by exposing the skin to high humidity (WILLIAMS; BARRY, 2012).

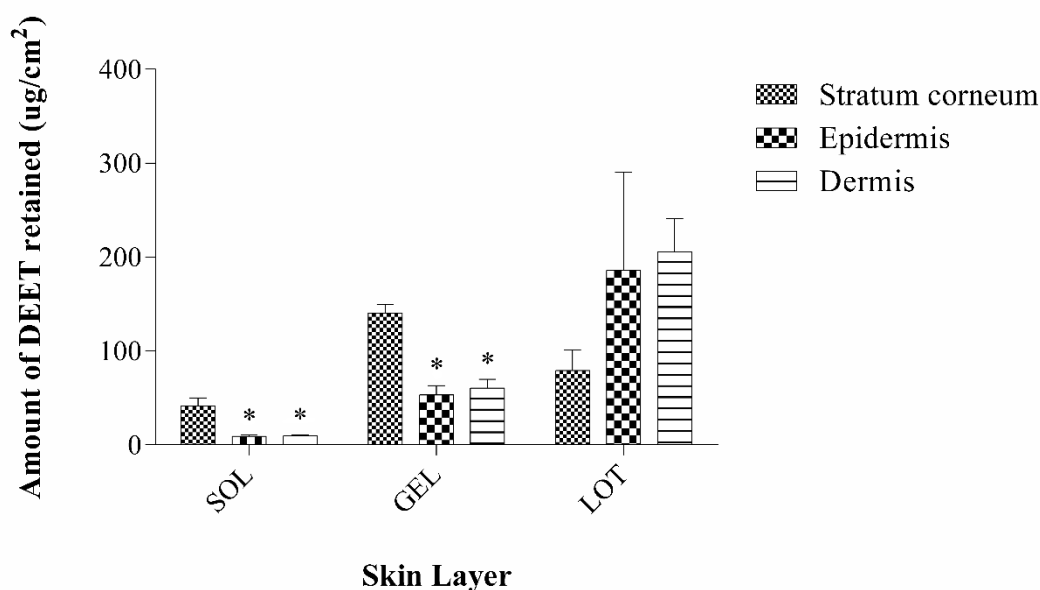


Figure 6 – Amount of DEET retained in *stratum corneum*, epidermis and dermis after 8 hours from DEET in solution (SOL), gel (GEL) and lotion (LOT). The results are expressed as mean \pm standard error (n = 4). *indicate significant difference from the value retained in the *stratum corneum*.

In this context, differences in the qualitative composition of the formulations studied could explain the differences in the permeation of DEET. The gel and the solution contain alcohol as excipient, a recognized absorption promoter and high values could be expected (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR, 2013; LANE, 2013). However, the lotion contains emollients, such as petrolatum, cyclomethicone and cetearyl alcohol that can occlude the skin, helping in the permeation (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006). Terpenes like limonene and eugenol, other components of the lotion, are also described as skin penetration enhancers (LANE, 2013; WILLIAMS; BARRY, 2012). Considering that the dermis is the first vascularized skin layer, substances that reach this layer will be available in the circulation and may cause systemic effects (LANE, 2013)

Our results are in accordance with reported studies performed with DEET in solution (QIU; MCCALL; JUN, 1998) or in combination with oxybenzone sunscreen (CHUNG et al., 2011; KASICHAYANULA et al., 2007; WANG et al., 2014; WANG; GU, 2007), that also demonstrated its high permeation potential.

***In vitro* ocular irritation test**

The irritant potential of studied formulations was evaluated by HET-CAM method. Positive control (NaOH 0.1M) was classified as "severe irritant" and negative control (NaCl 0.9%) did not cause any reaction. Of the seven samples analyzed in our study, five were considered as "severe irritant" and one as "moderate irritant". It was impossible to attribute the irritant degree of one sample (a lotion), that did not solubilize in the test condition (Table 4).

Table 4– Ocular irritation rate and consequent classification to studied formulation by HET-CAM method.

Repellent	Ocular Irritation Rate*	Classification
F1 (lotion)	8.04 ± 0.35	Moderate irritant
F2 (gel)	10.68 ± 0.31	Severe irritant
F3 (solution)	14.94 ± 1.03	Severe irritant
F4 (lotion)	0.1 ± 0.2	ND
F5 (solution)	11.04 ± 1.25	Severe irritant
F6 (solution)	9.75 ± 0.40	Severe irritant
F7 (solution)	9.50 ± 1.51	Severe irritant

*The results are expressed as mean ± SD (n = 4). ND = not determined

Evaluate the potential of irritation of cosmetics products is essential. The Draize test, which assesses the potential for ocular irritation in rabbit corneas (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944), has been questioned as involving animals and in this scenario alternatives to the Draize test are sought, such as the HET-CAM test (CORRADO, 2007; DEBBASCH et al., 2005). HET-CAM is a rapid and sensitive method used to identify the irritant potential of materials, particular attention to products of topical application that can easily enter in contact with the eye region.

Using the conventional Draize method, DEET presented irritant potential when tested in the presence of different concentrations of ethanol (100% ethanol, 100% DEET and EtOH: DEET (80:20) and also when considering the amount applied (10, 30 or 100 µL) (MACRAE et al., 1984). The results found in our study corroborate those previously published, carried out only with ethanolic solutions of DEET, where the products showed ocular toxicity.

CONCLUSION

A simple, fast and stability indicative method was successfully developed and validated, following current guidelines, to assay DEET in different formulations (lotion, gel and solution), by the same analytical conditions. The study of DEET degradation kinetics under UVC light, for the three formulations, fitted to the zero-order model according the degradation profiles. The *in vitro* skin permeation study demonstrated the high permeability of DEET across skin layers, with lower penetration/permeation observed with the solution form. DEET also exhibited an ocular irritation potential regardless of the type of formulation applied.

REFERENCES

- ABDEL-RAHMAN, A., SHETTY, A.K., ABOU-DONIA, M.B. Subchronic dermal application of N,N-diethyl m-toluamide (DEET) and permethrin to adult rats, alone or in combination, causes diffuse neuronal cell death and cytoskeletal abnormalities in the cerebral cortex and the hippocampus, and Purkinje neuron loss in the cerebellum. **Experimental Neurology**. v. 172, n. 1, p. 153–171, 2001.
- ABU-QARE, A. W.; ABOU-DONIA, M. B. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the quantification of chlorpyrifos, pyridostigmine bromide, N, N - diethyl- m -toluamide and their metabolites in rat plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 754, p. 533–538, 2001.
- ALSANTE, K. M. et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 1, p. 29–37, 2007.
- ANSEL, H.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2015. **RDC nº 53 de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas**. Diário Oficial da União: Brasília, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2017. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Diário Oficial da União: Brasília, 2017.
- BRIASSOULIS, G. Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: A case analysis of its toxicity in children. **Human and Experimental Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 8–14, 2001.
- BROWN, M.; HEBERT, A. A. Insect repellents: An overview. **Journal of the American**

Academy of Dermatology, v. 36, n. 2, p. 243–249, 1997.

CHUNG, H. H. et al. Direct determination of residual Pluronic F-68 in in-process samples from monoclonal antibody preparations by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 15, p. 2106–2113, 2011.

CORRADO, M. C. **Uso do método HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2007.

DEBBASCH, C. et al. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: Correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 155–165, 2005.

DELETRE, E. et al. Prospects for repellent in pest control : current developments and future challenges. **Chemoecology**, v. 26, n. 4, p. 127–142, 2016.

DICKENS, J. C.; BOHBOT, J. D. Mini review: Mode of action of mosquito repellents. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 3, p. 149–155, 2013.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 83, p. 377–390, 1944.

FARAHMAND, S.; MAIBACH, H. I. Estimating skin permeability from physicochemical characteristics of drugs: A comparison between conventional models and an in vivo-based approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 375, n. 1–2, p. 41–47, 2009.

GAWANDE, V. T.; BOTHARA, K. G.; MARATHE, A. M. Stress Studies and Identification of Degradation Products of Cephalexin Using LC–PDA and LC–MS/MS. **Chromatographia**, v. 80, n. 10, p. 1545–1552, 2017.

ICH. **Stability Testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B**, 1996.

ICH. **Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

INVITTOX. 1992. **Protocol No. 47: HET-CAM Test**. Available: http://ecvamsis.jrc.it/invittox/published/indexed_47.html.

ISLAM, J. et al. Acta Tropica Mosquito repellents : An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. **Acta Tropica**, v. 167, n. 2, p. 216–230, 2017.

KAPELEWSKA, J.; KOTOWSKA, U.; WISNIEWSKA, K. Determination of personal care products and hormones in leachate and groundwater from Polish MSW landfills by ultrasound-assisted emulsification microextraction and GC-MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 2, p. 1642–1652, 2016.

KARR, J. I.; SPEAKER, T. J.; KASTING, G. B. A novel encapsulation of N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) favorably modifies skin absorption while maintaining effective evaporation rates. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 3, p. 502–508, 2012.

- KASICHAYANULA, S. et al. Simultaneous analysis of insect repellent DEET , sunscreen oxybenzone and five relevant metabolites by reversed-phase HPLC with UV detection : Application to an in vivo study in a piglet model. **Journal of Chromatography B**, v. 822, p. 271–277, 2005.
- KASICHAYANULA, S. et al. Percutaneous characterization of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from topical skin application. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, p. 187–194, 2007.
- KATZ, T. M.; MILLER, J. H.; HEBERT, A. A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 58, p. 865–871, 2008.
- KAUSHIK, D.; COSTACHE, A.; MICHNIAK-KOHN, B. Percutaneous penetration modifiers and formulation effects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n. 1–2, p. 42–51, 2010.
- KUKLENYIK, P. et al. On-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography – isotope dilution – tandem mass spectrometry approach to quantify N , N-diethyl- m -toluamide and oxidative metabolites in urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 787, p. 267–273, 2013.
- LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, A. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Lacoste Gulbenkian, 2001. p. 1277–355.
- LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 12–21, 2013.
- LENTH, R. V. Quick and Easy Analysis of Unreplicated Factorials. **Technometrics**, v. 31, n. 4, p. 469–473, 1989.
- MA, X. et al. Magnetic Solid-Phase Extraction of N , N -Diethyl- m -Toluamide From Baby Toilet Water Prior to its HPLC – UV Detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 6, p. 662–668, 2017.
- MACRAE, S. M. et al. Ocular Toxicity of Diethyltoluamide (Deet). **Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 17–30, 1984.
- MOORE, D. E. Photophysical and Photochemical Aspects of Drug Stability. In: **TØnessen HH. Photostability of Drugs and Drug Formulations**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2004. p. 10–40.
- OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A. et al. Analytica Chimica Acta New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples . A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, p. 1–15, 2015.
- QIU, H.; MCCALL, J. W.; JUN, H. W. Formulation of topical insect repellent N , N -diethyl- m -toluamide (DEET): vehicle effects on DEET in vitro skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p. 167–176, 1998.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: Pharmaceutical Press, 2006.

ROY, D. N.; GOSWAMI, R.; PAL, A. The insect repellents: A silent environmental chemical toxicant to the health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 91–102, 2017.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, 2003.

SIBAJA, A. M. A.; FANDARUFF, C.; DELGADO, M. T. L. N, N -diethyl- meta -toluamide (DEET) in repellent solutions : development and validation of an analytical method. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 273–278, 2013.

SMALLWOOD, A. W.; DEBORD, K. E.; LOWRY, L. K. N, N ' Diethyl-m-Toluamide (m-DEET): Analysis of an Insect Repellent in Human Urine and Serum by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 16, n. February, p. 1–4, 1992.

SONG, W. et al. Free-radical-induced oxidative and reductive degradation of N , N 0 -diethyl- m -toluamide (DEET): Kinetic studies and degradation pathway. **Water Research**, v. 43, p. 635–642, 2009.

STINECIPHER, J.; SHAH, J. Percutaneous permeation of N, N-diethyl- m-toluamide (DEET) from commercial mosquito repellents and the effect of solvent. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 52, p. 119–135, 1997.

STRICKMAN, D. Older Synthetic Active Ingredients and Current Additives. **Insect repellents: principles, methods, and uses**, n. 2007, p. 361–385, 2006.

TAVARES, M. et al. Trends in insect repellent formulations: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n. 1–2, p. 190–209, 2018.

TAY, K. S. et al. Degradation of DEET by ozonation in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 76, p. 1296–1302, 2009.

TSAKOVSKA, I. et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. **Toxicology**, v. 387, n. March, p. 27–42, 2017.

USP38. **The United States Pharmacopoeia**. Rockville, 2015.

USP39. **The United States Pharmacopoeia**. Rockville, 2016.

WANG, T. et al. Evaluation of percutaneous permeation of repellent DEET and sunscreen oxybenzone from emulsion-based formulations in artificial membrane and human skin. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 43–51, 2014.

WANG, T.; GU, X. In Vitro Percutaneous Permeation of the Repellent DEET and the

Sunscreen Oxybenzone across Human Skin. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 17–25, 2007.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 128–137, 2012.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York, NY: Kluwer Academic Publishers, 2002.

YU, Z. et al. Degradation of DEET in aqueous solution by water falling film dielectric barrier discharge : Effect of three operating modes and analysis of the mechanism and degradation pathway. **Chemical Engineering Journal**, v. 317, p. 90–102, 2017.

ZHANG, H. et al. Occurrence and distribution of pesticides in precipitation as revealed by targeted screening through GC-MS/MS. **Chemosphere**, v. 211, p. 210–217, 2018.

5. CONCLUSÕES

- Foi validado um método simples e indicativo de estabilidade por CLAE para o doseamento do DEET em repelentes, seguindo a legislação vigente. O método pode ser aplicado para o doseamento da substância em solução, loção e gel, sob as mesmas condições experimentais;
- O DEET mostrou-se estável frente a radiação UVC, e sua cinética de degradação seguiu a ordem zero para todas as formulações em estudo;
- Em todas as formulações estudadas, o DEET conseguiu penetrar/permeiar as camadas da pele, chegando ao meio receptor. A loção teve maior permeação, seguida pelo gel e solução;
- Os repelentes testados demonstraram, em sua maioria, um alto potencial de irritação ocular, o que reforça a necessidade de cuidados no momento na administração desses produtos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, A., SHETTY, A.K., ABOU-DONIA, M.B. Subchronic dermal application of N,N-diethyl m-toluamide (DEET) and permethrin to adult rats, alone or in combination, causes diffuse neuronal cell death and cytoskeletal abnormalities in the cerebral cortex and the hippocampus, and Purkinje neuron loss in the cerebellum. **Experimental Neurology**. v. 172, n. 1, p. 153–171, 2001.
- ABU-QARE, A. W., ABOU-DONIA, M. B. Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (*N,N*-diethyl-*m*-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 291-299, 2001a.
- ABU-QARE, A. W., ABOU-DONIA, M. B. Combined exposure to DEET (*N,N*-diethyl-*m*-toluamide) and permethrin-induced release of rat brain mitochondrial cytochrome c. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. v. 63, n. 4, p. 243-252, 2001b.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2° ed., Porto Alegre: Artmed, p.677, p.115, 2005.
- BARBERO A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1–13, 2009.
- BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**. 64, 175-177, 2002.
- BARRY, B.W. **Dermatological Formulations: Percutaneous absorption**. England: Marcel Dekker, INC, p.1-233, 351-407, 1983.
- BOHBOT, J.D., DICKENS, J.C. Insect repellents: modulators of mosquito odorant receptor activity. **PLoS One**. v. 5, n. 8, p. 1-11, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 11, de 14/07/2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 45, de 09/08/2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 19, de 10/04/2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica sobre Repelentes e Saneantes, 2015a. <http://www.communitor.com.br/downloads/notas-tecnicas/nota-anvisa-repelentes-e-saneantes-2015.pdf>
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 53, de 04/12/2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 166, de 24/07/2017.

BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. Dengue: vírus e vetor. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>. Acesso em 19 nov 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Série A. Normas e manuais Técnicos, n° 176, 2002. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/publicacoes/dengue_aspecto_epidemiologicos_ciagnostico_tratamento.pdf. Acesso em 06 out 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue, Chikunguya e zika: Prevenção e combate. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/combate-ao-aedes> Acesso em: 06 out 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 204, de 17/02/2016. Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html. Acesso em 19 nov 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 48. Volume 49. Nov. 2018b. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/13/2018-056.pdf>. Acesso em 19 nov 2018.

BRIASSOULIS, G., NARLIOGLOU, M., HATZIS, T. Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: a case analysis of its toxicity in children. **Human and Experimental Toxicology**. v. 20, n. 1, p. 8–14, 2001.

BROSCHARD, T.H. et al. Biotransformation and toxicokinetics of the insect repellent IR3535® in male and female human subjects after dermal exposure. **Toxicology Letters**. v. 218, p. 246–252, 2013.

BROWN, M.; HEBERT, A.A. Insect repellents: an overview. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 36, p. 243-9, 1997.

CHANEY, L.A.; ROCKHOLD, R. W.; HUME, A. S. Cardiorespiratory effects following acute exposure to Pyridostigmine Bromide and/or N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET) in Rats. **International Journal of Toxicology**. v. 21, p. 287–300, 2002.

CHARLTON et al. The toxicity of picaridin containing insect repellent reported to the National Poison Data System. **Clinical Toxicology**. v. 54, n. 8, p. 21-26, 2016.

CHEMICALIZE. Disponível em: <https://chemicalize.com/#/calculation>. Acesso em: 03 ago 2018.

CHEN, T. et al. Percutaneous permeation comparison of repellents picaridin and DEET in concurrent use with sunscreen oxybenzone from commercially available preparations. **Pharmazie**, v. 65, n.11, p. 835-839, 2010.

CONCEIÇÃO, V. G. B. **Avaliação da fotoestabilidade no UV de repelentes de insetos e filtros solares por espectroscopia Raman**. 2015. 92 p. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica)-Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos, SP, 2015.

- DAS, P.C., et al. Enzyme induction and cytotoxicity in human hepatocytes by chlorpyrifos and N, N-diethyl-m-toluamide (DEET). **Drug Metabolism and Drug Interaction**. v. 23, n. 3–4, p. 237–260, 2008.
- DAVIS, E.E.; SOKOLOVE, P.G. Lactic acid-sensitive receptors on the antennae of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Comparative Physiology**. v. 105, p. 43–54, 1976.
- DEBBASCH C. et al. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, p. 155–165, 2005.
- DELETRE, E et al. Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. **Chemoecology**. v. 26, p. 127–142, 2016.
- DEROUICHE, M. T. T.; ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. **Toxicology in Vitro**. v. 45, p. 393–396, 2017.
- DICKENS, J. C.; BOHBOT, J. D. Mini review: Mode of action of mosquito repellents. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 106, p. 149–155, 2013.
- DIEMBECK W. et al. Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients. **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, p. 191–205, 1999.
- DRAIZE, J., GEOFFREY, W., CALVERY, H. Methods for the study of irritation and toxicity of substance applied topically to the skin and mucous membranes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 82, n. 3, p. 377–390, 1944.
- DRUG BANK. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11282>. Acesso em 03 ago 2018.
- EPA. Environmental Protection Agency. Insect Repellents: Reducing Insect Bites. <https://www.epa.gov/insect-repellents>. Acesso em: 05 out 2018.
- EPA. Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision (RED) DEET. Set de 1998. Disponível em: <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0002red.pdf>. Acesso em: 05 out 2018.
- EPA. Environmental Protection Agency. Product Performance Test Guidelines: OPPTS 810.3700: Insect repellents to be applied to human skin. July, 2010.
- EPA. Environmental Protection Agency. New pesticide fact sheet-picaridin. Available from: <<http://www.epa.gov/opprd001/factsheet/picaridin.pdf>>. 2005. Acesso em: 05 out 2018.
- FELDMANN RJ, MAIBACH HI. Absorption of some organic compounds through the skin in man. **Journal of Investigative Dermatology**. v.54, n. 399–404, 1970.

GAUTHERON, P. et al. Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicology *In vitro***. v. 8, p. 381–392, 1994.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q1B: **Photostability testing of new drug substances and products**, 1996.

ICH - – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q1A (R2): **Stability testing of new drug substances and products**, 2003.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2(R1): **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 2005.

KARR, J. I.; SPEAKER, T. J.; KASTING, G. B. A novel encapsulation of N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) favorably modifies skin absorption while maintaining effective evaporation rates. **Journal of Controlled Release**. v. 160, p. 502-508, 2012.

KASICHYANULA, S. et al. Simultaneous analysis of insect repellent DEET, sunscreen oxybenzone and five relevant metabolites by reversed-phase HPLC with UV detection: application to an *in vivo* study a piglet model. **Journal of Chromatography B**. v. 822, p. 271-277, 2005.

KASICHAYANULA, S. et al. Percutaneous characterization of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from topical skin application. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 223, p. 187-194, 2007.

KATZ T.M.; MILLER, J.H.; HEBERT, A.A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 58, n. 5, p. 865-871, 2008;

KUKLENYIK, P. et al. On-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution-tandem mass spectrometry approach to quantify N,N-diethyl-m-toluamide and oxidative metabolites in urine. **Analytica Chimica Acta**. v. 787, p. 267-273, 2013.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. **Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química**. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 447, p. 12-21, 2013.

LEE, M.; HWANG, J.; LIM, K. Alternatives to *in vivo* Draize rabbit eye and skin irritation tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. **Toxicological Research**. v. 33, n. 3, p. 191-203, 2017.

LEE, Y., KIM, S.H., MONTELL, C. Avoiding DEET through insect gustatory receptors. **Neuron**. v. 67, p. 555–561, 2010.

- LEGEAY S. et al. Unusual modes of action of the repellent DEET in insects highlight some human side effects. **European Journal of Pharmacology**. v. 825, p. 92–98, 2018.
- LIMA-CAMARA, T. M. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 50, n. 36, p. 1-7, 2016.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
- LUEPKE, N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**. v. 23, p. 287–291, 1985.
- MA, X. et al. Magnetic Solid-Phase Extraction of N,N-Diethyl-m-Toluamide From Baby Toilet Water Prior to its HPLC–UV Detection. **Journal of Chromatographic Science**. v. 55, n. 6, p. 662–668, 2017.
- MACRAE, S. C. et al. Ocular toxicity of diethyltoluamide (DEET). **Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology**. v. 3, n.1, p. 17-30, 1984.
- MAUL, E.; SEARS, M. L. Objective evaluation of experimental ocular irritation. **Investigative Ophthalmology**. v. 15, n. 3, p. 308-312, 1976.
- MORAES, A.S. **Caracterização farmacêutica de nanocápsulas de timol e avaliação da permeação cutânea e da atividade repelente contra *Aedes aegypti***. 2015. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, CE, 2015.
- MILLEN, R. P.; DE FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A. Modelos para dispersão Raman em polímeros conjugados. **Química Nova**. v. 28, n. 2, p. 289-295, 2005.
- MIRANDA, M. C. **Desenvolvimento de lipossoma com produto repelente de insetos e metodologia analítica**. 2005. 147p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2005.
- MITJANS, M.; INFANTE, M.R.; VINARDELL, M.P. Human hemoglobin denaturation as an alternative to the Draize test for predicting eye irritancy of surfactants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 52, p. 89-93, 2008.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) OECD Guideline for Testing of Chemicals, 428, Skin absorption: *in vitro* Method, OECD, Paris, 2004.
- OEDC. Organization for Economic Cooperation and Development. Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OECD Publishing. Paris, 2009.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Vector-borne diseases. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acesso em 02/12/2018.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Review of IR3535; KBR3023; (RS)-methoprene 20% EC; pyriproxyfen 0.5% GR; and lambda-cyhalothrin 2.5% CS. Geneva, 2000.

OSIMITZ, T. G., et al. Adverse events associated with the use of insect repellents containing N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 56, p. 93–99, 2010.

PAESE, K. et al. Semisolid formulatio contaning a nanoencapsuled sunscreen: effectiveness, *in vitro* photostability and imune response. **Journal of Bomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2009.

PIETROGRANDE, M. C.; BASAGLIA, G. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, n. 11, p. 1086-1094, 2007.

QIU, H.; JUN, H. W. Solid-phase extraction and liquid chromatographic quantitation of insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide in plasma. **Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis**. v15, p. 241-250, 1996.

QIU, H.; JUN, H. W.; TAO, J. Pharmacokinetics of Insect Repellent N,N-Diethyl-m-toluamide in Beagle Dogs following Intravenous and Topical Routes of Administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 86, n. 4, 1997.

QIU, H; McCALL, J. W.; JUN, H. W. Formulation of topical insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET): vehicle effects on DEET *in vitro* skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 163, p. 167-176, 1998.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, p. 1109-1143, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-180, 2004.

ROSS, J. S.; SHAH, J. C. Reduction in permeation of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) by altering the skin/vehicle partition coefficient. **Journal of Controlled Release**. v. 67, p. 211-221, 2000.

ROY, D. N.; GOSWAMI, R; PAL, A. The insect repellents: A silent environmental chemical toxicant to the health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 50, p. 91–102, 2017.

SCIFINDER. Disponível em <https://scifinder.cas.org>. Acesso em 11 ago de 2018.

SCHOENIG G. P. et al. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of N,N-diethyl-m-toluamide in the rat. **Drug Metabolism Disposition**. v. 24, p. 156–163, 1996.

- SIBAIA, A. M. A.; FANDARUFF, C; DELGADO, M. T. L. N,N-diethyl-meta-toluamide (DEET) in repellent solutions: development and validation of an analytical method. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 94, n. 3, p. 273-278, 2013.
- SILVA, K.E.R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**; v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.
- SELIM, S. et al. Absorption, metabolism, and excretion of N,N-diethyl-m-toluamide following dermal application to human volunteers. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 25, p. 95–100, 1995.
- SMALLWOOD, A. W.; DEBORD, K. E.; LOWRY, L. K. N,N'-Diethyl-m-Toluamide (m-DET): Analysis of an insect repellent in human urine and sérum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 16; p. 10-13, 1992.
- SONG, W. et al. Free-radical-induced oxidative and reductive degradation of N,N'-diethyl-m-toluamide (DEET): Kinetics studies and degradation pathway. **Water research**. V. 43, p. 635-642, 2009.
- 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.
- STINECIPHER, J.; SHAH, J. Percutaneous permeation of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) from commercial mosquito repellents and the effect of solvent. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 52, p. 119-135, 1997.
- SUDAKIN, D. L.; TREVTHAN, W. R. B. S. DETT: A review and update of safety and risk in the general population. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**. v. 41, n. 6, p. 831-839, 2003.
- SUHONEN, P. et al. Different effects of pH on the permeation of pilocarpine and pilocarpine prodrugs across the isolated rabbit cornea. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 6, n. 3, p. 169-176, 1998.
- SYED, Z.; LEAL, W.S. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, p. 13598–13603, 2008.
- TAVARES, M. et al. Trends in insect repellent formulations: a review. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 539, p. 190-209, 2018.
- TENENBEIN, M. Severe toxic reactions and death following the ingestion of diethyltoluamide-containing insect repellents. **JAMA**. v. 258, n. 11, p. 1509–1511, 1987.
- TISCH, M., et al. Genotoxicity studies on permethrin: DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. **European Archives of Otorhinolaryngology**. v. 259, n. 3, p. 150–153, 2002.
- TURSILLI, R. et al. Solid lipid microparticles containing the sunscreen agent, octyl-dimethylaminobenzoate: effect of the vehicle. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 66, p. 483-487, 2007.

TØNNESEN, H. H. Introduction: Photostability testing of drugs and drug formulations – Why and how? In: TØNNESEN, H. H. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2nd ed. London: CRC Press LCC, 2004.

USP 39. The United States Pharmacopeia. 38ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

VERSCHOYLE RD, BROWN AW, NOLAN C, RAY DE, LISTER T. A comparison of the acute toxicity, neuropathology, and electrophysiology of *N,N*-diethyl-*m*-toluamide and *N,N*-dimethyl-2,2-diphenylacetamide in rats. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 18:79–88, 1992.

VINARDEL, M.P; MACIAN, M. Comparative study of the HET-CAM test and the Draize eye test assessment of irritancy potential. **Toxicology in Vitro**. v. 8, n. 3, p. 467-470, 1994.

WANG, T.; GU, W. *In vitro* percutaneous permeation of the repellent DEET and the sunscreen oxybenzone across human skin. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v. 10, n. 1, p. 17-25, 2007.

WANG et al. Evaluation of percutaneous permeation of repellent DEET and sunscreen oxybenzone from emulsion-based formulations in artificial membrane and human skin. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 4, n. 1, p. 43-51, 2014

WICKERHAM, E.L. et al. Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants. **Environment International**. v. 47, p. 80–85, 2012.

WILES, D. et al. A lethal case of DEET toxicity due to intentional ingestion. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 38, n. 9, p. 696–698, 2014.

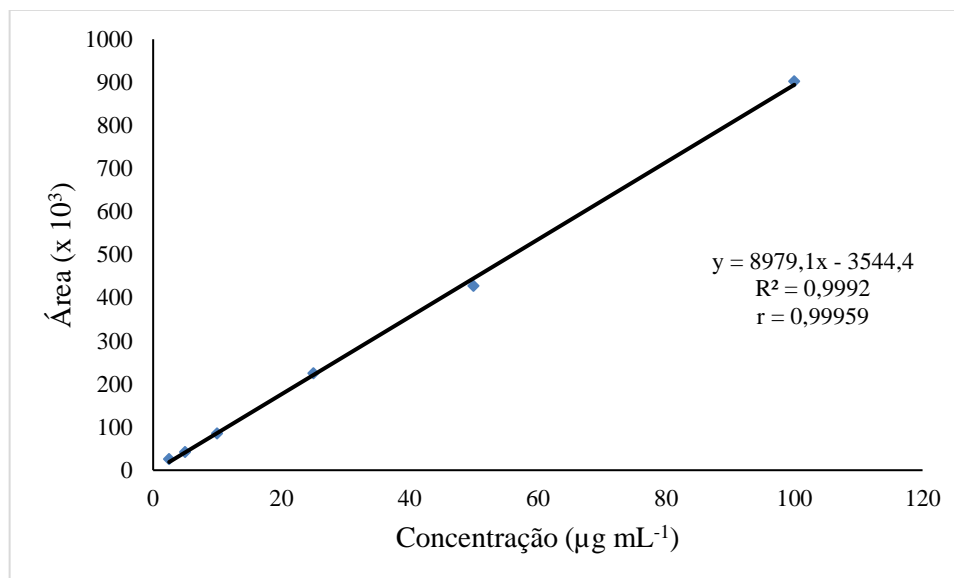
WILLIAMS, A. C., BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, Sup., p. 128–137, 2012.

WU, A. et al. High resolution gas chromatography mass spectrometric characterization of urinary metabolites of *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) in man. **Journal of High Resolution Chromatography**. v. 2, p. 558–562, 1979.

YABING SUN, Z. Y.; CHUNXIAO ZHANG, G. Z. Degradation of DEET in aqueous solution by water falling film dielectric barrier discharge: Effect of three operating modes and analysis of the mechanism and degradation pathway. **Chemical Engineering Journal**. v. 317, p. 90-102, 2017.

APÊNDICE A – DADOS PARA O ESTUDO DA LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO VALIDADO POR CLAE

Figura 1 – Curva média (n=3) de área *versus* concentração obtida para o estudo da linearidade, na faixa de 2,5 a 100 µg mL⁻¹.



Fonte: próprio autor

Tabela 1 – Avaliação da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos para o estudo da linearidade.

Teste	Estatística	Valor de p
Normalidade – Ryan Joiner	0,973232854	0,5678
Homocedasticidade - Cochran	0,596041868	0,0645
Independência – Durbin Watson	2,215110959	0,5830
Intercepto	-0,565171466	0,5798

Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA) para as retas utilizadas no estudo da linearidade.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre	4	$1,7138 \cdot 10^{12}$	$4,2845 \cdot 10^{11}$	1170,1028	3,48
Regressão linear	1	$1,7125 \cdot 10^{12}$	$1,7125 \cdot 10^{12}$	4676,8896	4,96*
Desvio de linearidade	3	$1,2895 \cdot 10^9$	$4,2983 \cdot 10^8$	1,1739	3,71
Resíduo (dentro ou erro)	13	$4,7602 \cdot 10^9$	$3,6617 \cdot 10^8$		
Total	17	$1,7186 \cdot 10^{12}$			

GL: graus de liberdade. *significativo para $p < 0,05$

**APÊNDICE B – DADOS PARA O ESTUDO DA EXATIDÃO DO MÉTODO POR
CLAE**

Tabela 1 – Estudo da exatidão do método analítico para a forma farmacêutica loção.

Nível (%)	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação média por nível (%) \pm DP	Recuperação média (n=9) (%) \pm DP
80	10	9,86	98,61	98,66 \pm 0,35	99,56 \pm 1,24
	10	9,83	98,34		
	10	9,90	99,03		
100	20	19,80	99,02	99,89 \pm 1,30	
	20	19,85	99,27		
	20	20,28	101,38		
120	30	29,54	98,47	100,15 \pm 1,56	
	30	30,13	100,42		
	30	30,46	101,55		

Tabela 2 – Estudo da exatidão do método analítico para a forma farmacêutica gel.

Nível (%)	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação média por nível (%) \pm DP	Recuperação média (n=9) (%) \pm DP
80	10	9,84	98,37	99,76 \pm 1,33	99,49 \pm 1,45
	10	10,10	101,01		
	10	9,99	99,90		
100	20	19,66	98,28	100,37 \pm 1,83	
	20	20,22	101,12		
	20	20,34	101,70		
120	30	29,49	98,30	98,34 \pm 0,19	
	30	29,57	98,55		
	30	29,45	98,18		

Tabela 3 – Estudo da exatidão do método analítico para a forma farmacêutica solução.

Nível (%)	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação média por nível (%) \pm DP	Recuperação média (n=9) (%) \pm DP
80	10	9,89	98,88	99,75 \pm 1,92	100,18 \pm 1,44
	10	9,84	98,41		
	10	10,19	101,95		
100	20	19,75	98,78	99,45 \pm 0,77	
	20	20,05	100,25		
	20	19,87	99,37		
120	30	30,05	100,17	101,34 \pm 1,02	
	30	30,59	101,95		
	30	30,57	101,90		

APÊNDICE C – DADOS PARA O ESTUDO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO VALIDADO POR CLAE

Tabela 1 - Planejamento fatorial completo e resultados da análise da robustez para a loção.

Amostra	Ordem	Fator			Teor (%)
		pH da fase aquosa	% fase aquosa	Vazão (mL.min ⁻¹)	
1	8	5,0	50	1,2	101,49
2	10	4,5	45	1,0	101,89
3	9	4,5	45	1,0	101,89
4	6	5,0	40	1,2	101,58
5	11	4,5	45	1,0	100,93
6	4	5,0	50	0,8	101,39
7	5	4,0	40	1,2	102,12
8	2	5,0	40	0,8	101,97
9	7	4,0	50	1,2	101,46
10	1	4,0	40	0,8	101,74
11	3	4,0	50	0,8	101,60

Tabela 2 - Planejamento fatorial completo e resultados da análise da robustez para o gel.

(continua)

Amostra	Ordem	Fator			Teor (%)
		pH da fase aquosa	% fase aquosa	Vazão (mL.min ⁻¹)	
1	11	4,5	45	1,0	103,76
2	6	5,0	40	1,2	103,45
3	7	4,0	50	1,2	102,73
4	8	5,0	50	1,2	102,56
5	2	5,0	40	0,8	103,35
6	4	5,0	50	0,8	103,27
7	5	4,0	40	1,2	103,16
8	3	4,0	50	0,8	102,94

(conclusão)

Amostra	Ordem	Fator			Teor (%)
		pH da fase aquosa	% fase aquosa	Vazão (mL.min ⁻¹)	
9	10	4,5	45	1,0	103,21
10	1	4,0	40	0,8	102,92
11	9	4,5	45	1,0	102,89

Tabela 3 -Planejamento fatorial completo e resultados da análise da robustez para a solução

Amostra	Ordem	Fator			Teor (%)
		pH da fase aquosa	% fase aquosa	Vazão (mL.min ⁻¹)	
1	4	5,0	50	0,8	86,27
2	7	4,0	50	1,2	86,00
3	5	4,0	40	1,2	85,57
4	6	5,0	40	1,2	86,12
5	3	4,0	50	0,8	86,02
6	8	5,0	50	1,2	85,86
7	2	5,0	40	0,8	86,19
8	9	4,5	45	1,0	85,94
9	1	4,0	40	0,8	86,50
10	10	4,5	45	1,0	86,38
11	11	4,5	45	1,0	86,22

APÊNDICE D – ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO SOB RADIAÇÃO UVC

Figura 1 – Perfil de degradação do DEET no estudo de cinética de degradação UVC, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, para a ordem zero.

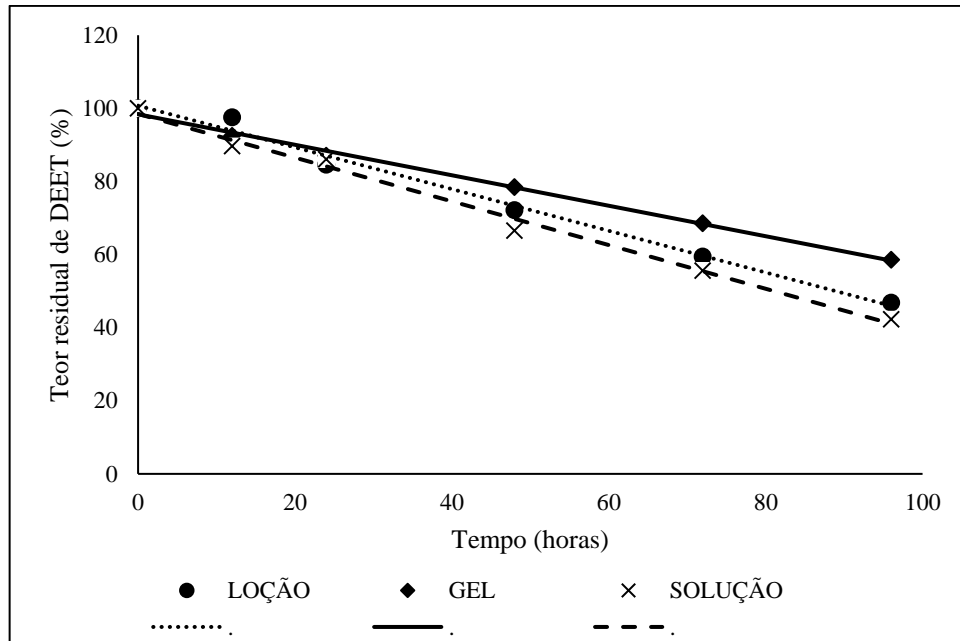


Figura 2 – Perfil de degradação do DEET no estudo de cinética de degradação UVC, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, para a primeira ordem.

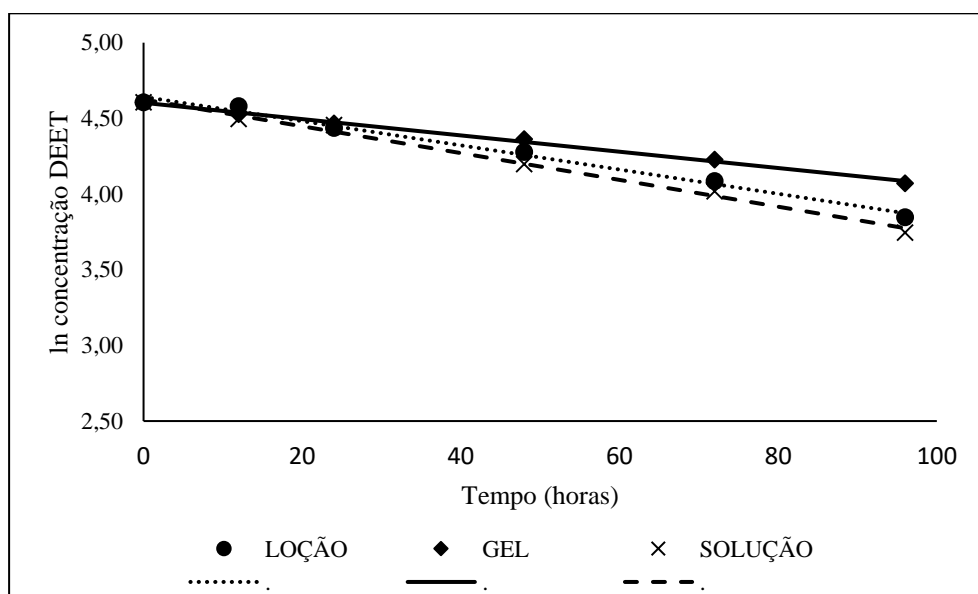
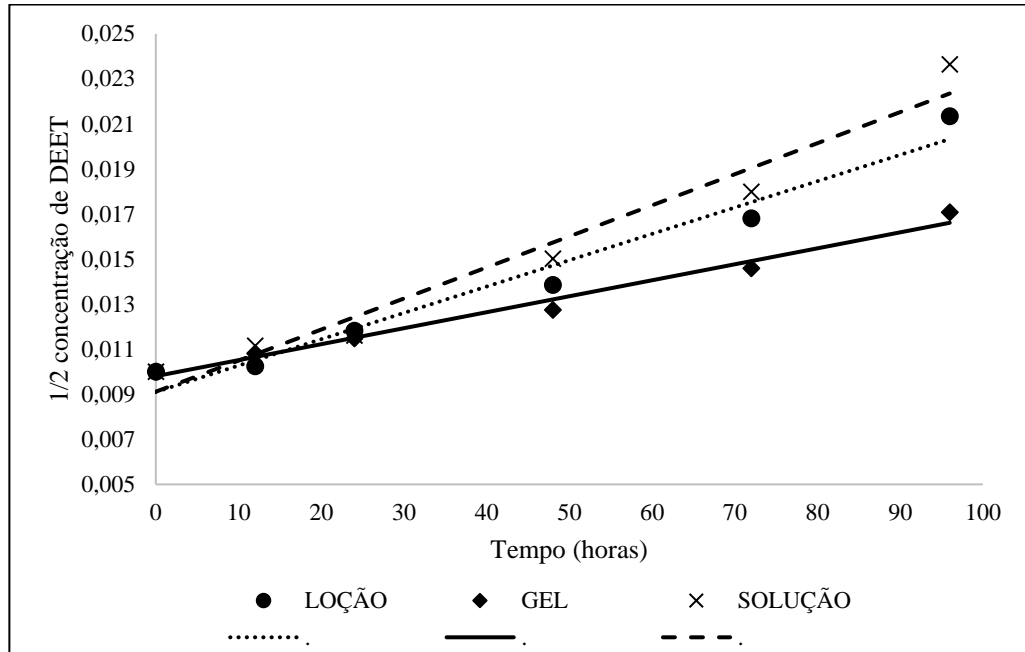


Figura 3 – Perfil de degradação do DEET no estudo de cinética de degradação UVC, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, para a segunda ordem.



APÊNDICE E – ESTUDO DE PENETRAÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA

Figura 1 – Célula vertical do tipo Franz, utilizada no estudo de penetração/permeação cutânea, com suas partes individualizadas.



(1) Compartimento doador; (2) Compartimento receptor; (3) Barra magnética agitadora;
(4) Garra para união das partes.

Fonte: próprio autor.

Figura 2 – Célula vertical do tipo Franz, utilizada no estudo de penetração/permeação cutânea, montada.



Fonte: próprio autor.