



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIEL SOUSA DOS SANTOS

**Estudo das propriedades físicas e avaliação da atividade
larvícida dos complexos metálicos de Rutina-Zn(II)**

Macapá
2018

DANIEL SOUSA DOS SANTOS

**Estudo das propriedades físicas e avaliação da atividade
larvicida dos complexos metálicos de Rutina-Zn(II)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes
Co-orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira

**Macapá
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Bibliotecária: Thalita Ferreira (CRB2 – 1557)

615.19

S237e Santos, Daniel Sousa dos

1.1.1. *Estudo das propriedades físicas e avaliação da atividade larvícida dos complexos metálicos de Rutina-Zn (II) / Daniel Sousa dos Santos ; orientador, Caio Pinho Fernandes ; co-orientador, Irlon Maciel Ferreira. – Macapá, 2018.*

39 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Flavonoide. 2. Atividade Larvícida. 3. Complexo metálico. 4. Rutina-Zn (II). I. Fernandes, Caio Pinho, orientador. II. Ferreira, Irlon Maciel, co-orientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

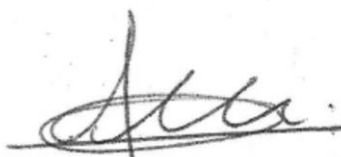
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

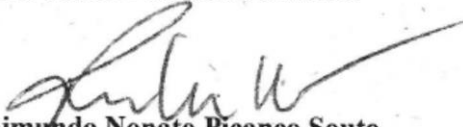
Aluno(a): Daniel Sousa dos Santos

Orientador(a): Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira



Dr. Irlon Maciel Ferreira
Membro Titular Presidente/UNIFAP



Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto
Membro Titular/UNIFAP



Dra. Brenda Lorena Sánchez Ortiz
Membro Titular/UNAM

Data: 07/03/2018

Dedico este trabalho:

À minha Mãe, meu Pai e meus Irmãos,

À minha pequena filha Margô e a minha esposa.

A vocês todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido esta oportunidade e por estar ao meu lado em todos os momentos durante esta caminhada.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes, o qual tenho profunda admiração, respeito e gratidão por seus ensinamentos, os quais foram indispensáveis para construção de minha formação.

Agradeço ao meu Co-Orientador Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira, por seus ensinamentos, pelas dicas que sem as quais não seria possível a realização deste trabalho, pelas longas horas compartilhadas em laboratório, e por toda amizade dividida ao longo desta jornada.

À Universidade Federal do Amapá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura necessária para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto pela realização dos ensaios larvicidas no Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá, e aos colaboradores Prof. Msc. Ricardo Marcelo e Karen por todo apoio.

Ao apoio institucional da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), por meio do Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica (Nanofito), Laboratório de Pesquisa em Fármacos (LPFar) e Grupo de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica (BIORG), que disponibilizaram a infraestrutura, material e equipamentos necessários para a execução do projeto de pesquisa.

À Mayara Mikelle pelo apoio incondicional em todos os momentos desta jornada e por me dar o melhor presente do universo, minha filha Margô.

À minha família pelo apoio e incentivo na minha carreira acadêmica.

Aos meus grandes amigos Erveton Pinheiro, Gerson Anderson, Marcelo Amanajás, Victor Peres, Nleide Andrade, Eliane Santos, e Ricardo Marcelo por todo incentivo, carinho e amizade.

Aos amigos de turma pelas experiências compartilhadas.

Aos companheiros(as) do Laboratório de Biocatálise e Biotransformação em Química orgânica (BIORG) e do Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica (Nanofito) pelas experiências e pelos cafezinhos divididos.

Muito Obrigado!

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	FLAVONOIDES.....	01
1.2	RUTINA.....	02
1.3	COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTINA	02
1.4	O <i>Aedes Aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	04
1.4.1	Ciclo de vida	04
1.4.2	Importância sanitária e alternativas no controle de <i>Aedes aegypti</i>	05
2	OBJETIVOS.....	07
2.1	OBJETIVO GERAL.....	07
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	07
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	08
3.1	MATERIAL.....	08
3.1.1	Reagentes e solventes.....	08
3.1.2	Equipamentos.....	08
3.2	SÍNTESE DO COMPLEXO.....	08
3.3	ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DOS COMPLEXOS.....	08
3.3.1	Espectroscopia de Infravermelho (FT- IR)	08
3.3.2	Espectroscopia de Ultravioleta na região Visível (UV-Vis)	09
3.3.3	Análise de difração de raios X (DRX).....	09
3.3.4	Análise de dispersão de luz dinâmica (DLS).....	09
3.4	ENSAIO BIOLÓGICO.....	10
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	10
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11

4.1	ESTUDOS DE ESPECTROSCOPIA UV-Vis.....	11
4.2	ESTUDOS DE ESPECTROSCOPIA FT-IR.....	12
4.3	ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X	14
4.4	ANÁLISES DE DLS.....	14
4.5	ENSAIO BIOLÓGICO.....	16
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	19
	REFERÊNCIAS.....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Núcleo químico base dos flavonoides.....	01
Figura 2	Estrutura química da rutina.....	02
Figura 3	Principais sítios de coordenação na Rutina.....	03
Figura 4	Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	04
Figura 5	Os espectros UV-Vis da rutina e do complexo Rutin-Zn solubilizados em DMSO.....	11
Figura 6	Os espectros FT-IR da rutina e do complexo Rutin-Zn.....	12
Figura 7	Difratograma complexo metálico de Rutina-Zn (II).....	14
Figura 8	A) Distribuição do tamanho da partícula de rutina livre B) Distribuição do tamanho de partícula do complexo rutina-Zn (II). Cada análise foi realizada em triplicata.....	15
Figura 9	Gráfico do modelo ajustado com 95,0% de limites de confiança após o tratamento de larvas de <i>Aedes aegypti</i> com rutina em 24h (A) e 48h (B). Gráfico do modelo ajustado com 95,0% de limites de confiança após o tratamento de larvas de <i>Aedes aegypti</i> com o complexo de rutina-Zn em 24h (C) e 48h (D).....	17

LISTA DE TABELAS E ANEXOS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais bandas e atribuições dos espectros infravermelhos para rutina e complexo de rutina.....	13
Tabela 2	Atividade larvícida da rutina e dos complexos de rutina-Zn.....	16

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Normas de publicação do Journal of the Brazilian Chemical Society.....	26
Anexo 2	Comprovante de Submissão.....	28

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

LC₅₀	Concentração Letal com mortalidade de 50% dos indivíduos
LC₉₀	Concentração Letal com mortalidade de 90% dos indivíduos
FT- IR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
UV-Vis	Espectroscopia de Ultra violeta na região Visível
DLS	Dispersão de luz dinâmica
h	Horas
rpm	Rotações por minutos
mol.L⁻¹	Mol por litro
mg.L⁻¹	Miligrama por litro
cm⁻¹	Centímetro a menos um
mmHg	Milímetros de mercúrio
nm	Nanometros
Np	Nanopartículas
KBr	Brometo de potássio
g	Gramas
DMSO	Dimetilsufóxido
λ	Comprimento de onda
ν	Vibrações de estiramento
δ	Vibrações de dobramento
°C	Graus Celsius
Zn	Zinco
Pdi	índice de polidispersão
UCL	limite de confiança superior
LCL	limite de confiança inferior.

Estudo das propriedades físicas e avaliação da atividade larvica dos complexos metálicos de Rutina-Zn(II)

Introdução: O mosquito *Aedes aegypti* tem se tornado um problema de saúde pública a nível mundial por ser um dos principais transmissores da dengue, zika, chikungunya e febre amarela. O controle do *A. aegypti* é realizado principalmente pela aplicação de pesticidas químicos sintéticos, alguns com alta toxicidade, o que vem causando impactos adversos na saúde do homem e danos sobre a biodiversidade. Portanto, produtos naturais e seus derivados estão sendo utilizados no controle das larvas de *A. aegypti*, deste modo, os flavonoides surgem como potencial alternativa no desenvolvimento de produtos para o controle do vetor. **Objetivo:** Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar as propriedades físicas dos complexos derivados da rutina e realizar o desenvolvimento da atividade larvica contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*. **Metodologia:** Inicialmente, foi sintetizado o complexo de rutina-Zn(II), misturando gota a gota uma solução metanólica de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{OO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,4 \text{ mol.L}^{-1}$) com uma solução metanólica de rutina ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). A mistura foi agitada a 300 rpm durante 24h a uma temperatura de 37-40°C e posteriormente o complexo foi filtrado à vácuo. Em seguida suas propriedades físicas foram determinadas por espectroscopias de FT-IR, UV-Vis, DRX e DLS. A atividade larvica foi avaliada contra as larvas de mosquito *Aedes aegypti*, por exposição a diferentes concentrações de formulações contendo os complexos metálicos em comparação com a rutina livre em 24h e 48h. **Resultados e discussões:** As análises de FT-IR, UV-Vis e DRX indicaram a formação de um complexo de Rutina-Zn com possíveis centros de ligação no sistema entre a carbolina presente no anel C e o grupo 5-OH e os grupos dihidroxil 3'-OH e/ou 4'-OH evidenciados pelos deslocamentos químicos observados nestas medidas. O estudo de DLS mostrou os complexos apresentaram maior tamanho médio de partícula e maior índice de polidispersão (Pdi) que o ligante, valores esperados devido a formação dos complexos, estas medidas indicaram boa homogeneidade na distribuição do tamanho de partícula dos complexos de rutina-Zn. Os dados do ensaio biológico sugerem que os complexos obtiveram aumento na atividade larvica contra as larvas de *Aedes aegypti*, apresentando melhores valores de LC_{50} e LC_{90} para 24h e 48h em comparação com a rutina. **Conclusões:** A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que este trabalho se mostrou promissor para o estudo novos agentes larvicidas baseados em flavonoide-metal, proporcionando boas perspectivas para o controle de larvas com abordagem não agressiva ao meio ambiente.

Palavras-Chave: Flavonoide. Complexo metálico. Rutina-Zn (II). Atividade larvica.

Agradecimentos: UNIFAP.

Study of the physical properties and evaluation of the larvicidal activity of Rutin-Zn(II) metal complexes

Introduction: The *Aedes aegypti* mosquito has been a public health problem worldwide as one of the main transmitters of dengue, zika, chikungunya and yellow fever. The control of *A. aegypti* is realized mainly by the application of synthetic chemical pesticides, some with high toxicity, which has been caused adverse impacts on human health and damages on biodiversity. Therefore, natural products and their derivatives are being used in the control of *A. aegypti* larvae, thus, flavonoids arise as an alternative potential in the development of products for vector control. **Objectives:** In this sense, the objective of this work was to analyze the physical properties of complexes derived from rutin and to carry out the development of larvicidal activity against larvae of the *Aedes aegypti* mosquitoes. **Methodology:** Initially, the rutin-Zn (II) complex was synthesized mixing dropwise a methanolic solution of $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{OO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.4 mol.L^{-1}) with a methanolic solution of rutin (0.1 mol L^{-1}). The mixture was stirred at 300 rpm for 24h at a temperature of 37-40 °C and subsequently the complex was vacuum filtered. Then its physics properties were determined by FT-IR, UV-Vis, DRX and DLS spectroscopies. The larvicidal activity was evaluated against *Aedes aegypti* mosquito larvae by exposure to different concentrations of formulations containing the metal complexes compared to the free rutin in 24h and 48h. **Results and discussion:** FT-IR UV-Vis and DRX analyzes indicated the formation of a Rutin- Zn complex with possible binding sites in the system between the ring C carbonyl and the 5-OH group and the dihydroxyl groups 3'-OH and / or 4'-OH evidenced by chemical shifts observed in these measurements. The DLS study showed that the complexes presented higher average particle size and higher polydispersion index (Pdi) than the ligand, expected values due to formation of the complexes, these measurements indicated good homogeneity in the distribution of the particle size of the Zn-rutin complexes. The data from the biological assay suggest that the complexes obtained an increase in larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae, presenting better LC_{50} and LC_{90} values for 24h and 48h compared to rutin. **Conclusions:** From the results obtained, it was possible to conclude that this work was promising for the study of new larvicidal agents based on flavonoid-metal, providing good perspectives for the control of larvae with an ecofriendly approach to the environment.

Keywords: *Flavonoid. Metal complex. Rutin-Zn (II). Larvicidal activity.*

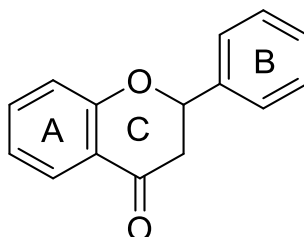
Acknowledgements: UNIFAP.

1.1 FLAVONOIDES

Os flavonoides são compostos polifenóis importantes e diversificados entre produtos de origem natural. Estes compostos são metabolitos secundários de plantas e são comumente encontrados em diferentes espécies de vegetais (SIMÕES et al., 2010). Esses compostos receberam interesse especial por suas atividades farmacológicas, as quais são atribuídas principalmente à sua capacidade de seqüestrar radicais livres, íons de quelatos de metal, enzimas antioxidantes ou sistemas enzimáticos específicos (LIN; WENG, 2006).

Quimicamente a maioria dos flavonoides baseiam-se em uma estrutura fundamental que possui um esqueleto formado por de 15 átomos de carbono constituído por dois anéis aromáticos (A e B como mostrado na Figura 1), ligado através de uma cadeia três carbonos (C) entre elas um oxigênio como heteroátomo (AGRAWAL, 2011; SIMÕES et al., 2010).

Figura 1 - Núcleo químico base dos flavonoides.



Fonte: Simões et al., (2010).

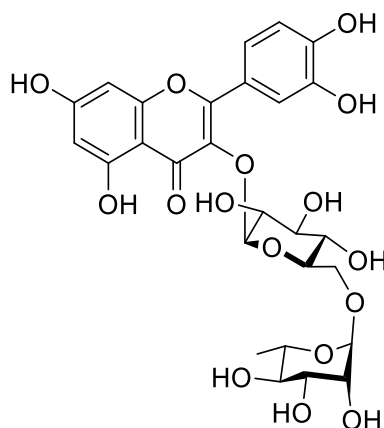
Essas classes de substâncias naturais são responsáveis por diversas funções nas plantas. Dentre elas, podem-se citar a proteção contra raios ultravioleta, contra insetos, fungos, vírus e bactérias, e a capacidade de proporcionarem a atração de animais polinizadores (SIMÕES et al., 2010).

Além dessas características, esses compostos possuem variadas propriedades farmacológicas, como exemplo: propriedades antitumoral (ALONSO-CASTRO et al., 2013), anti-inflamatória (CHAN et al., 1998; GARG et al., 2001), antiviral (MA et al., 2001; CARVALHO et al., 2013), antioxidante (KNEKT et al., 2000; VINAYAGAM; XU, 2015), antimicrobiana (PIMENTEL et al., 2013), dentre outras.

1.2 RUTINA

A rutina (3-O-rutinosídeo-quercetina) (Figura 2) é um flavonoide que pertence à subclasse dos flavonóis que vem ganhando destaque na medicina devido a inúmeras propriedades biológicas confirmadas, tais como, atividade antioxidante (VISKUPICOVA et al., 2010; AZEVEDO et al., 2013; SAMSONOWICZ et al. 2015), antimicrobiana (PIMENTEL et al., 2013; SAMSONOWICZ et al., 2015), antifúngica (OLIVEIRA et al., 2016), anti-inflamatória (YOO et al., 2014), antitumoral (ALONSO-CASTRO et al., 2013), antidiabética (NITURE et al., 2014; VINAYAGAM; XU, 2015), dentre outras (SIMÕES et al., 2010; ARUNA et al., 2013).

Figura 2 - Estrutura química da rutina.



Fonte: O autor.

1.3 COMPLEXOS METÁLICOS DE RUTINA

Complexos moleculares podem ser observados em sistemas constituídos por duas ou mais moléculas de fármaco. Geralmente, a coordenação resulta de interações atrativas, hidrofóbicas, eletrostáticas ou interações de transferência de carga, entre duas moléculas. No sistema de transferências de cargas um dos componentes é usualmente um composto aromático; o segundo pode ser uma estrutura saturada que contém um par de elétrons isolado (átomo doador) ou um hidrogênio fracamente ácido (átomo aceptor) (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

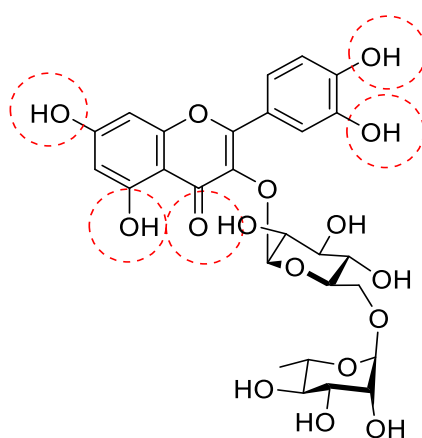
Os complexos de coordenação caracterizam-se por apresentar um íon metálico central, ligado a moléculas neutras ou ânions, denominados ligantes (L). O íon metálico (M) atua como ácido de Lewis e os ligantes como bases de Lewis (SHRIVER; ATKINS, 2003).

Para que ocorra a formação de complexo, os ligantes precisam ter pares de elétrons livres doados ao íon metálico. E quando o íon metálico se liga com mais de um átomo doador por ligante, formando um anel hétero-atômico, também conhecido como efeito de quelação (derivado do grego *chele*, que significa garra de lagosta) (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

A quelação altera as características físicas e químicas do íon metálico bem como do ligante. Na quelação, é conveniente considerar o ligante (em nosso caso rutina) como doador do par de elétrons e o metal como seu receptor formando uma ligação de química de coordenação (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Deste modo, a escolha da rutina como ligante torna-se interessante pois além de inúmeras atividades biológicas comprovadas descritas na literatura, este flavonoide, tem em sua estrutura química, diferentes sítios para coordenação de metais (Figura 3). Essas interações metal-ligante modificam as propriedades físico-químicas do ligante, dessa forma a coordenação de rutina com estes metais pode aumentar ou diminuir suas propriedades biológicas (IKEDA et al., 2015).

Figura 3 - Principais sítios de coordenação na Rutina



Fonte: O autor.

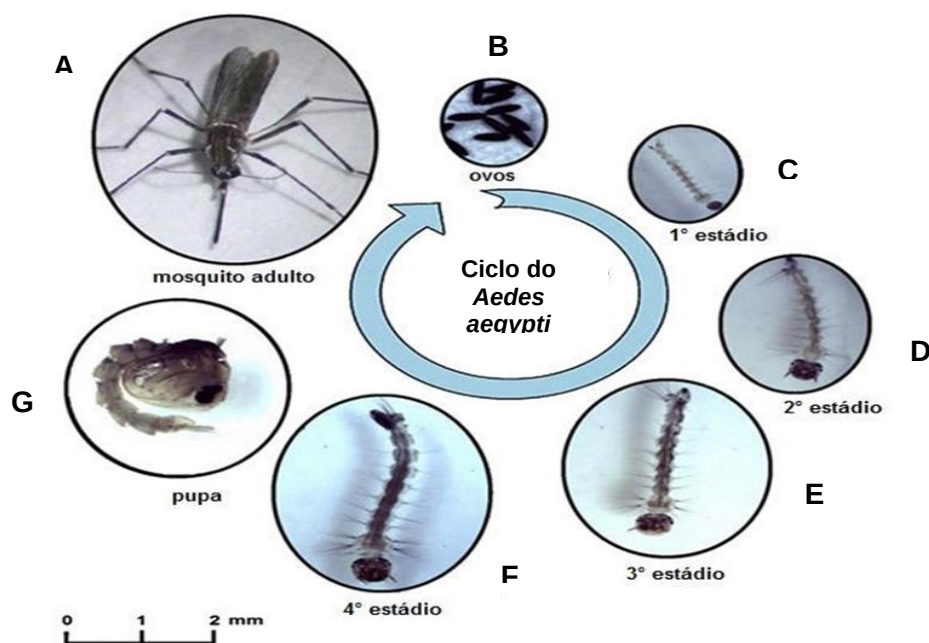
Quelatos de metais podem afetar a biodisponibilidade, e a toxicidade do ligante para diferentes metais (KALINOWSKA et al., 2016). E considerando que a rutina tem diferentes modos possíveis de ligação com o íon metálico de zinco para os centros de coordenação (KOVAL et al., 2006). Surge nos complexos uma enorme variedade de matéria prima para o estudo e desenvolvimento de produtos com potencial ação larvicida.

1.4 O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

1.4.1 Ciclo de vida

Um ovo de *Aedes aegypti* leva em média de 7 a 10 dias para se desenvolver e se tornar um mosquito adulto (Figura 4), onde o seu ciclo de vida completo envolve os estágios de ovo, larva, pupa e mosquito adulto. Os ovos possuem formato elíptico e as larvas são aquáticas, mas com respiração traqueal (FORATTINI, 2003).

Figura 4. Ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Mosquito adulto (A), ovos (B), larva de 1º estágio (C), larva de 2º estágio (D), larva de 3º estágio (E), larva de 4º estágio (F) e pupa (G).



Fonte: Geris et al. (2012).

Primeiramente as fêmeas do mosquito depositam ovos nas paredes internas dos recipientes que contêm água, na sequência os ovos aderem às paredes dos recipientes. Os ovos representam uma das fases mais resistentes do mosquito, os quais podem sobreviver em ambientes secos bem como em ambientes de baixas temperaturas quando atingem seu estado de estado de quiescência (SILVA; SILVA, 1999; GERIS et al., 2012).

No momento que em o ambiente está em condições favoráveis, as larvas eclodem dos ovos. É nesta fase que acontece o período de alimentação e crescimento, subdividindo-se em quatro fases evolutivas. Em boas condições de temperatura e disponibilidade de

alimento o desenvolvimento completo da fase larval leva em torno de cinco dias (BRASIL, 2001).

Depois da fase larval, o mosquito atinge o estágio de pupa, esta fase representa a última transformação do mosquito até a fase adulta. Durante esta fase a cabeça une-se ao tórax (denominado cefalotórax), fazendo com que ela venha ter aspecto de vírgula. Em boas condições a pupa atinge o seu desenvolvimento completo em dois dias (ACIOLE, 2009). Após a fase de pupa o inseto completa o seu ciclo de vida atinge a fase adulta, estando apto a reprodução. Nesta fase uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante toda a sua vida (BRASIL, 2001).

A fêmea do mosquito precisa fazer o repasto sanguíneo para completar seu ciclo gonadotrófico, que pode ser realizado com uma ou várias alimentações sanguíneas, aumentando a probabilidade de infectar-se e transmitir um determinado tipo de vírus (TEIXEIRA et al., 1999, GIL et al., 2010, FERNÁNDEZ et al., 2011).

1.4.2 Importância sanitária e alternativas no controle de *Aedes aegypti*

Atualmente os mosquitos do gênero *Aedes* tem se tornado um dos grandes problemas em saúde pública, devido serem um dos principais transmissores da dengue e febre amarela (NATAL, 2002; WHO, 2012). Dentre os inúmeros insetos vetores de doenças nos países tropicais o *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762), é o principal inseto transmissor dos vírus Chikungunya (CHIKV; gênero *Alphavirus*), Dengue (DENV; gênero *Flavivirus*), e Zika (gênero *Flavivirus*) aos seres humanos, e a ocorrência dessas doenças tem sido registradas a nível mundial (WILSON; SCHLAGENHAUF, 2016; RÜCKERT et al., 2017).

Dessa forma, nos últimos anos o controle químico do mosquito *Aedes aegypti*, com pesticidas de origem orgânica ou inorgânica, tem sido uma das medidas mais utilizadas no combate aos de vetores em saúde pública no mundo (ROSE, 2001). Dentre as principais classes de inseticidas utilizados ao longo do tempo no combate aos insetos destacam-se a classe dos inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (BRAGA; VALLE, 2007). No entanto, a utilização contínua desses produtos químicos, tanto na agricultura quanto pelos órgãos de saúde no combate a mosquitos vetores de doenças, tem gerado o surgimento de populações de insetos mais resistentes e ocasionado problemas para o meio ambiente (BRAGA; VALLE, 2007).

Todavia, o uso de pesticidas ainda são a forma de controle mais utilizada no combate ao *Aedes aegypti*, e isso tem causado grande preocupação na área de saúde pública devido ao fato de que os mosquitos vem apresentando resistência em todas as classes de

inseticidas, e isto tem afetado diretamente e em com profundidade na re-emergência das doenças transmitidas pelo vetor (BROGDON, MCALLISTER, 1998; BRAGA; VALLE, 2007). De acordo com este cenário, produtos de origem natural surgem como medidas alternativas úteis no controle do mosquito *Aedes aegypti* (RATTAN, 2010). Compostos extraídos de plantas pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários, como flavonoides, alcaloides, terpenoides, quinonas, fenilpropanoides, cumarinas, dentre outras tem apresentado atividade comprovada contra larvas de *Aedes aegypti* (GARCEZ et al., 2013).

Vale ressaltar ainda que nos últimos anos estudos apontam que flavonoides, mais especificamente rotenonas isolados do extrato etanólico das raízes de *Tephrosia toxicaria*, apresentaram atividade larvicida promissora no combate ao mosquito vetor *Aedes aegypti*, sugerindo um grande potencial do uso de flavonoides, bem os derivados dessa classe de produtos naturais como matéria prima para fabricação de bioinseticidas (VASCONCELOS, et al., 2012).

Neste contexto, o uso dos produtos naturais e seus derivados tem se tornado uma alternativa eficiente e promissora na fabricação de substâncias inseticidas menos agressivas aos seres humanos e ao meio ambiente. Portanto, o intuito deste trabalho consiste em avaliar as propriedades físicas e o potencial larvicida dos complexos derivados da rutina contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* com a finalidade de avaliar a viabilidade dos compostos obtidos no controle deste mosquito.

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo das propriedades físicas e avaliação da atividade larvícida dos complexos metálicos de rutina-Zn (II).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a síntese de complexos de coordenação de rutina com íons metálicos de Zn(II).
- b) Analisar as propriedades físico-químicas dos complexos de rutina através de técnicas de Espectrometria de Infravermelho (IV), Espectroscopia Ultravioleta na região Visível (UV-Vis), difratometria de raios X (DRX) e dispersão dinâmica de luz (DLS).
- c) Avaliar a atividade larvícida dos complexos obtidos contra o *Aedes aegypti*.
- d) Estimar os valores da LC₅₀ e LC₉₀ dos compostos obtidos através da análise de Probit.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagentes e solventes

A rutina foi adquirida da Sigma-Aldrich®. O sal metálico de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{OO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi adquirido da Synth®. Os reagentes metanol e DMSO foram adquiridos da Sigma-Aldrich® ambos apresentando alto grau de controle de alta qualidade.

3.1.2 Equipamentos

As reações foram desenvolvidas em um agitador magnético (Fisatom 752A) com aquecimento e velocidade controlada por circuito eletrônico proporcionando uma rotação entre 120 a 1800 rpm. A temperatura da reação foi controlada em banho de óleo por termômetro de vidro em escala de temperatura variável de 10 a 110 °C.

3.2 SÍNTESE DO COMPLEXO

Os complexos foram sintetizados de acordo com a metodologia descrita por Ikeda, et al., (2015), com algumas modificações. Uma solução de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{OO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,4 \text{ mol.L}^{-1}$) em metanol foi lentamente adicionada gota a gota a uma solução de rutina ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) em metanol. A mistura foi agitada a 300 rpm durante 24 h a uma temperatura de 37-40 °C. O complexo de rutina-Zn (II) foi filtrado usando um sistema de vácuo, lavado com metanol (3 x 2 mL) e seco à temperatura ambiente. Obteve-se o precipitado sólido e produziu 65,43% (p / p).

3.3 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DOS COMPLEXOS

3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (FT- IR)

Os espectros de infravermelhos (IR) foram realizados utilizando um espectrômetro Shimadzu IR affinity, operando com a transformada fourier. Os espectros foram obtidos na

região de 4000 a 400 cm^{-1} usando pastilhas KBr. As amostras foram previamente secas em sistema de vácuo por 4 h e foram preparadas misturando uma certa quantidade de compostos com o sal de KBr (grau espectroscópico). As misturas foram trituradas e pressionadas até a formação de grânulos finos e translúcidos.

3.3.2 Espectroscopia de Ultravioleta na região Visível (UV-Vis)

Os espectros UV-Vis foram obtidos em solução de DMSO, utilizando um espectrofotômetro de absorção óptica Shimadzu UV-2550, que apresenta uma fonte de radiação que cobre uma emissão do ultravioleta até próximo ao infravermelho, na faixa de comprimento de onda de 190 a 1100 nm. Os espectros de absorção UV-Vis das amostras em DMSO foram obtidos através da cuvete de quartzo com trajeto óptico de 1,0 cm a temperatura ambiente (28 °C).

3.3.3 Análise de difração de raios X (DRX)

Os difratogramas foram obtidos utilizando um Difractômetro de Raios X modelo D2 Phaser (Bruker), operando no modo PSD Rápido Contínuo, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) gerada por uma corrente elétrica de 10 mA e tensão de 30 kV. A velocidade de varredura utilizada foi de 3 ° por minuto em um intervalo de varredura de 5-60 °. As fases cristalinas foram identificadas através do banco de dados do software X'Pert HighScore Plus 2.2b (Panalytical B. V., Netherlands) versão livre.

3.3.4 Análise de dispersão de luz dinâmica (DLS)

O tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram medidos por dispersão de luz dinâmica usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) equipado com um laser "vermelho" de 10 mW ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) e as amostras foram medidas em um ângulo de detecção de dispersão de 90° para medidas de tamanho. Cada amostra de complexo de rutina e rutina-Zn (II), previamente solubilizada em DMSO, foi diluída em água desionizada na proporção de 1: 1 (v: v) utilizando um agitador de vortex. As medidas foram realizadas em triplicatas após 24 h de preparação da formulação e os resultados foram expressos como o diâmetro médio $\pm$ desvio padrão.

3.4 ENSAIO BIOLÓGICO

As larvas de *Aedes aegypti* foram obtidas no Laboratório Arthropoda da Universidade Federal do Amapá (Macapá, Brasil). O protocolo experimental foi realizado de acordo com a organização mundial da saúde (WHO, 2005) com algumas modificações. O ensaio biológico foi realizado sob condições controladas, onde as larvas do quarto estágio foram mantidas a 25 ± 2 °C, umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e um ciclo de 12 h luz:escuro. Os complexos foram solubilizados em DMSO e diluídos em água destilada variando de 700 a 100 mg.L⁻¹ (concentração expressa em teor da solução de rutina-zinco em meio aquoso). Todas as experiências foram realizadas em cinco repetições com 10 larvas do quarto instar em cada amostra replicada. O grupo controle foi constituído por água destilada e DMSO (2%) sendo realizado em paralelo (OLIVEIRA et al., 2013). A porcentagem de mortalidade foi registrada após 24 h e 48 h de exposição.

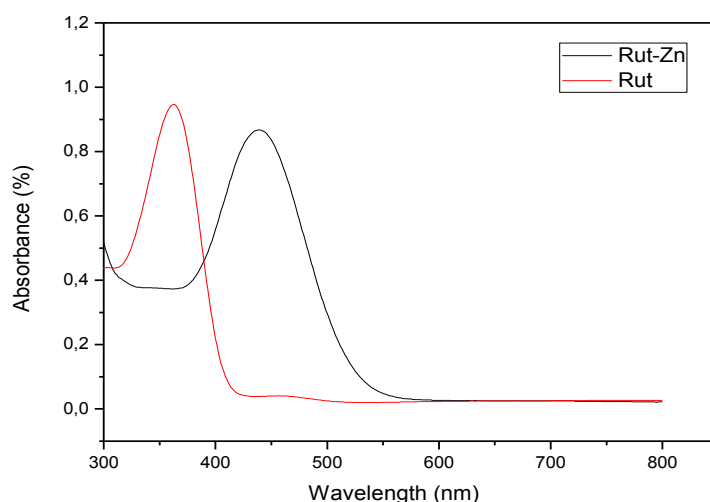
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A mortalidade do tratamento foi corrigida para os controles através da equação de Abbott (1925) quando houve mortalidade maior que 6% no grupo controle. As concentrações capazes de causar 50% (LC₅₀) e 90% (LC₉₀) da mortalidade das larvas e seus intervalos de confiança associados foram estimadas para as concentrações usando a análise probit (Finney, 1971) através do software Statgraphics® Centurion XVII (Inc., Statpoint Technologies, 2014) em 24 h e 48 h de exposição ao tratamento com os compostos obtidos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

4.1 ESTUDOS DE ESPECTROSCOPIA UV-VIS

As principais bandas de absorção do espectro UV-Vis das moléculas de rutina e do complexo de rutina são mostradas na Figura 5. As curvas de espectro UV-Vis do complexo e da rutina apresentaram bandas de absorção em diferentes comprimentos de onda e nas intensidades.

Figura 5 - Os espectros UV-Vis da rutina e do complexo Rutin-Zn solubilizados em DMSO.



Fonte: O autor.

A banda I (em vermelho), é referente ao espectro de absorção da molécula de rutina (solubilizada em DMSO), apresentou $\lambda_{\text{max}} = 362$ nm representando a absorção do anel B associado ao carbonilo do anel C (sistema cinamoil), esse resultado indica uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, provavelmente devido à transferência de elétrons do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), o orbital ligante π , ao orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO), o orbital antiligante π^* , presente na banda C=O com o par de elétrons livres (PAVIA et al., 2010).

Na banda II (em preto), em relação ao espectro de absorção da molécula do complexo de rutina-Zn, observou-se um $\lambda_{\text{max}} = 436$ nm, demonstrando claramente o centro de coordenação do metal, bem como a evidência do deslocamento batocromico da banda I para maiores comprimentos de onda devido ao efeito da conjugação dos íon metálicos

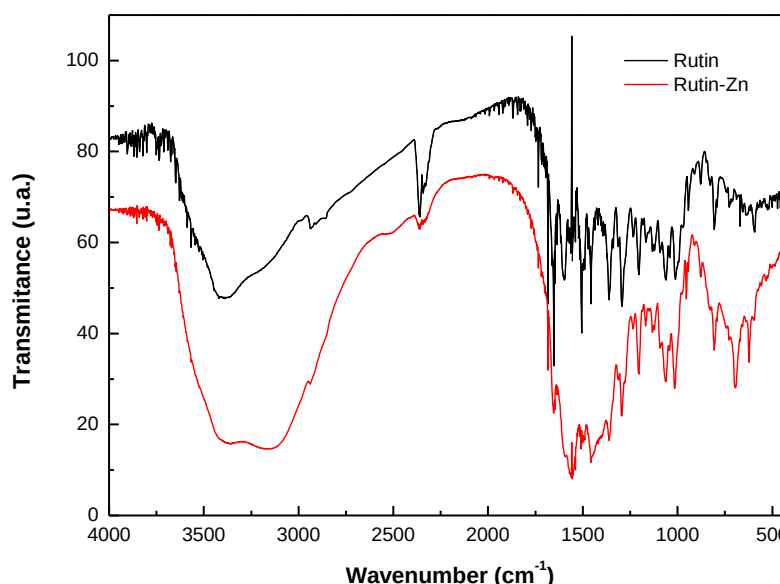
Zn(II) com o ligante, provavelmente devido ao aumento da extensão da conjugação no sistema entre a carbolina presente no anel C e o grupo 5-OH da rutina com o íon de zinco, que de acordo com a literatura resulta na diminuição da densidade eletrônica do flavonóide nos locais de coordenação, uma vez que o íon metálico atua como um ácido de Lewis (SIMÕES et al., 2013; IKEDA et al., 2015).

O deslocamento de elétrons do grupo 5-OH do metal complexo foi alto, demonstrando que a interação de Zn (II) com o grupo 5-OH resulta de uma redistribuição eletrônica entre a molécula de flavonóide e o íon metálico, formando um sistema de ligação π estendido (DEHGHAN; KHOSHKAM, 2012). A diferença ($\Delta\lambda_{\text{máx}} = 74 \text{ nm}$) sugere que houve uma diminuição nas frequências de oscilação, modos de vibração e rotação de moléculas complexas em relação à rutina livre (PAVIA et al., 2010).

4.2 ESTUDOS DE ESPECTROSCOPIA FT-IR

Os principais resultados para a espectroscopia FT-IV do complexo em comparação com a rutina são mostrados na Figura 6 e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 1, com algumas pequenas distinções oriundas do processo de coordenação.

Figura 6 - Os espectros FT-IR da rutina e do complexo Rutin-Zn



Fonte: O autor.

Tabela 1 - Principais bandas e atribuições dos espectros infravermelhos para rutina e complexo de rutina (posição da banda em cm^{-1}).

Rutina	Rutina- Zn	Atribuições
3389	$\sim 3360^a$ - 3161^b	$\nu(\text{O-H})^*$
1653	1593	$\nu(\text{C=O})$
1597	1568	$\nu(\text{C=C})$
1292	1294	$\nu(\text{C-O-C})$
1359	1361	$\nu(\text{C-OH})$
-	694	$\nu(\text{O-Zn})$

^aEspectros vibracionais referentes ao estiramento assimétrico da banda $\nu_a(\text{O-H})$ no complexo. ^bEspectros vibracionais referentes ao estiramento simétrico da banda $\nu_s(\text{O-H})$ no complexo. *Os símbolos denotam: ν vibrações de estiramento.

A presença do pico de absorção a 694 cm^{-1} no espectro de IR do complexo indica possivelmente a formação de ligações O-Zn, demonstrando a formação do complexo Rutina-Zn (NAKAMOTO, 1986). O modo de estiramento da ligação C=O da molécula de rutina livre ocorre a 1653 cm^{-1} , e devido a interação do ligante com os íons de Zn(II) a banda de absorção dos modos de estiramento C=O do complexo foi deslocada para 1593 cm^{-1} , o que pode ser explicado pela coordenação do oxigênio do carbonilo com o íon metálico (PAVIA, 2010).

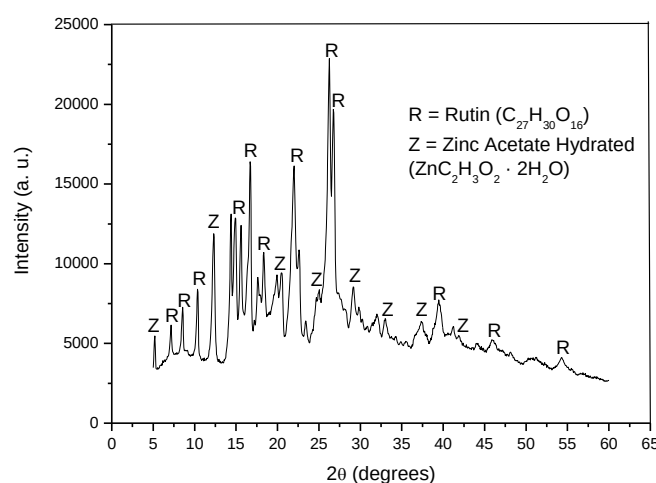
As bandas localizadas em 1597 cm^{-1} e 1292 cm^{-1} , respectivamente estão relacionados às frequências de vibração $\nu(\text{C=C})$ e $\nu(\text{C-O-C})$ no espectro de rutina e são ligeiramente deslocadas após a complexação com Zn(II) para 1568 cm^{-1} e 1294 cm^{-1} . Além disso percebe-se um aumento da ordem de ligação da banda referente à deformação da ligação C-OH, de 1359 cm^{-1} no ligante para 1361 cm^{-1} no complexo o que possivelmente está relacionado com a coordenação nos sítios dos grupamentos fenólicos presentes na rutina (5-OH, 3'-OH e/ou 4'-OH) (DEHGHAN; KHOSHKAM, 2012; SIMÕES et al., 2013; IKEDA et al., 2015).

Uma grande e forte banda de frequência de vibração $\nu(\text{O-H})$ foi obtida em 3389 cm^{-1} no ligante e sofreu deslocamentos significativos no complexo, estes resultados indicam a existência moléculas de água na estrutura do complexo através de ligações hidrogênio (PAVIA, 2010).

4.3 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

O difratograma do complexo metálico de Rutina-Zinco (II), mostrado na figura 7 revelou a presença de picos relacionados à fase cristalina da Rutina e do Acetato de Zinco Hidratado, com predomínio do flavonóide. Os picos característicos da Rutina aparecem proeminente em torno de 17°, 26° e 22°, enquanto os picos do acetato de zinco são menos intensos, exceto pelo pico característico a 12°.

Figura 7 - Difratograma complexo metálico de Rutina-Zn (II).



Fonte: O autor.

Além disso, o difratograma do complexo mostrou que possui estrutura semicristalina com índice de cristalinidade de 53,6%, mostrando que o material apresenta boa estabilidade físico-química. De fato, Wei et al.³⁰ relatam que a Rutina tem uma dissolução limitada, uma característica que possivelmente permaneceu no complexo, uma vez que as fases cristalinas do flavanóide dominaram a estrutura atômica do material.

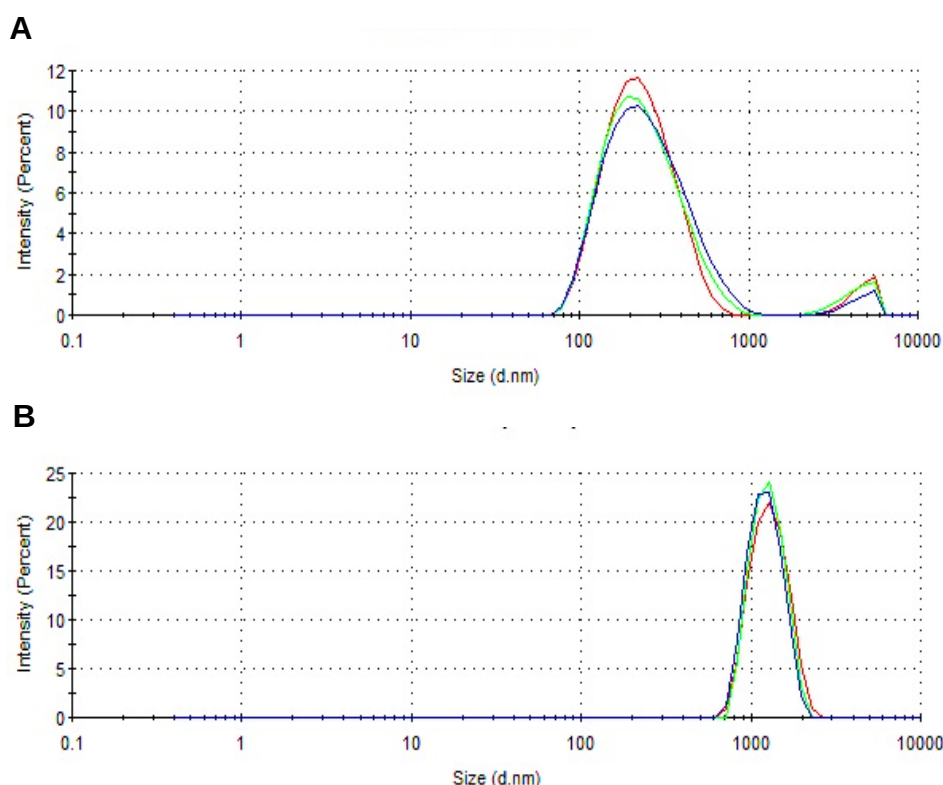
4.4 ANÁLISES DE DLS

No presente estudo, as formulações contendo apenas rutina apresentaram média tamanho de partícula de $225,9 \pm 2,495$ nm e um índice de polidispersão (Pdi) de $0,276 \pm 0,02$). Enquanto que as formulações contendo os complexos de rutina-Zn apresentaram aumento do tamanho médio de partículas para $1501 \pm 18,77$ nm e índice de polidispersão igual a $0,437 \pm 0,113$, estes valores são esperados devido a formação do complexo e a

alteração nas propriedades físico-químicas em decorrência da modificação na estrutura molecular.

Na Figura 8, pode-se observar o comportamento da distribuição de tamanho de partícula das formulações e verificar que, para a formulação de rutina, houve uma distribuição ampla e bimodal, o que sugere uma maior variedade de partículas de diferentes tamanhos, enquanto que para a formulação contendo os complexos obtiveram uma distribuição nítida e unimodal, sugerindo boa uniformidade no tamanho das partículas.

Figura 8 - A) Distribuição do tamanho da partícula de rutina livre B) Distribuição do tamanho de partícula do complexo rutina-Zn (II). Cada análise foi realizada em triplicata.



Fonte: O autor.

Mauludin e Müller (2013) obtiveram nanosuspensões de rutina contendo sulfato de sódio dodecil pela técnica de homogeneização por alta pressão, apresentando tamanhos médios de partícula em torno de 547-912 nm que se mantiveram estáveis ao longo de 12 meses. No entanto, esta técnica faz uso de altas forças disruptivas através de alto aporte de energia que eleva o custo da dispersabilidade do composto desejado.

As análises DLS realizadas no presente estudo mostraram que a formação do complexo permitiu uma melhor homogeneidade em relação ao tamanho das partículas. A caracterização do tamanho de partícula por esta técnica, também conhecida como

espectroscopia de correlação de fótons, ganhou especial interesse como técnica de mesa (BHATTACHARJEE, 2016), especialmente devido ao fato de que as diferenças de tamanho podem induzir diferentes propriedades biológicas.

4.5 ENSAIO BIOLÓGICO

Os principais resultados obtidos do ensaio biológico dos compostos estudados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade larvívica da rutina e dos complexos de rutina-Zn.

Composto	LC ₅₀ (LCL-UCL) ^a (mg.L ⁻¹)		LC ₉₀ (LCL-UCL) (mg.L ⁻¹)	
	24h	48h	24h	48h
Rutina	1364,31 (out -708,796)	321,797 (187,655-419,452)	2773,49 (out-1221,380)	701,038 (565,493-1065,440)
Rutina- Zn(II)	408,264 (328,993-489,192)	226,785 (141,082-288,589)	682,844 (579,824-901,717)	419,639 (348,657-571,029)

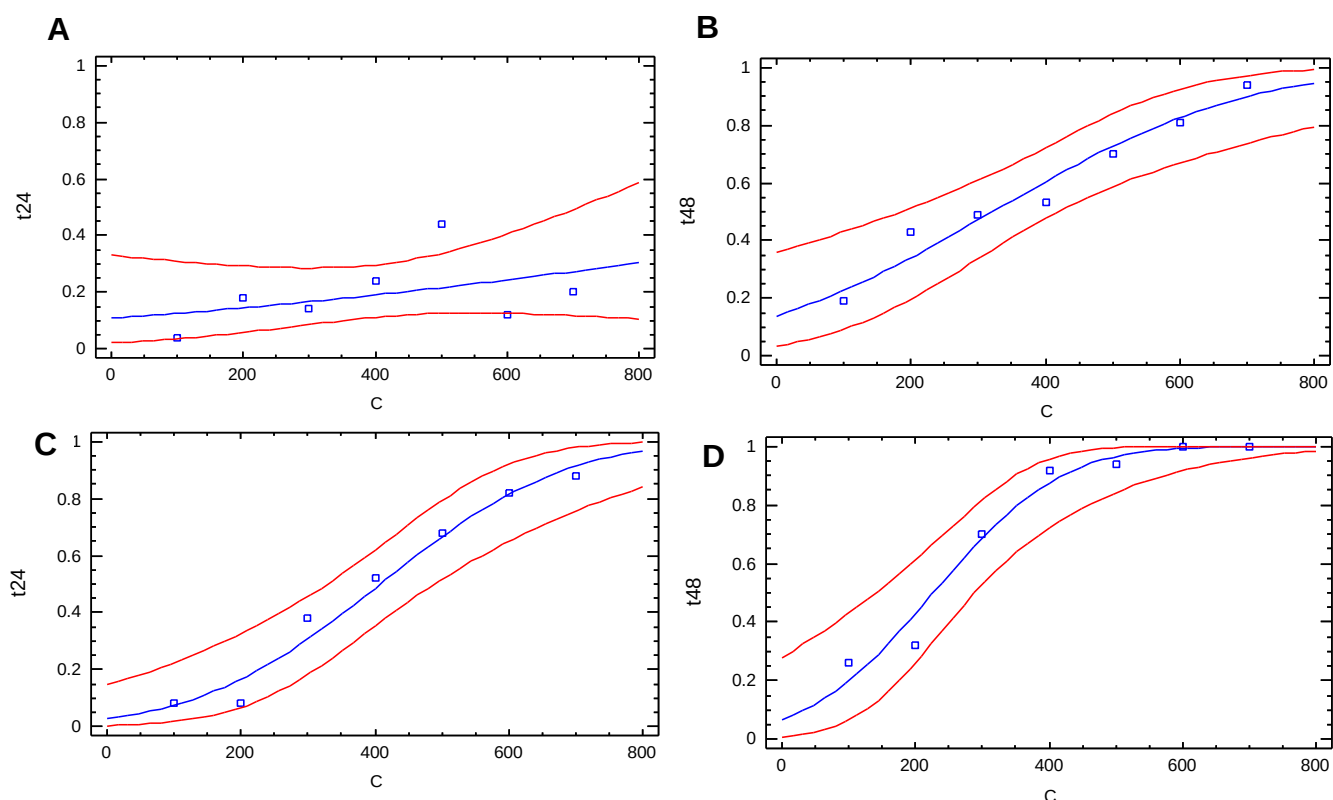
^aConcentrações LC₅₀ and LC₉₀ são concentrações letais capazes de matar 50% e 90 % das larvas expostas em 24h e 48h, nível significativo em P <0,05, UCL-limite de confiança superior, LCL- limite de confiança inferior. Valor médio de cinco repetições.

Os efeitos da mortalidade larval em 24 h da rutina mostrou LC₅₀ = 1364,31 mg.L⁻¹ e LC₉₀ = 2773,49 mg.L⁻¹ (r² = 0,175). Após 48 h os resultados mostraram valores de LC₅₀ = 321,797 mg.L⁻¹ e LC₉₀ = 701,038 mg.L⁻¹ (r² = 0,946). Menores valores foram observados depois do tratamento com complexos de rutina-Zn (II), em 24 h apresentando valores de LC₅₀= 408,264 mg.L⁻¹ e LC₉₀= 682,844 mg.L⁻¹ (r² = 0,963). E depois de 48 h de exposição os resultados para LC₅₀ e LC₉₀ foram 226,785 mg.L⁻¹ e 419,639 mg.L⁻¹, respectivamente (r² = 0,964). Os valores de qui-quadrado foram significantes quando p ≤ 0,05.

Os valores referentes a porcentagem de desvio foram explicadas pelo modelo (t₂₄ = 1,04843; t₄₈ =16,5537), assim como sua porcentagem ajustada (t₂₄ = 5,96015; t₄₈ = 17,4842), onde foram observadas para o modelo na análise de desvio após 24 h (p = 0,3059) e 48 h (p <0,05) para estimativa da LC₅₀ e LC₉₀ para a rutina (Figura. 9, A e B). Estes dados indicam que para atividade larvívica da rutina em 24h o modelo apresentou baixa resolução, provavelmente ligado à questões biológicas das larvas na forma de

absorção do composto. No entanto, após as 48 h de exposição, os dados indicaram uma excelente resolução do modelo para a estimativa da mortalidade larval, provavelmente devido ao aumento da disponibilidade do composto, uma vez que a mortalidade também dependia do tempo.

Figura 9 - Gráfico do modelo ajustado com 95,0% de limites de confiança após o tratamento de larvas de *Aedes aegypti* com rotina em 24 h (A) e 48 h (B). Gráfico do modelo ajustado com 95,0% de limites de confiança após o tratamento de larvas de *Aedes aegypti* com o complexo de rotina-Zn (II) em 24 h (C) e 48 h (D).



Fonte: O autor.

Da mesma forma, uma baixa porcentagem de desvio também foi explicada pelo modelo ($t_{24} = 28,3708$; $t_{48} = 33,4851$) e baixa porcentagem ajustada ($t_{24} = 29,4373$; $t_{48} = 34,7224$) foram observadas para o modelo na análise de desvio após 24 h ($p < 0,05$) e 48 h ($p < 0,05$) para estimativa dos valores da LC_{50} e LC_{90} par os complexos de rotina-Zn (II) (Figura 11, C e D). Esses dados indicam uma excelente resolução do modelo t_{24} e do modelo t_{48} dos complexos obtidos na correlação entre os valores de concentração e a mortalidade larval, provavelmente devido à melhor disponibilidade desde o início dos experimentos com alto grau de homogeneidade de partículas, conforme observado nas medidas DLS.

Em nossa observação, os valores de LC₅₀ e LC₉₀ contra *Aedes aegypti* em 24 h, bem como em 48 h, foram significativamente mais eficientes para os complexos rutina-Zn (II) do que para a rutina livre. Estes resultados sugerem que os complexos apresentaram melhor atividade larvícida provavelmente devido à complexação da rutina com Zn (II) na forma de um sistema melhor dispersável. Este efeito foi previamente relatado na literatura usando nanossistemas metálicos. Nanopartículas de níquel preparadas com extrato de folha aquosa obtidas a partir de *Aegle marmelos* apresentaram maior resistência larvícida contra *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* do que os extratos aquosos de acetato de etila e metanol, evidenciados por valores mais baixos de LC₅₀ quando comparados aos extratos puros (ANGAJALA et al., 2014). Nanopartículas de prata preparadas com extrato aquoso de *Toddalia asiatica* foram capazes de induzir níveis de mortalidade em larvas de *C. quinquefasciatus*, sendo também mais ativo do que o extrato aquoso puro (MURUGAN et al., 2015).

A atividade larvícida melhorada contra *A. aegypti* também foi observada para nanopartículas de prata preparadas com extrato aquoso a partir de folhas de *Leucas aspera*, quando comparadas com extratos aquosos e orgânicos à base de solvente (SUGANYA et al., 2014). Nanopartículas de zinco foram obtidas utilizando o extrato das folhas da planta *Momordica charantia* por uma abordagem ambientalmente aceitável e apresentaram maior efeito larvícida quando comparados aos extratos das espécies vegetais, contra larvas de *A. stephensi* e *C. quinquefasciatus* (GANDHI et al., 2017).

Neste contexto, estudos realizados por Montenegro et al. (2006) com produtos naturais sugerem uma classificação de acordo com a mortalidade percentual de larvas expostas em até 250 mg.L⁻¹ durante 48 h como: promissores (> 75% de mortalidade), parcialmente promissores (>50% e < 75% de mortalidade) e fracamente promissores (>25% e <50% de mortalidade). Dessa forma, a partir da análise do valor de LC₅₀ contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* para os complexos de rutina-Zn (II) pode-se afirmar que os complexos sintetizados podem ser considerados como produtos potencialmente promissores.

No entanto, a organização mundial da saúde indica que alguns agentes larvicidas podem apresentar ação rápida ou lenta (WHO, 2005). Portanto, estudos adicionais devem ser realizados para correlacionar a distribuição do tamanho de partículas, bem como a relação metal-ligante, ligados ao processo de síntese, com a atividade larvícida inicial e residual, a fim de obter uma metodologia de otimização de complexos para potencialização dos resultados larvicidas.

O presente trabalho estudou a interação entre o composto da rutina e o íon de Zn, onde as análises de espectroscopias FT-IR, UV e DRX sugerem a formação do complexo metálico, de modo que o íon de Zn é coordenado com a rutina ao longo do grupo carbonilo (posição 4-oxo) e 5-hidroxilo, assim como, nas posições 3'-OH e 4'-OH do anel aromático.

A análise DLS indicou que o complexo de rutina-Zn (II) obtido mostrou uniformidade na distribuição de tamanho de partícula e o valor de Pdi sugere que esses compostos apresentaram boa estabilidade física.

A análise estatística do ensaio biológico apresentou modelos com boas resoluções para a predição dos valores de LC₅₀ e LC₉₀, onde esses dados indicaram maior efeito larvicida no complexo contra as larvas de *Aedes aegypti* em comparação com a rutina livre, este aumento pode ser associado ao aumento da disponibilidade do composto durante o tratamento, evidenciado pela alta homogeneidade de partículas, conforme observado nas medidas de DLS.

Os dados obtidos sugerem que o complexo de rutina-Zn(II) pode ser considerado como potencial matéria prima para fabricação de futuros agentes larvicidas, no entanto, testes visando a otimização do processo de síntese devem ser realizados a fim de determinar a estrutura com maior atividade larvicida, e melhor disponibilidade durante o tratamento.

Portanto, os resultados apontam que essas descobertas são interessantes em relação a estudos futuros pois apresenta uma abordagem não agressiva ao meio ambiente para obtenção novos agentes larvicidas baseados em flavonoide-metal, proporcionando boas perspectivas para o controle de larvas.

ABBOTT, W. S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **J Econ. Entomol.** v. 18, p. 265-267, 1925.

ACIOLE, S.D.G. **Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como Alternativa de Controle às Larvas de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).** 2009. p.86. Dissertação (Biologia Humana e Ambiente). Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Animal, Lisboa, 2009.

AGRAWAL, A. D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. **International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology**, v. 4, n.2, p. 1394–1398, 2011.

ALONSO-CASTRO, A. J.; DOMÍNGUEZ, F.; GARCÍA-CARRANCA, A. Rutin Exerts Antitumor Effects on Nude Mice Bearing SW480 Tumor. **Archives of Medical Research**, v. 44, p. 346-351, 2013.

ANGAJALA, G.; RAMYA, R.; SUBASHINI, R. In-vitro anti-inflammatory and mosquito larvicidal efficacy of nickel nanoparticles phytofabricated from aqueous leaf extracts of *Aegle marmelos* Correa. **Acta Tropica**, 135, 19–26, 2014.

ARUNA, R.; GEETHA, A.; SUGUNA, P. Expression of caspase activation recruitment and pyrin domain levels of apoptosis-associated speck-like protein complex in the pancreas of rats subjected to experimental pancreatitis: Influence of rutin administration. **Humam e Experimental Toxicology**, v. 33, p. 940-948, 2013.

AZEVEDO, M. I.; PEREIRA, A. F.; NOGUEIRA, R. B.; ROLIM, F. E.; BRITO, G. A. C.; WONG, D. V. T.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; RIBEIRO, R. D. A.; VALE, M. L. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v. 9, p. 53, 2013.

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

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.

BRASIL. Fundação Nacional da Saúde. Ministério da Saúde. **Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor.** Manual de normas técnicas. 3.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BROGDON, W. G, MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 605-613, 1998.

CARVALHO, O. V.; OLIVEIRA, F. S.; SARAIVA, G. L.; BOTELHO, C. V.; FERREIRA, H. C. C.; SANTOS, M. R.; SILVA JÚNIOR, A.; ALMEIDA, M. R. Potencial anti-viral da

- quercetina sobre o parvovírus canino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.65, n.2, p. 353-358, Belo Horizonte, 2013.
- CHAN, S. C.; CHANG, Y. S.; WANG, J. P.; CHEN S. C.; KUO, S. C. Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. **Planta Med.**, v. 64, n. 2, p. 153-158, 1998.
- CHEONG, J. N.; TAN, C. P.; MAN, Y. B. C.; MISRAN, M. α -Tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**. v. 89, p. 204–209, 2008.
- DEHGHAN, G.; KHOSHKAM, Z. Tin(II)–quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. **Food Chem.** 131, 422-426, 2012.
- FERNÁNDEZ, L. D.; PINEDA, C. C.; FRANCOIS, L. A. *Aedes (St.) aegypti*: relevância entomoepidemiológica y estratégias para su control. **AMC**, v. 22, p. 610-625, 2011.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**, 3ª ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1971.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo, 2003.
- FLORENCE. A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 2ª ed.; Pharmabooks, São Paulo, 2011.
- GANDHI, P. R.; JAYASEELAN, C.; MARY, R. R.; MATHIVANAN, D.; SUSEEM, S. R. Acaricidal, pediculicidal and larvicidal activity of synthesized ZnO nanoparticles using *Momordica charantia* leaf extract against blood feeding parasites. **Exp Parasitol.** v. 181, p. 47-56, 2017.
- GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; DA SILVA, L. M. G. E., SARMENTO, U. C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvídica Contra *Aedes aegypti*. **Rev. Virtual Quím.** v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.
- GARG, A.; GARG, S; ZANEVELD, L. J.; SINGLA, A. K.. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research.** v. 15, n. 8. p. 655–669, 2001.
- GERIS, R.; RIBEIRO, P. R.; BRANDÃO, M. S.; SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. **Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector dengue**. In: Atta-ur-Rahman, F. R. S. *Studies in natural products chemistry*. Elsevier. Amsterdã, v. 37, p. 277-376, 2012.
- GIL, D. C. Q; BENÍTEZ, J. E. O; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, M. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del dengue. **IATREIA**, v. 23, p. 146-156, 2010.
- IKEDA, N. E. A.; NOVAK, E. M.; MARIA D. A.; VELOSA, A. S.; PEREIRA R. M. S. Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin–Zinc(II) flavonoid–metal complex. **Chemico-Biological Interactions**, v. 239, p. 184–191, 2015.
- INC., STATPOINT TECHNOLOGIES. **Statgraphics Centurion XVII - Data Analysis Solutions**, 2014.

- KALINOWSKA, M.; ŚWIDERSKI, G.; MATEJCZYK, M.; LEWANDOWSKI, W. Spectroscopic, thermogravimetric and biological studies of Na(I), Ni(II) and Zn(II) complexes of quercetin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 126, n. 1, p. 141–148, 2016.
- KNEKT, P.; ISOTUPA, S.; RISSANEN, H.; HELIÖVAARA, M.; JÄRVINEN, R.; HÄKKINEN, S.; AROMAA, A.; REUNANEN, A. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 54, n. 5, pp. 415-417, 2000.
- KOVAL, I. A.; GAMEZ, P.; BELLE, C.; SELMECZIB, K.; REEDIJK, J. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 814–840, 2006.
- LIN, J. K.; WENG, S. **Flavonoids as nutraceuticals**, 1^a ed.; Springer, Nova York, USA, 2006.
- MA, S. C.; BUT, P. P.; OOI, V. E.; HE, Y. H.; LEE, S. H, LEE, S. F, LIN, R. C. Antiviral amentoflavone from *Selaginella sinensis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 3. p. 311-312, 2001.
- MAULUDIN, R.; MÜLLER, R. H. Preparation and storage stability of rutin nanosuspensions. **Journal of Pharmaceutical Investigation**. v. 43, p. 395, 2013.
- MONTENEGRO, L. H. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; ROCHA, E. M. M.; BRITO, A. C.; ARAÚJO, R. M.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, R. P. L. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, p. 611–617, 2006.
- MURUGAN, K.; VENUS, J. S. E. ; PANNEERSELVAM, C.; BEDINI, S.; CONTI, B.; NICOLETTI, M.; SARKAR, S. K.;HWANG, J. S.; SUBRAMANIAM, J.; MADHIYAZHAGAN, P.; KUMAR, P. M.; DINESH, D.; SURESH, U.; BENELLI, G. Biosynthesis, mosquitocidal and antibacterial properties of *Toddalia asiatica*-synthesized silver nanoparticles: do they impact predation of guppy *Poecilia reticulata* against the filariasis mosquito *Culex quinquefasciatus*?. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 17053–17064, 2015.
- NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 4^a ed.; John Wiley & Sons, New York, USA, 1986.
- NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, p. 205-207, 2002.
- NITURE, N. T.; ANSARI, A. A.; NAIK, S. R. Anti-hyperglycemic activity of Rutin in streptozotocin-induced diabetic rats: An effect mediated through cytokines, antioxidants and lipid biomarkers. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, p. 720-727, 2014.
- OLIVEIRA, G. L; CARDOSO, S. K.; LARA JÚNIOR, C. R; VIEIRA, T. M; GUIMARÃES, E. F; FIGUEIREDO, L. S; MARTINS, E. R.; MOREIRA; D. L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **An. Acad. Braz. Cienc.**, v. 85, n. 4, p. 1227-1234, 2013.

OLIVEIRA, V. M.; CARRARO, E.; AULER, M. E.; KHALIL, N. M. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 1029-1034, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Intrdução à espectroscopia**, 4^a ed.; Cengage learning, USA, 2010.

PIMENTEL, R. B. D. Q.; DA COSTA, C. A; ALBUQUERQUE, P. M.; JUNIOR, S. D. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 151, 2013.

RATTAN R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, p. 913-920, 2010.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 17-23, 2001.

RÜCKERT, C.; WEGER-LUCARELLI, J.; GARCIA-LUNA, S. M.; YOUNG, M. C.; BYAS, A. D.; MURRIETA, R. A.; FAUVER, J. R.; EBEL, G. D. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nat. Commun.** 2017, 8, 15412. doi: 10.1038/ncomms15412.

SAMSONOWICZ, M.; KAMÍNSKA, I.; KALINOWSKA, M.; LEWANDOWSKI, W. Alkali metal salts of rutin – Synthesis, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV–VIS), antioxidant and antimicrobial studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 151, p. 926-938, 2015.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**, 3^a ed. Bookman, p. 240-270, 2003.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicios*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 32, n.4, p.349-355, 1999.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora UFRGS e UFSC, Cap. 7, 6^a ed, 2010.

SIMÕES, V. N.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; DE OLIVEIRA, T. D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, M. J.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A. A.; DOS ANJOS, A. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Química Nova**. v. 36, n. 4, p. 495-501, 2013.

SUGANYA, G.; KARTHI, S.; SHIVAKUMAR, M. S. Larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized from *Lucas aspera* leaf extracts against dengue vector *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, 113, 1673–1679, 2014.

TEIXEIRA, M. G; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Info Epidemiol, SUS**, v. 8, p. 5-33, 1999.

VASCONCELOS, J. N.; SANTIAGO, G. M. P.; LIMA, J. Q.; MAFEZOLI, J.; LEMOS, T. L. G. D.; DA SILVA, F. R. L.; LIMA, M. A. S.; PIMENTA, A. T. A.; BRAZ-FILHO, R.; ARRIAGA, A. M. C.; CESARIN-SOBRINHO, D. Rotenoids from *tephrosia toxicaria* with larvicidal activity against *aedes aegypti*, the main vector of dengue fever. **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1097-1100, 2012.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, p. 60, 2015.

VISKUPICOVA, J.; DANIHELOVA, M.; ONDREJOVIC M.; LIPTAJ T.; STURDIK, E. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. **Food Chemistry**, v. 123, p. 45-50, 2010.

WILSON, M. E.; SCHLAGENHAUF, P. *Aedes* and the triple threat of DENV, CHIKV, ZIKV – Arboviral risks and prevention at the 2016 Rio Olympic Games. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2016.

WHO. **Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020**. World Health Organization, Geneva: Switzerland, 2012.

WHO. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2005.

WHO. **Resistance of vectors of disease to pesticides: fifth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control**. World Health Organization, Technical Report Series 655, Geneva, Switzerland, 1980.

YOO, H.; KU, SAE-KWANG; BAEK, YOUNG-DOO; BAE, JONG-SUP. Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. **Inflammation Research**, v. 63, p. 197–206, 2014.

Anexo 1 – Normas de publicação do Journal of the Brazilian Chemical Society

1 PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Font: Times New Roman

Font Size: 12

Font Color: Black

Spacing: double spaced

Pages: numbered consecutively

Tables, Schemes, Figures and captions: placed in the text, as close as possible to the first citation.

Figures: numbered with Arabic numerals. For full manuscripts containing material previously published in preliminary form, a copy of the previous communication is required and should be included at the end of the manuscript.

Maps: insert as **Supplementary Information**

Main sections (Introduction, Experimental, Results and Discussion, Conclusion section) of the manuscript should NOT be numbered, EXCEPT for Account and Review.

Supplementary Information (SI): needs to be included at the end of manuscript, after the **Conclusions** section.

It should contain RELEVANT and COMPLEMENTARY DATA to those presented in the manuscript. If new compounds are identified or characterized, **all spectra** should be included (see Section 8).

Graphics/Figures/Schemes: files should be uploaded in the system individually. JBCS preference is for files from original programs since editable files facilitate the correction of details out of JBCS standard. Some suggested extensions:

Structures in: *.cdx (ChemDraw);

Graphics in: *.opj/org (Origin); *.xls/xlsx (Excel);

Others in: *.cdr (CorelDraw); *.tif/jpg (Paint), etc.

2 DETAILS:

First Page

- Graphical Abstract (GA)

Second Page

- Title

- Authors' names: full given name, followed by the middle name initial(s) and then by the full last name.

An asterisk (*) should follow the name of the corresponding author.

- Addresses: Authors are asked to provide full addresses for correspondence. The e-mail address of the corresponding author should be given as a footnote. If the address where the work was carried out is different from the present address of any of the authors, a footnote indicating the current position can be included. Each address should have a correspondent letter.

Third Page

-Abstracts: maximum of 150 words for Articles, Accounts and Reviews and 50 words for Short Reports and Communications.

-Keywords: a minimum of three and maximum of five. Broad-sense words such as "water" should be avoided.

The text should start from the third page of the manuscript.

Language

Only manuscripts written in English will be considered. Standard English and American English spellings are allowed but consistency should be maintained within the manuscript.

Style and format

•Main Sections: First initial with capital letter, bold, no final full stop. Should not be numbered, except for Reviews and Accounts:

- **Introduction**

- **Experimental** (or **Methodology** in case of theoretical and computational papers)

- **Results and Discussion** or **Results** then **Discussion** (alternatively, Experimental may follow Results and Discussion)

- **Conclusions**

- **Supplementary Information** (if you have): include the following text just to mention (not to add graphs and data here) the existence of the supplementary data, see the example:

- **Acknowledgments**

- **References**

Anexo 2 – Comprovante de Submissão

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of the Brazilian Chemical Society

Manuscript ID

JBCHS-2018-0095

Title

Study of the physical properties and larvicidal activity of rutin-Zn (II) metal complex

Authors

dos Santos, Daniel
Ferreira, Ricardo
Souto, Raimundo
carvalho, José
Fernandes, Caio
Ferreira, Irlon

Date Submitted

04-Mar-2018