



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

LETÍCIE ZULMIRA DA SILVA PESSOA

**Nanosuspensão de quercetina: obtenção, caracterização e
avaliação da atividade larvicida frente a *Aedes aegypti*
(Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).**

Macapá
2018

LETÍCIE ZULMIRA DA SILVA PESSOA

**Nanosuspensão de quercetina: obtenção, caracterização e
avaliação da atividade larvicida frente a *Aedes aegypti* (Linnaeus
1762) (Diptera: Culicidae).**

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.^a Dr^a Raquel Silva Araújo
Co-orientador: Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

**Macapá
2018**

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

615.32

P475n Pessoa, Letícia Zulmira da Silva.

1.1.1. *Nanosuspensão de quercetina: obtenção, caracterização e avaliação da atividade larvívora frente a Aedes Aegypti (Linnaeus 1792) (Diptera : Culicidae) / Letícia Zulmira da Silva Pessoa ; orientadora, Raquel Silva Araújo ; co-orientador, Raimundo Nonato Picanço Souto. – Macapá, 2018.*

67 f.

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

1. *Aedes Aegypti*. 2. Atividade Larvívora. 3. Nanosuspensão. 4. Inseticida natural. I. Araújo, Raquel Silva, orientadora. II. Souto, Raimundo Nonato Picanço, co-orientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

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

BANCA EXAMINADORA

Aluna: Letície Zulmira da Silva Pessoa

Orientadora: Dr^a. Raquel Silva Araújo

Co-Orientador: Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto



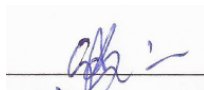
Dra. Raquel Silva Araújo/Presidente

Universidade Federal do Amapá, UNIFAP



Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

Universidade Federal do Amapá, UNIFAP



Dr. Ricardo Adaime da Silva

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA.



Dr. Gabriel Araújo da Silva

Universidade do Estado do Amapá – UEAP

Data: 06/03/2018

Dedico este trabalho à minha família...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida, pela saúde e por me abençoar em tudo que faço.

À minha mãe Ivone por todo incentivo e entusiasmo a ingressar na vida acadêmica e ser a minha fonte de inspiração.

Ao meu pai Adelson por todo incentivo e apoio. À minha irmã Larissa por todos os conselhos.

Aos meus avós Ediberto e Pastora (*in memoriam*) pela participação que tiveram em minha educação.

Ao meu noivo Pedro por ser um companheiro de todas as horas e me trazer felicidade diária.

Ao prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto por acreditar em mim e me orientar desde o início desse projeto me repassando um pouco do seu vasto conhecimento. Por sempre me direcionar aos melhores caminhos a seguir na vida acadêmica e estar sempre disposto a me ensinar com humildade, paciência e dedicação, sendo para mim um exemplo de profissional e ser humano.

À profa. Dr^a Raquel Silva Araújo por todo ensinamento ao longo desse caminho, por me apresentar ao mundo da nanotecnologia, pelo acolhimento paciente, por me inserir no grupo de estudos em Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica – NANOFITO, por se dedicar a esse projeto junto a mim e me orientar com muito profissionalismo, ética, respeito e compromisso. Pelos conselhos e toda experiência repassada que levarei comigo ao longo deste caminho.

Aos profs. Drs. Caio Pinho Fernandes, Rodrigo Alves Cruz e a Profa. Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota de Oliveira.

A profa. Dra. Silvia Maria Mathes Faustino pelo conhecimento repassado.

As equipes dos laboratórios ARTHROLAB, NANOFITO e do Laboratório de Pesquisa em Fármacos.

À técnica Karen e ao Prof. Ricardo pelos os ensinamentos nos testes no insetário.

Aos amigos Jéssica, Taires, Ícaro, John e Lisset pelo companheirismo desde o início.

À Universidade Federal do Amapá pelo acolhimento e estrutura em todo o desenvolvimento da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida no decorrer da realização deste projeto.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Arboviroses e manifestações clínicas_____	03
1.2	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)_____	05
1.2.1	OVOS de <i>Aedes aegypti</i> _____	06
1.2.2	LARVAS de <i>Aedes aegypti</i> _____	07
1.2.3	A PUPA de <i>Aedes aegypti</i> _____	07
1.3	INSETICIDAS SINTÉTICOS_____	08
1.4	INSETICIDAS DE ORIGEM VEGETAL_____	10
1.5	FLAVONOIDES: ASPECTOS GERAIS_____	14
1.5.1	QUERCETINA_____	15
1.6	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO_____	17
1.7	ECOTOXICIDADE DE NANOESTRUTURAS_____	19
2	OBJETIVO GERAL _____	22
3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	22
4	REFERÊNCIAS _____	23
5	ARTIGO _____	32
	CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	56
	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO _____	57
	ANEXO 1	

Figura 1-	Distribuição da dengue no mundo nos últimos dez anos.....	03
Figura 2-	Distribuição mundial de casos de Chikungunya nos últimos dez anos....	04
Figura 3-	Distribuição mundial do vírus Zika nos últimos dez anos.....	05
Figura 4-	Ovos do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE).....	06
Figura 5-	Larvas de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762.....	07
Figura 6-	Larvas (amarelas) e pupas (marrons) (A) e mosquito na forma adulta (B) de <i>Aedes aegypti</i>	08
Figura 7-	Estrutura molecular de alguns inseticidas de origem vegetal.....	11
Figura 8-	Estrutura básica dos flavonoides.....	15
Figura 9-	Estrutura molecular da quercetina(A) e da quercetina-glicosídeo (B).....	16
Figura 10-	Células viáveis da alga <i>Chlorella vulgaris</i>	20

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

MS-	Barreira Hematoencefálica
CL₅₀-	Concentração letal que mata 50% da população em estudo Distribuição mundial do vírus Zika nos últimos dez anos
DDT-	Diclorodifeniltricloroetano
DENV-	Vírus da dengue
MS-	Ministério da Saúde
mV-	Milivolt
NS-	Nanosuspensão
NS-QUE-	Nanosuspensão de quercetina
Nanofito-	Laboratório de Nanotecnologia Fitofarmacêutica
nm-	Nanômetro
O/A-	Óleo em água
IP-	Índice de polidispersão (do inglês: Polydispersity index)
ppm-	Partes por milhão
QUE-	Quercetina
WHO-	Organização Mundial da Saúde (do inglês: World Health Organization)
DMSO-	Dimetilsulfóxido
h-	Hora
H₂O -	Água
g/kg-	Grama por quilograma
g/ml-	Grama por mililitro
mg/kg-	Miligrama por quilograma
min-	Minuto (s)
mL-	Mililitro (s)
°C-	Grau (s) Celsius
ZS-	ZetaSizer
µm-	Micromêtro
% -	Porcentagem

Nanosuspensão de quercetina: obtenção, caracterização e avaliação da atividade larvívica frente a *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

Introdução: Doenças virais transmitidas por vetores como *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae), configuram um importante problema de saúde pública no Brasil. O uso de inseticidas químicos sintéticos no controle de vetores apresenta toxicidade ambiental e causa resistência aos mosquitos. Observa-se a necessidade de desenvolvimento de inseticidas de origem natural com intuito de evitar o uso destas substâncias e diminuir a toxicidade ambiental. A quercetina é um flavonol muito encontrado em alimentos e possui diversas atividades biológicas. Suas ações frente a determinadas pragas, configura-se como uma alternativa para o controle do *A. aegypti*. No entanto, sua baixa solubilidade aquosa dificulta a elaboração de um produto dispersível em água, onde as larvas do mosquito desenvolvem-se. **Objetivo:** Este trabalho visa apresentar estudos de toxicidade da nanosuspensão de quercetina (NS-QUE) comparados com sua forma livre (QUE) em larvas de *A. aegypti*, além de avaliar seu impacto ambiental em algas da espécie *Chlorella vulgaris*. **Metodologia:** NS-QUE foi preparada de acordo com o método de deslocamento do solvente seguido de sua evaporação. As características físico-químicas foram monitoradas por 30 dias. A eficácia da NS-QUE e QUE foi testada frente à larvas de *A. Aegypti* por 240h nas concentrações de 100 ppm, 175 ppm, 250 ppm, 375 ppm e 500 ppm. A morfologia das larvas foi estudada por microscopia eletrônica de varredura. **Resultados:** NS-QUE foram obtidas com sucesso por uma técnica de baixo aporte de energia e de baixo custo. Ambas as formulações foram tóxicas para as larvas, especialmente NS-QUE. Em altas concentrações a atividade larvívica de NS-QUE foi superior à sua forma livre, QUE. Não foram observados indicativos de toxicidade ambiental para as concentrações testadas com NS-QUE. **Conclusão:** Estes dados contribuíram para a futura utilização de NS-QUE como um candidato promissor no controle de vetores como *A. Aegypti*, uma vez que apresentou atividade tóxica seletiva em suas larvas.

Palavras-chave: Vetores; Nanosuspensões; Flavonoides; Inseticidas Naturais; Ecotoxicidade

Agradecimentos: CAPES e UNIFAP.

Nanosuspension of quercetin: obtainment, characterization and larvicidal action against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

Introduction: Viral diseases transmitted by vectors such as *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae), constitute an important public health problem in Brazil. The use of synthetic chemical insecticides in vector control demonstrates environmental toxicity and causes resistance to mosquitoes. It is observed the need to develop insecticides of natural origin in order to avoid the use of these substances and reduce environmental toxicity. Quercetin is flavonol widely found in foods and has many biological activities. Its actions against certain pests, can be considered an alternative for the control of *A. aegypti*. However, its low aqueous solubility makes it difficult to produce a water-dispersible product, where the larvae of the mosquito develop. **Objective:** This work aim to produce quercetin nanosuspension (NS-QUE) and evaluate its toxicity in *A. aegypti* larvae compared to its bulk form (QUE). Thus it also evaluate its environmental impact on algae of the species *Chlorella vulgaris*. **Methodology:** NS-QUE was prepared by solvent displacement method followed by evaporation. The physico-chemical characteristics were monitored for 30 days. The efficacy of NS-QUE and bulk QUE was performed against *A. aegypti* larvae for 240 h with concentrations of 100 ppm, 175 ppm, 250 ppm, 375 ppm and 500 ppm and the larval morphology was performed by scanning electron microscopy. **Results:** NS-QUE were successfully obtained by a low energy method cost technique. NS-QUE and bulk QUE demonstrated toxic effect against the larvae, especially the nanosuspensions. A superior larvicidal activity of NS-QUE was observed when compared to its bulk form, especially in high concentrations. No environmental toxicity was observed for concentrations tested with NS-QUE. **Conclusion:** These data may contribute to the future use of NS-QUE as a promising candidate for the control of vectors such as *A. aegypti*, since they present a selective toxic activity in the larvae.

Key-Words: Vectors; Nanosuspension; Flavonoids; Natural Insecticides, ecotoxicity

Acknowledgements: CAPES e UNIFAP.

Existe no Brasil e no mundo uma luta contra a erradicação de mosquitos causadores de doenças, fato que impulsiona a investigação de soluções para a prevenção e controle frente a esses vetores. Atualmente, a preocupação da saúde pública no Brasil é a alta incidência de doenças virais transmitidas pelo mosquito *Aedes Aegypti* (Diptera, Culicidae), tal como a dengue. Além disso, esse mosquito também transmite a febre Chikungunya e a Zika, sendo que esta última apresentou um grande impacto no Brasil por causa do surto de microcefalia em bebês nos anos de 2015 e 2016. Dentre essas doenças, a dengue é a mais prevalente e a uma das medidas de prevenção da doença está baseado no controle do vetor da doença, o mosquito *A. aegypti* (ZARA et al., 2016).

Ainda que a literatura entomológica tenha aumentado acentuadamente nos últimos dez anos no Brasil, as informações disponíveis sobre a conduta no controle epidemiológico de vetores são insuficientes para que se faça melhor uso da seletividade ecológica em agroecossistemas. Sendo assim, são indispensáveis maiores conhecimentos nas áreas da biologia, da dinâmica populacional e da ecologia de populações, com o objetivo de selecionar inseticidas e obter dosagens que não apresentem ecotoxicidade, bem como que controlem seletivamente os insetos-praga.

O controle dos mosquitos tem sido realizado utilizando-se inseticidas de origem sintética, tais como o DDT (dicloro-difenil-cloro-etano), malationa e o temefós. Estes possuem alta toxicidade ambiental e podem causar resistência dos mosquitos aos inseticidas (BRAGA et al., 2007). Por isso, a pesquisa e a aplicação de ativos de origem natural surgem com o intuito de criar uma alternativa aos inseticidas sintéticos, minimizando os efeitos tóxicos causados por eles. Nesse contexto, o grupo dos flavonoides, considerado o grupo mais abundante encontrado na natureza, têm sido alvo de constantes pesquisas, visto que já existem estudos comprovados sobre algumas de suas ações biológicas. No entanto, o uso desses compostos no controle de vetores ainda é pouco explorado. A quercetina é um dos flavonóides mais presentes em plantas e vegetais, tais como maçã, cebola e couve. A sua atividade antioxidante é consequência do seu alto número de hidroxilas em sua estrutura molecular, fato que pode influenciar também na metabolização de enzimas e no metabolismo das membranas celulares.

O interesse científico pela quercetina tem aumentado de forma significativa, pois suas múltiplas ações biológicas (anticarcinogênico, protetor hepático, renal e cardiovascular)

propõem novas perspectivas. Além disso, este composto atua sobre o desenvolvimento de alguns insetos-praga, possibilitando o seu uso como larvicida. Porém, a quercetina possui baixa solubilidade em água, dificultando a elaboração de um produto dispersível em sistemas aquosos onde as larvas encontram-se.

Diante disso, o desenvolvimento de nanoestruturas surge como uma alternativa para possibilitar a dispersão de substâncias lipofílicas, tal como a quercetina, em água. Além disso podem apresentar vantagens, como: aumento da solubilidade, alteração da biodistribuição e controle de liberação. Dentre as nanoestruturas, tem-se as nanosuspensões que são sistemas dispersos compostos de uma fase dispersa sólida imiscível em outra fase denominada fase dispersante (ZANETTI-RAMOS; CRECZYNSKI-PASA, 2016). Diversas nanoestruturas contendo quercetina são reportadas na literatura, como nanocápsulas, nanoemulsões e nanosuspensões (CODEVILLA et al., 2015). Porém, não existe o monitoramento da eficácia de nenhuma nenhuma destas formulações frente a larvas de mosquitos como *A. aegypti*.

O emprego de nanoformulações no combate de pragas ainda é pouco explorado, visto que a utilização de inseticidas sintéticos ainda prevalece no mercado atual. Porém, nas últimas décadas, trabalhos realizados empregando ativos de origem natural ou nanoestruturas com ativos de origem natural frente às larvas de diferentes espécies de mosquitos têm crescido e obtiveram bons resultados, evidenciando que os produtos naturais são fontes valiosas como inseticidas, sejam na forma livre ou nanoestruturada. Apesar de sua importância, as nanoestruturas podem apresentar toxicidade ambiental, visto que as características desses compostos podem induzir um acúmulo no solo, bem como facilitar a sua fácil translocação para organismos não alvos, como plantas e animais, em decorrência de suas partículas pequenas, causando toxicidade (CARVALHO et al., 2015).

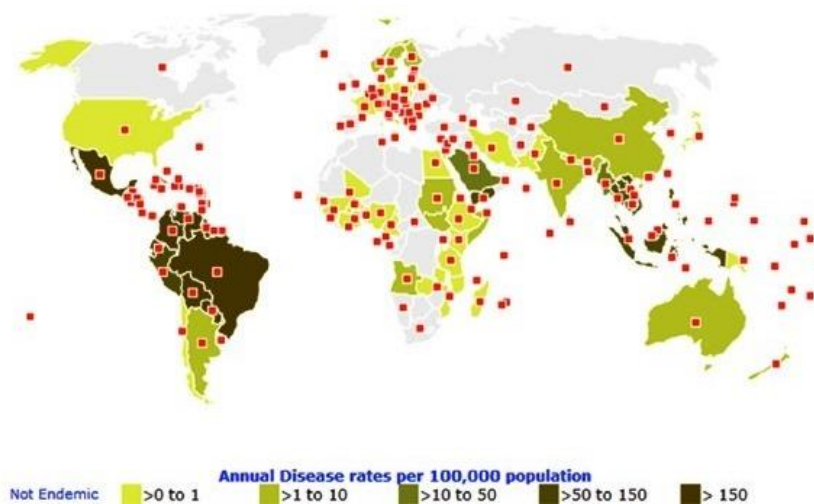
Por sua vez, o presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de uma nanoformulação contendo uma substância de origem natural, a quercetina, e avaliação do seu efeito frente ao vetor *A. aegypti*. Além disso, sua toxicidade ambiental frente a algas *Chlorella vulgaris* foi também avaliada. Neste sentido, espera-se que a nanoformulação produzida possa constituir uma alternativa eficaz e segura no combate de *A. aegypti* e outros vetores.

1.1 Arboviroses e manifestações clínicas

Existe no Brasil e no mundo uma luta contra a ampla distribuição de mosquitos transmissores de arboviroses tais como a dengue, Chikungunya e Zika. São doenças virais com característica cosmopolita e de sintomas inespecíficos (VALLE et al., 2016). Elas diferenciam-se basicamente por suas manifestações clínicas e o tempo de incubação (WHO, 2016).

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, a mesma do vírus da febre amarela. Os sinais e sintomas da dengue clássica são caracterizados por febre alta de início súbito, variando entre 39° a 40°C, associada a dores de cabeça, fraqueza, falta de apetite, dores musculares, náuseas, dor nos olhos e manchas vermelhas na pele. O indivíduo também pode apresentar diarreia (Ministério da Saúde, 2010). Já a dengue hemorrágica pode acontecer após uma reinfecção do vírus, originando sintomas mais graves quando comparada à dengue clássica. Normalmente a dengue hemorrágica surge com um aumento repentino da temperatura corporal e outros sintomas semelhantes aos da dengue clássica. A temperatura conserva-se alta por 2 a 7 dias. No entanto, alguns indivíduos contaminados apresentam graus modificados de sangramento cutâneo e das mucosas (BANSAL; KISSON; SINGHI, 2007). A dengue é considerada uma arbovirose de grande distribuição no mundo (Figura 1). No Brasil é a que apresenta maior prevalência com 219.040 casos reportados em 2017 quando comparado com 171.930 casos de febre de chikungunya e 15.586 casos de febre pelo vírus Zika (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 1 - Distribuição da dengue no mundo nos últimos dez anos.

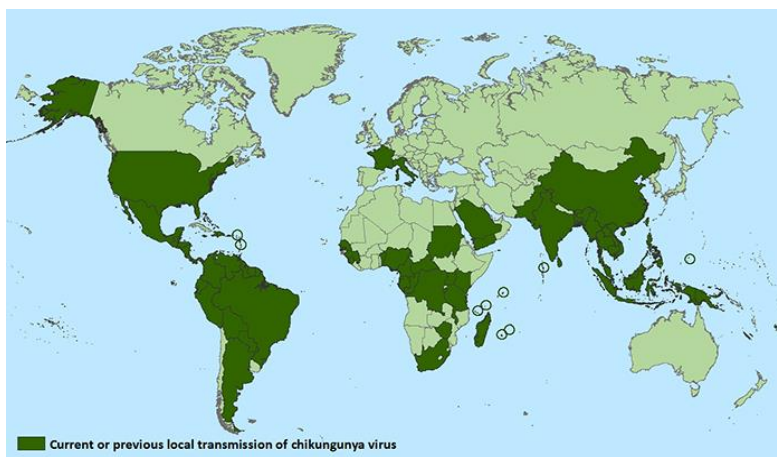


Fonte: Disease Control and Prevention (CDC) – USA, 2016.

A febre chikungunya é outra doença transmitida pelo vetor *A. aegypti*, em que há a presença do vírus chikungunya pertencente ao gênero *Alphavirus* e à família *togaviridae*. Na África este vírus mantém um ciclo de vida silvestre em meio a pequenos mamíferos, como os macacos e morcegos, no entanto a adaptação genética do vírus em outras regiões como

na Ásia e Europa (Figura 2) difundiu o seu ciclo urbano de forma que ele circule entre humanos e mosquitos ocasionando constantes epidemias (TAUIL, 2014). No Brasil, os primeiros casos foram registrados nos municípios de Oiapoque (Amapá) e Feira de Santana (Bahia), em 2014, porém o surto epidemiológico ocorreu em 2016, com 277.882 possíveis casos de febre chikungunya e 204 óbitos confirmados. O quadro clínico dos pacientes infectados pelo vírus chikungunya inclui febre, erupção cutânea, mialgia, artralgia e dor de cabeça (NUNES et al., 2015).

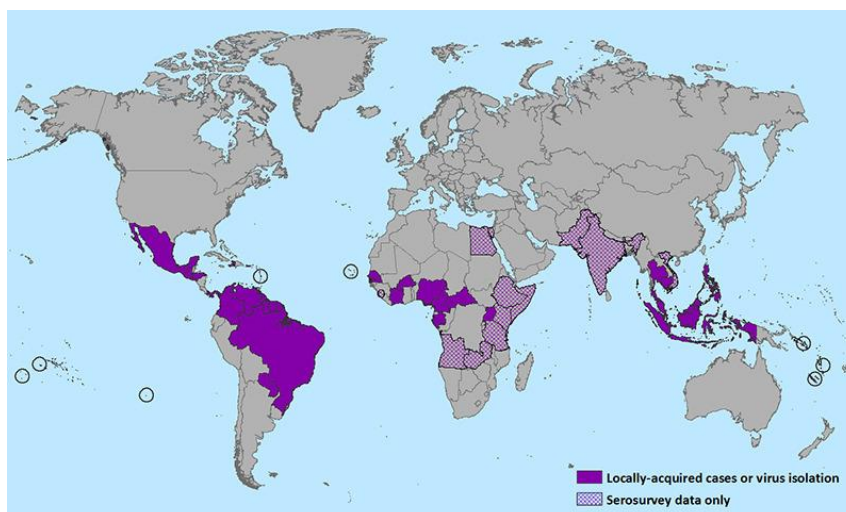
Figura 2 - Distribuição mundial de casos de Chikungunya nos últimos dez anos.



Fonte: Disease Control and Prevention (CDC) – USA, 2016.

A doença oriunda do vírus zika, que é filogeneticamente ligado ao vírus dengue, também conhecida como vírus do Nilo Ocidental, também é responsável por epidemias no mundo (Figura 3). O vírus pertence à família Flavirividae e ao gênero Flavivirus. Foi descoberto em 1947 na floresta zika em Uganda, em um macaco rhesus que era utilizado para experimentos em estudos do vírus da febre amarela (PINTO JUNIOR et al., 2015). Recentemente no Brasil ocorreu um surtos da doença causada pelo vírus Zika e no decorrer desses surtos as autoridades sanitárias identificaram sequelas neurológicas em recém nascidos, a microcefalia (WHO, 2016).

Figura 3 - Distribuição mundial do vírus Zika nos últimos dez anos.



Fonte: Disease Control and Prevention (CDC) – USA, 2016.

Para que ocorra a transmissão destas arboviroses é necessário que o vetor (mosquito) esteja infectado por um vírus. O mosquito contrai o vírus ao se alimentar do sangue de um doente que se encontra na fase de viremia, fase essa em que se inicia um dia antes do aparecimento da febre e vai até o sexto dia da doença. A localização do vírus persiste nas glândulas salivares do mosquito, onde se prolifera e aí permanece, deixando o artrópode na sua forma infectante durante toda a sua vida. Uma vez infectada a fêmea do mosquito, esta inocula o vírus junto a sua saliva no momento da picada em uma pessoa sadia. É possível também que a fêmea realize a transmissão transovariana do vírus para a sua prole, favorecendo a expansão da doença (DIAS et al., 2010)

De acordo com o Ministério da Saúde, não existe transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com uma pessoa saudável, nem de fontes como água ou alimento.

1.2 *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)

Proveniente da África, o mosquito *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) se dispersou para todo o hemisfério ocidental no século XVII, para o Mediterrâneo no século XVIII, para a Ásia tropical no século XIX e para as Ilhas do Pacífico no final do século XIX e início do século XX (BARRETO; GUERRA; TEIXEIRA, 1999). O *A. aegypti* é um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica no período diurno e procura lugares que apresentam depósitos artificiais de água parada (TAUIL, 2002). O seu habitat ocorre em condições de higiene, visto que os ambientes mais limpos possibilitam melhor desenvolvimento da larva, embora esteja se adaptando a outros tipos de criadouros

(BESERRA et al., 2009). Diferentemente dos outros mosquitos, o *A. aegypti* tem uma alimentação diurna, em que sua maior necessidade alimentar é no horário da manhã e início de noite. Outra peculiaridade é o fato da fêmea poder picar vários indivíduos em somente um período de alimentação (WHO, 2017).

Desenvolve-se por metamorfose completa, ou seja, o seu ciclo de vida é composto por quatro fases: ovo, larva (1º a 4º instar), pupa e indivíduo adulto. A temperatura influencia o seu ciclo de vida, bem como a disponibilidade de alimentos e a quantidade de larvas existentes no mesmo criadouro, uma vez que a competição das larvas por alimento (em um mesmo criadouro com pouca água) consiste em um obstáculo ao amadurecimento do inseto para a fase adulta (IOC/FIOCRUZ).

1.2.1 OVOS de *Aedes aegypti*

O mosquito fêmea do *A. aegypti* caracteriza-se por depositar os seus ovos nas “paredes” de pequenos artefatos que acumulam água limpa, pouco acima da superfície líquida. Seus ovos podem sobreviver até 450 dias fora da água (TAUIL, 2002). Esse comportamento de depósito de ovos nas paredes dos criadouros artificiais pode ser visto como um grande passo em direção ao seu comportamento sinantrópico. Após o crescimento do embrião, que dura aproximadamente dois a três dias, os ovos tornam-se resistentes à dessecação. Isso possibilita a permanência dos ovos secos e contaminados por muito tempo, pois esses ovos continuam viáveis por período próximo de um ano. Desse modo, sempre que esses recipientes de armazenamento contendo os ovos ressecados em suas “paredes” recebem nova carga de água, os ovos serão estimulados a eclodir e com isso o recipiente tornar-se-á um criadouro (NATAL, 2002).

Figura 4 - Ovos do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE).



Fonte: VIEIRA/IOC.

1.2.2. LARVAS de *Aedes aegypti*

A coloração da larva (figura 5) em seu primeiro instar é levemente amarelada, porém no final do quarto instar adquire uma coloração mais forte. Esta é composta de cabeça, tórax e abdome (dividido em nove segmentos), sua locomoção é possível por meio de suas cerdas que compõem o seu corpo em um número de aproximadamente 222 pares. Na cabeça encontram-se escovas orais ou palatais que levam para a boca partículas a serem deglutidas. Na parte externa têm-se a genitália masculina/feminina, as papilas anais e o sifão respiratório de grande importância taxonômica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

O tubo digestório é dividido em estomodeo (intestino anterior), mesêntero (intestino médio) e proctodeo (intestino posterior), e tem como função realizar e controlar movimentos peristálticos. A fase larval é aquática. Alimentam-se de algas e partículas orgânicas dispersas, não toleram águas poluídas, perturbação sonora e luz intensa (ABED et al., 2007).

Em condições ambientais favoráveis, após a eclosão do ovo, tem-se a larva. As larvas mudam de tamanho quatro vezes, L1, L2, L3 e L4. O tempo necessário para a mudança de estágio de L1 para L4 pode levar até 10 dias.

Por isso, a eliminação de criadouros deve ser realizada pelo menos uma vez por semana: assim, o ciclo de vida do mosquito será interrompido (IOC/FIOCRUZ).

Figura 5 - Larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 em L3.

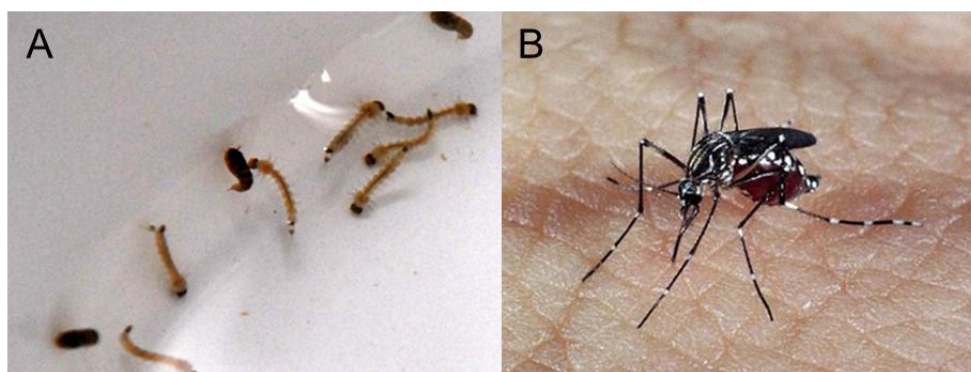


Fonte: GENILTON VIEIRA/IOC.

1.2.3 A PUPA de *Aedes aegypti*

Da fase L4 onde a larva possui aparelho bucal mastigador e não desprovida de apêndices locomotores, as larvas sofrem muda para pupa (Figura 6A) período em que não se alimentam. Após essa fase, elas se transformam em adultos (figura 6B), onde se alimentam por punção, possuem asas, pernas e genitálias interna e externa completamente formadas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Figura 6 - Larvas (amarelas) e pupas (marrons) (A) e adulto (B) de *A. aegypti*



FONTE: GENILTON VIEIRA/IOC

O acasalamento de *A. aegypti* se dá dentro ou ao redor das habitações, geralmente nos primeiros dias depois que o mosquito chega à fase adulta. É preciso somente uma cópula para a reprodução ser concretizada, pois a fêmea guarda o esperma na espermateca. Após a cópula, as fêmeas precisam realizar a hematofagia (alimentação com sangue), importante para o desenvolvimento completo dos ovos e sua maturação nos ovários. Normalmente, as fêmeas de *A. aegypti* encontram-se aptas para a postura de ovos três dias após a ingestão de sangue, passando então a procurar para desovar geralmente em pequenas coleções de água limpa e parada, localizadas nas proximidades das moradias (IOC/CRUZ).

1.3 INSETICIDAS SINTÉTICOS

Os inseticidas de origem sintética surgiram na tentativa de aprimorar o manejo agrícola e eliminar as pragas encontradas nesse meio. O Brasil está entre os países que mais utilizam esses produtos, pelo fato de possuir um setor agrícola forte e possuir uma ampla variedade biológica, o que facilita o surgimento de pragas e doenças (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003). Entre os mecanismos de ação pelos quais os inseticidas sintéticos atuam, pode-se incluir a inibição de enzimas específicas, como: a colinesterase e a enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase, bem como a inibição de proteínas, como as tubulinas e o bloqueio de receptores do sistema nervoso central, como o ácido gama aminobutírico (COUTINHO et al., 2005). Em meio às diversas formas empregadas para controle de insetos, o controle químico ainda é o mais utilizado. Este controle é realizado por meio do

uso de substâncias tóxicas (ingredientes ativos), mais conhecidos como inseticidas ou pesticidas.

No entanto estes compostos podem induzir a resistência dos insetos, como já foi observado em estudos realizados por Brown, em 1986, com diclorodifeniltricloroetano (DDT) frente às espécies *Aedes tritaeniorhynchus* e *Aedes sollicitans*. O DDT, um organoclorado de efeito duradouro, foi o primeiro inseticida de origem sintética, formulado no decorrer da Segunda Guerra Mundial, que, destacou-se pelo fato de quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (BRAGA; VALLE, 2007). Sabe-se que ele age no canal de sódio, possivelmente mantendo-o aberto e inibindo o equilíbrio de íons sódio e potássio dos axônios, promovendo, assim, o impedimento da transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e mamíferos. O DDT passou a ser o inseticida sintético mais utilizado e pesquisado no século XX, no entanto o seu uso indiscriminado tornou-se um problema de saúde pública, pois esse composto tem causado impacto negativo no meio ambiente, no meio abiótico, nos alimentos, ecossistemas aquáticos, marinhos e de água doce (D'AMATO et al., 2002; TURUSOV et al., 2002).

Uma característica importante do DDT é a sua atividade estrogênica em humanos, fato que possibilita efeitos indesejáveis na saúde de um organismo, em especial no período de desenvolvimento de uma criança (puberdade). Um dos fatores que contribui para esse fenômeno é a fácil acumulação desse composto no solo, pois muitos alimentos acabam sendo contaminados e conseqüentemente acarretam a puberdade precoce, ginecomastia, telarca e malformações reprodutivas (ALVES et al., 2007).

Atualmente, o combate de insetos pelo controle químico na saúde pública é realizado com organofosforados e piretróides. No entanto são altamente tóxicos, visto que inibem de forma irreversível a enzima colinesterase. Entre os principais efeitos recentemente observados em exposições ocupacionais a esses compostos estão: o comprometimento da memória, dificuldade das habilidades motoras, mudanças físicas no cérebro e a diminuição do desenvolvimento cognitivo (MUÑOZ-QUEZADA et al., 2016). Esses compostos são identificados como causas de milhões de intoxicações anuais. O fato desses compostos serem altamente voláteis e lipofílicos pode justificar a sua rápida penetração pelas vias inalatórias e dérmicas, uma vez que a lipofilicidade conduz a uma boa absorção e permite inclusive que esse agente tóxico atravesse a barreira hematoencefálica (BHE) (LIMA et al., 2016).

Os pesticidas podem ser classificados em distintas classes, dentre as quais se podem citar herbicidas, algicidas, fungicidas, acaricidas, larvicidas e inseticidas (DACOSTA

et al., 2007). Desse modo, para o controle dos mosquitos, não só inseticidas (adulticidas químicos), mas larvicidas (matam as larvas) biológicos também podem ser aplicados por termonebulizadores, tal mecanismo que infelizmente ainda não é muito desenvolvido no Brasil (ANDRADE, 2001).

Diante deste empecilho, é possível analisar que a resistência ocasionada pela adaptação do organismo alvo às concentrações comumente utilizadas, resulta no aumento da frequência de aplicação de dosagens crescentes de inseticidas, promovendo doenças e danos ambientais, como consequência da falta de controle dos vetores. De acordo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o alto custo relacionado à resistência de insetos a inseticidas pode alcançar anualmente US\$ 1,4 bilhão nos Estados Unidos (CONCEIÇÃO et al., 2004).

No lugar de produtos químicos, o controle biológico é uma alternativa, visto que é um importante componente no manejo racional de pragas e pode ter a inclusão dos mesmos no ambiente, onde as espécies-alvo se encontram. Essa forma de controle oferece grandes vantagens quando comparada ao controle com produtos químicos, como a especificidade contra organismos-alvo e o baixo custo no seu emprego. Todavia, proporciona algumas desvantagens, pois podem ter ação mais vagarosa e demanda o emprego de maior tecnologia para sua pesquisa (MAIA; DIREITO; FIGUEIRÓ, 2014).

Devido aos problemas provocados pelo uso indiscriminado de inseticidas sintéticos, medidas de controle alternativas, tais como as pesquisas de produtos de origem vegetal, surgem com a expectativa de se identificar substâncias com propriedades inseticidas, inclusive larvicidas para serem utilizadas em formulações de um possível produto comercial (FURTADO et al., 2005).

1.4 INSETICIDAS DE ORIGEM VEGETAL

As plantas possuem suas próprias formas de se defenderem quando atacadas por outras plantas, insetos fitófagos e herbívoros predadores. Essas defesas são de origem química e, normalmente, envolvem substâncias do metabolismo secundário e podem ser estudada no controle biológico de insetos e pragas agrícolas (BOLZANI et al., 2002).

De acordo com a literatura, no decorrer do século XIX até a década de 1940, o uso de inseticidas de origem natural era muito empregado no cultivo agrícola (HOLLINGWORTH, 1976).

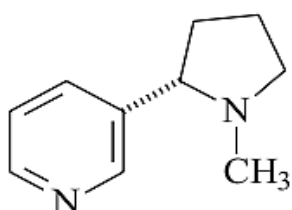
De folhas de plantas como *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana rustica* (Solanaceae) foi extraída a nicotina (a), um alcalóide de origem natural com propriedades inseticidas muito utilizado principalmente na forma de lavagem de fumo desde o século XIX até primeira metade do século XX. A entrada no mercado dos inseticidas sintéticos associado ao alto custo de produção e extrema toxicidade a mamíferos levou a queda da comercialização deste inseticida (MOURA; SCHLICHTING, 2007).

Das flores de espécies pertencentes ao gênero *Chrysanthemum* (Compositae), encontra-se as piretrinas e azadiractina (Meliaceae). O seu uso como inseticida foi reconhecido a partir da década de 70, devido à sua ação sob vários insetos e baixo impacto causado sob os mamíferos (SANTOS et al., 2007). A baixa viabilidade econômica e a dificuldade de produção em grande escala foram fatores que contribuíram para o desuso de piretrinas (b) como inseticida no decorrer dos últimos anos, visto que a disponibilidade de produtos mais facilmente acessíveis pareceu mais atraente (HITMI et al., 2000).

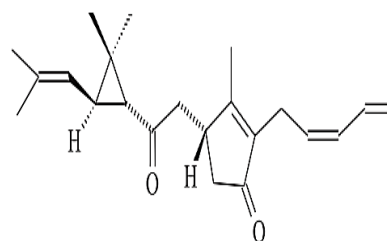
Das principais plantas que já apresentaram atividade inseticida pode-se citar as espécies pertencentes aos gêneros *Derris* originário da Malásia e Indonésia: *Lonchocarpus*, *Mundela* e *Tephrosia* (Fabaceae), produtoras de rotenóides (c), causando a morte por comprometimento da respiração celular, e a azadiractina (d) que interfere no crescimento de larvas de lagarta (*Spodoptera frugiperda*) em milho. No entanto, o uso de inseticidas naturais perdeu espaço para a eficácia e durabilidade dos pesticidas de origem sintética (LOVATTO et al, 2004; CÔRREA; SALGADO, 2011).

Figura 7- Estrutura molecular de alguns inseticidas de origem vegetal.

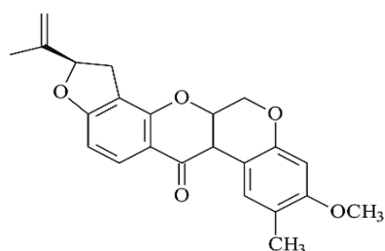
a) Nicotina



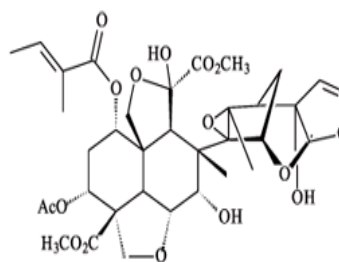
b) Piretrina



c) Rotenona



d) Azadiractina



Fonte: ALMEIDA et al., 2007; SANTOS et al., 2007

Em meio ao emprego de inseticidas de origem natural no século passado, ocorreu a introdução dos inseticidas de origem sintética, dentre estes é possível citar as principais classes de inseticidas neurotóxicos (carbamatos, organoclorados, organofosfatos e piretróides), uma vez que pequenas quantidades destes compostos induzem uma mortalidade significativa a uma variedade insetos em um curto período de tempo de exposição. No entanto, o impacto ao meio ambiente e à saúde humana que estes ocasionam sugerem a necessidade de retomar o uso de pesticidas naturais, pois estes produtos têm se apresentado nos últimos anos como uma alternativa promissora no controle de pragas, por serem mais rapidamente biodegradados e menos prejudiciais à população humana (MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016; MOYES et al, 2017).

O estudo de produtos obtidos de plantas com atividade larvica contra *A. aegypti* é recente sendo que a maior parte destes estudos emprega extratos brutos e óleos essenciais (GUSMÃO et al., 2002). Os extratos e óleos essenciais oriundos das plantas medicinais são tipicamente constituídos por um complexo de compostos químicos (especialmente de terpenos) que podem agir isoladamente, aditivamente ou concomitantemente para ter sua ação (SIMAS et al., 2004). A utilização do controle químico contra *A. aegypti* continua sendo empregada para o combate aos vetores, no entanto, a resistência adquirida pelo mosquito e as escassas opções de novos inseticidas, dificulta seu controle. Somado a isso, o mosquito *A. aegypti* se adapta rapidamente às condições de mudanças ambientais e apresenta rápida recuperação após as intervenções de controle (BRAGA; VALLE, 2007). Devido a esse conjunto de fatores, faz-se necessária a busca por novos agentes larvicidas (tabela 1).

Tabela 1: Ação larvica de extratos ou óleos de origem vegetal contra *A. aegypti*.

Espécie utilizada		Composto	Referência
Derris (<i>Lonchocarpus</i>) urucu (Leguminosae).	Extrato	Rotenona	GUSMÃO et al., 2002.
<i>Vanillosmopsis arbórea</i> .	Óleo essencial	Alfa-bisabolol	FURTADO et al., 2005.
<i>Syzigium aromaticum</i> .	Óleo essencial	Eugenol	COSTA et al., 2005.
<i>Baccharis reticularia</i> .	Óleo essencial	Limoneno	BOTAS et al., 2017.
<i>Coccinia grandis</i> .	Óleo essencial	n-tetracosano	MAHESHWARI et al., 2017.
<i>Mentha piperita</i> L. (Lamiaceae).	Óleo essencial	Monoterpeno linalool	RAMOS et al., 2017.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Óleo essencial	1,8-cineol	DUARTE et al., 2015.
<i>Pterodon emarginatus</i> .	Óleo essencial	β -cariofileno	OLIVEIRA et al., 2016

Atualmente, os produtos de origem vegetal destacam-se como uma oportunidade na indústria de inseticidas. A abordagem consiste em um mercado em busca de novas

moléculas para assegurar a concorrência na fabricação de produtos patenteados (GADELHA; VILLAS BOAS, 2007).

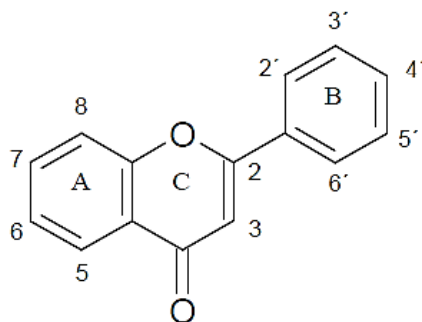
Por outro lado, como qualquer produto inovador, há suas desvantagens. Os produtos de origem vegetal podem apresentar ineficiência quanto ao controle de algumas espécies de mosquitos, dificuldade de produção em larga escala, bem como as diferenças apresentadas nas concentrações de moléculas ativas entre plantas (MACHADO et al., 2007). Além disso, muitas substâncias ativas são altamente lipofílicas dificultando a fabricação de um produto dispersível em água, seja para aplicação em criadouros de larvas de mosquitos como *A. aegypti*, seja para nebulização em mosquitos adultos ou pragas agrícolas.

1.5 FLAVONOIDES: ASPECTOS GERAIS

O grupo dos flavonoides está presente em uma ampla classe de substâncias de origem natural. Podem ser encontrados em chás, legumes, mel, frutas, entre outros produtos de consumo comum no cotidiano. Apesar do termo “flavo” ser oriundo do latim *flavus* (amarelo), percebe-se que os flavonóis e flavonas são incolores (LOPES et al., 2000). Em particular, a estrutura dos flavonoides possuem características ideais para o sequestro de radicais livres, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas E e C (DAVID et al., 2006).

As principais classes de flavonoides são: flavonóis, flavonas, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, leucoantocianidinas, neoflavonóides, antocianidinas, proantocianidinas e isoflavonas (BRAVO, 1998). São produtos do metabolismo secundário das plantas e podem ser vistos como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavolignanas, porém comumente são encontrados como glicosídeos. Os flavonoides podem ser subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos analisados (BEHLIN et al., 2004). Esses compostos são de baixo peso molecular, visto que em geral os flavonoides contêm em sua estrutura 15 átomos de carbono, organizados na configuração $C_6-C_3-C_6^{22}$. Em sua estrutura química, os flavonoides possuem dois anéis aromáticos: anel A e B, ligados por três carbonos que constituem um anel heterocíclico, designado anel C (Figura 8) (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 8 - estrutura básica dos flavonoides.



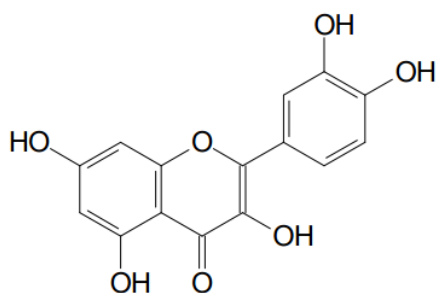
FONTE: BEHLING et al., 2004.

1.5.1 QUERCETINA

A quercetina (Figura 9A) é um flavonoide representante do grupo dos polifenóis e está presente em muitos alimentos, principalmente em sua forma de glicosídeo (Figura 9B), como: maçã, cebola, pimenta verde, brócolis e alguns chás e vinhos. A quercetina também é encontrada em medicamentos botânicos, incluindo *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* (erva de São João) e *Sambucus canadensis* (ancião) (MANACH et al., 2005). Apresenta-se como um pó amarelo-alaranjado, com peso molecular de 302,24 g/mol. Apresenta alta insolubilidade em água (cerca de 0,30-0,70 µg/mL) sendo mais solúvel em etanol (3,45-43,48 µg/mL) (BUDAVARI, 1996).

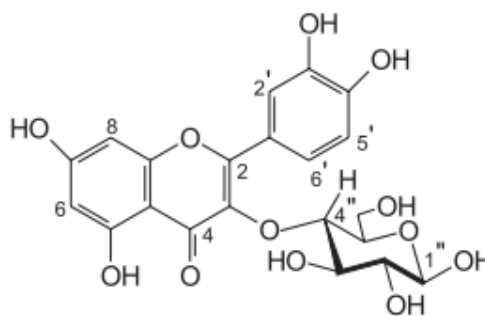
A quercetina sofre autooxidação em soluções orgânicas ou em meio aquoso. Além disso, este composto, assim como outros flavonóides, apresenta sensibilidade à luz.

Figura 9- Estrutura molecular da quercetina(A) e da quercetina-glicosídeo (B)



A -

FONTE: SANTOS et al., 1999.



B -

FONTE: MELOS et al., 2007.

Diversas são as atividades biológicas da quercetina, tais como, antitumoral, doenças neurodegenerativas, diabetes, disfunções cardiovasculares, doenças inflamatórias, entre outros (VESSAL et al., 2003; HOLMGREN et al., 2006; ZHANG et al., 2017). As propriedades biológicas da QUE são principalmente atribuídas a sua capacidade antioxidante, anti-radicais livres e modulação da expressão gênica. A atividade anti e pró-oxidante da quercetina foi avaliada em um estudo realizado por Choi et al, 2003 onde a administração crônica de quercetina em ratos causou inibição da peroxidação lipídica, assim como da atividade da glutathione redutase, indicando que este composto possui atividade antioxidante, mas igualmente efeitos pró-oxidantes.

Além dessas aplicações, a sua eficácia como inseticida também já foi reportada. Gazzoni et al, 1997 utilizaram solução etanólica de quercetina acrescida de 1% de alfacelulose em concentrações de 0,026% 0,125% 0,25% e 0,50% em experimentos com a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) apresentando redução do peso e/ou mortalidade de pupas.

Wang et al. (2015) utilizaram a QUE para o controle eficaz de larvas de *Spodoptera litura*, consideradas de difícil controle por se adaptar facilmente a uma grande variedade de plantas. Apesar de não ser esclarecido o real mecanismo de ação, uma possível explicação seria a doação de moléculas de hidrogênio e a inibição de esteróis provenientes do inseto. Em outro trabalho, a quercetina mostrou-se eficaz especialmente em concentrações de 625 e 3125 ppm na inibição do crescimento de ovos e larvas de *Bactrocera cucurbitae* (mosca da fruta do melão). O provável mecanismo citado foi a oxidação da quercetina na estrutura corpórea dos insetos, que pode ter levado à produção de oxigênio reativo, tal como peróxido de hidrogênio e radicais livres, obtendo como consequência a degradação da qualidade dos alimentos presentes no lúmen intestinal dos insetos, e então comprometendo o seu desenvolvimento (SHARMA; SOHAL, 2013). Contudo, não existem estudos sobre a ação larvicida da QUE em *A. aegypti*. A baixa solubilidade aquosa desta é um fator que limita

sua administração e/ou absorção por sistemas *in vivo*. Recentemente, o emprego da nanotecnologia tem demonstrado ser uma estratégia interessante para melhorar esse aspecto (QIAO et al., 2017; GAO et al., 2010).

1.6 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

O desenvolvimento de carreadores nanoestruturados contendo substância ativa tem sido alvo de diversas pesquisas na área farmacêutica, objetivando otimizar a liberação de fármacos no organismo, aumentar a solubilidade e muitas vezes reduzir a toxicidade (LOURO et al, 2013). A redução do tamanho de partículas pode resultar em propriedades inovadoras do material. Dentre os carreadores nanoestruturados, tem-se as nanosuspensões, que são sistemas apresentando diâmetro inferior a 1 µm e são constituídos pela substância ativa sólida dispersa em meio aquoso através de agentes estabilizantes (SATTAR et al., 2017). As substâncias ativas nanosuspensas apresentam alterações significativas em suas propriedades físico-químicas, tais como aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução, o que pode resultar em incremento da biodisponibilidade quando comparado à suspensão convencional (QIAO et al., 2017; GAO et al., 2010).

As nanosuspensões podem ser obtidas por diferentes métodos. Na tecnologia de bottom up, o composto é dissolvido num solvente orgânico e subsequentemente é precipitado por adição de um anti-solvente na presença de um estabilizador, como o método de emulsificação com remoção do solvente orgânico. Já a tecnologia de top down envolve a desintegração do material em nanoestruturas e envolve a entrada de alta energia (por exemplo, homogeneização de alta pressão) (PATEL; AGRAWAL, 2011).

A determinação das características físico-químicas de nanoestruturas, tal como as nanosuspensões, é de fundamental importância para melhorar a compreensão destes sistemas e para o estabelecimento de parâmetros de fabricação. Porém, necessita-se da utilização de várias técnicas a fim de caracterizar estes sistemas, tal como para a análise da morfologia das partículas, determinação da distribuição de tamanho e do potencial elétrico superficial (potencial zeta). Partículas consideradas estáveis não apresentam mudanças em suas características ao longo do tempo de estocagem. Quanto menor o tamanho da partícula, maior é sua estabilidade, assim como Valores de potencial zeta considerados superiores a $|\pm 25|$ mV (MANDZY et al, 2005; PATEL; AGRAWAL, 2011).

Nanosuspensões de quercetina tem sido reportadas na literatura. (LEFREVE et al., 2016) produziram diferentes nanosuspensões de quercetina, por meio da técnica de evaporação emulsificação, sendo que a nanosuspensão otimizada possuiu tamanho de partícula ao redor de 130 nm (GAO et al., 2010) produziram nanosuspensão de quercetina de tamanho ao redor de 400 nm, utilizando nanoprecipitação e homogeneização por alta pressão.

Além disso, diferentes atividades biológicas tem sido avaliadas na literatura após a encapsulação da quercetina em nanoestruturas, tal como o tratamento de isquemia cerebral quando encapsuladas em nanoemulsões (AHMAD et al., 2017) e a atividade leishmanicida quando encapsuladas em nanocápsulas (BATISTA et al., 2007), dentre outros. O aumento da biodisponibilidade e acúmulo no cérebro tem sido reportados para nanocápsulas e nanopartículas lipídicas sólidas contendo quercetina (DHAWAN et al., 2010). Porém, até o momento não existe na literatura nenhum dado sobre avaliação larvica de nanoestruturas de quercetina, especialmente em *A. aegypti*.

Apesar disso, nanoestruturas contendo outras substâncias de origem vegetal tem apresentado atividade contra larvas de *A. aegypti*. Experimentos realizados com uma nanoemulsão do óleo essencial das folhas de *Vitex negundo* L. frente as larvas em segundo instar demonstrou atividade larvica nas concentrações 25, 50, 100, 200 e 400 ppm após 24h de incubação. Em outros estudos com nanoemulsões obtidas do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e de *Pterodon emarginatus*, ambas possuindo tamanhos de gotículas inferiores a 200 nm, frente às larvas em quarto instar de *A. aegypti* apresentaram mortalidade superior a 75% na concentração de 250 ppm, após 48h de incubação (DUARTE et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; BALASUBRAMANI et al., 2017).

Assim, verifica-se que os produtos de origem vegetal têm sido uma alternativa promissora no controle de vetores e consequentemente na prevenção de doenças. Atualmente, é perceptível o aumento de interesse no desenvolvimento de produtos de nanodimensionados com a finalidade de controlar vetores. Essa inovação de produtos surge como uma alternativa que garante um diferencial quanto à eficácia de aplicação em diferentes fases do desenvolvimento de insetos, assim como as nanosuspensões de quercetina. Desse modo, ao associar produtos naturais junto à nanotecnologia é possível obter um campo muito promissor para o controle de pragas e insetos (HUANG et al., 2014; SANTOS-MAGALHÃES et al, 2007).

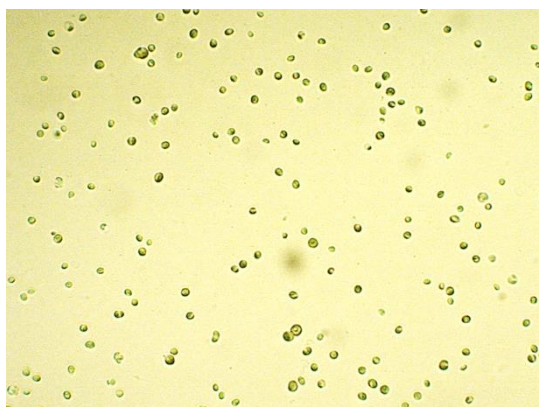
1.7 ECOTOXICIDADE DE NANOESTRUTURAS

A nanotecnologia é um dos ramos da ciência que mais se desenvolve atualmente, devido aos investimentos em pesquisa impulsionando o mercado mundial. No entanto, observa-se que apesar das vantagens dessas nanoestruturas estudos de avaliação da toxicidade ainda são escassos e tem provocado ampla discussão sobre os riscos potenciais destes materiais à saúde humana e ao ambiente (BAPTISTA et al., 2015). Em relação aos testes, observa-se que grande parte utiliza organismos aquáticos uma vez que traduz o impacto das nanoestruturas no ambiente, já que a água é o principal compartimento receptor. Para estes testes, normalmente são utilizados peixes, crustáceos e algas (OBERDORSTER et al., 2006; PASCHOALINO et al., 2010).

O uso de algas em teste de toxicidade é de muita relevância, uma vez que o crescimento algáceo pode ser acompanhado por contagem de células viáveis (figura 10) em microscópio ótico (OLIVI et al., 2008). De acordo com as metodologias padronizadas dos principais testes toxicológicos realizados nacionalmente, há normas que regulamentam os testes de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae), como a norma da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB L5.020 e a norma da ABNT NBR 12648 (CEZAR et al., 1997).

Chlorella é um gênero de algas verdes unicelulares, pertencentes ao filo Chlorophyta que, por meio da fotossíntese, se multiplica facilmente, necessitando apenas de dióxido de carbono, água, luz solar e pequenas quantidades de minerais para reproduzir-se, além disso microalgas crescem mais rapidamente que plantas (WIDJAJA et al., 2009). Outra vantagem em relação à alga *Chlorella vulgaris* está relacionada ao seu baixo custo e fácil acesso, visto que ela produz o melhor cultivo terrestre de biomassa, fato que interessa muito à indústria e à tecnologia em suas diversas aplicações (SAFI et al., 2014).

Figura 10 - Células viáveis de *Chlorella vulgaris*



Alguns empecilhos podem ser identificados nos testes de ecotoxicidade em algas, como por exemplo: diferentes propriedades físico-químicas do composto ativo, solubilidade em água, concentração nominal do teste diferente da exposição real, estabilidade e adsorção quando em interações com outros organismos aquáticos (BIALK-BIELLINSKÁ et al., 2015).

Um estudo da toxicidade do pesticida paraquat frente à alga de água doce *Chlorella vulgaris*, sugeriu que após um período de 1 a 7 dias de exposição a taxa de crescimento da microalga diminuiu, ou seja, um nível elevado de toxicidade ao meio ambiente em concentrações superiores a 1 µg/L deste herbicida (NGUYEN-NGOC et al., 2009). É possível compreender tal relevância deste impacto ambiental causado, visto que de acordo com uma reavaliação toxicológica realizada pela ANVISA, a Resolução RDC nº 177, de 21 de setembro de 2017, publicada no Diário Oficial da União de 22 de setembro de 2017 dispõe que o uso deste composto será proibido no Brasil a partir de 22 de setembro de 2020.

A toxicidade da quercetina já foi estudada em algas como a hidra verde, *Hydra viridissima* Pallas, em concentrações de 0,12 g / L, 0,2 g / L, 0,25 g / L e 0,3 g / L no decorrer de três dias, obtendo mortalidade com a maior concentração de quercetina (0.30 g/L). Tais resultados podem ser consequência do metabolismo do oxigênio em tais organismos que a quercetina pode ocasionar (KOVACEVIC; MATULIC, 2013).

Apesar de não existirem na literatura dados de ecotoxicidade de nanosuspensões de quercetina, incubação de outro nanocarreadores contendo substâncias de origem vegetal tal como o óleo de *Pterodon emarginatus* encapsulados em nanoemulsão apresentaram-se tóxicos para *Chlorella vulgaris* em baixas concentrações (25mg/L) após 21 dias de incubação (OLIVEIRA et al., 2017). Porém, na literatura, a maioria dos estudos de toxicidade em algas referem-se às nanoestruturas metálicas (SIDDIQI; HUNSEN, 2016).

Desse modo, a análise da toxicidade ambiental em algas expostas a produtos nanoestruturados tem como uma das propostas estudar produtos menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de nanosuspensão de quercetina (NS-QUE) e avaliação da sua atividade biológica em *Aedes aegypti*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obtenção de NS-QUE e caracterização físico-química em relação a tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, após estocagem em duas temperaturas (4° e 25°C), por trinta dias;
- b) Avaliar a eficácia de NS-QUE e QUE frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* por 10 dias, bem como o efeito das formulações sobre a sua morfologia;
- c) Avaliar a toxicidade ambiental das formulações de NS-QUE e QUE frente às algas *Chlorella vulgaris*.

REFERÊNCIAS

- ABED A R; CAVASIN G. M; SILVA I. G; SILVA G.H. H; GERIS R; Alterações morfohistológicas em larvas de *aedes aegypti* (linnaeus, 1762) (diptera, culicidae) causadas pela atividade larvívora do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* ducke (leguminosae), **Revista de Patologia Tropical**, 2007.
- AHMAD N; AHMAD R; NAGVI A. A; ALAM M. A; ABDUR R. R; AHMAD F. J; Enhancement of Quercetin Oral Bioavailability by Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System and their Quantification Through Ultra High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Cerebral Ischemia. **Drug research**, 2017.
- ANDRADE, C. F; CAMPOS, J. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos, **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n. 232, 2001.
- ANGELO M; JORGE N; Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão, **Revista Instituto Adolfo Lutz** vol.66, 2007.
- ANJALI C H; KHAN S S; MARGULI-GOSHEN K; MAGDASSI S; MUKHERJEE A; CHANDRASEKARAN N; Formulation of water-dispersible nanopermethrin for larvicidal application, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2010.
- ALMEIDA M. M. B; ARRIAGA A. M. C; SANTOS A. K. L; LEMOS T. L. G; BRZ-FILHO R; VIEIRA I. J. C; Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década, **Quím. Nova** vol.30 no.4 São Paulo July/Aug. 2007.
- AL-SAIF A. S. B; ABDEL RAOUF N; EL-WAZANANI H. A; AREF I. A; Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia, **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2014.
- ALVES C; FLORES L. C; CERQUEIRA T. S; TORALLES M. B. P; Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças, **Caderno de Saúde Pública**, 23(5):1005-1014, 2007.
- BALASUBRAMANI S; DIANA R. K. B; RAJENDHIRAN T; MOOLA A. K; Development of nanoemulsion from Vitex negundo L. essential oil and their efficacy of antioxidant, antimicrobial and larvicidal activities (*Aedes aegypti* L.), **Environmental Science and Pollution Research**, 2017.
- BANSAL A; SINGHI S; KISSOON N; Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva, **Jornal de Pediatria**, 2007.
- BARBOSA F. R; SILVA C. S. B; CARVALHO G. K. L; Uso de inseticidas alternativos no controle de pragas agrícolas, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, ISSN 1808-9992, Documentos 191, 2006.

BATISTA C. M; CARVALHO C. M. B; MAGALHÃES N. S. S; Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2007.

BAPTISTA M. S; MILLER R. J; HALEWOOD E. R; HANNA S. L; ALMEIDA C. M. R; VASCONCELOS V. M; KELLER A. A; LENIHAN H. S; Impacts of Silver Nanoparticles on a Natural Estuarine Plankton Community, **Journal Environmental Science and Technology**, 49(21), 2015.

BEHLING E. B; SENDÃO M. C; FRANCESCATO H. D. C; ANTUNES L. M. G; BIANCHI M. L. P; Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas, **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BUDAVARI, S., The Merck Index, 12th Ed., Whitehouse Station, NJ, Merck & Co.,p. 1381, 1996.

BENAVENTE-GARCIA O; CASTILLO J; Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008.

BESERRA E. B; FREITAS E. M; SOUZA J. T; FERNANDES C. R. M; SANTOS K. D; Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características, **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, 2009.

BIALK-BIELINSKÁ A; WAGIL M; PUCKOWSKI A; WYCHODNIK K; MASZKOWSKA J; MULKIEWICZ E; KUMIRSKA J; STEPNOWSKI P; STOLTE S; Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms, **Environ Sci Pollut Res** 22:2566–2573, 2015

BOLZANI, V. S; EPIFANIO, B. A; LOPES, N. P; PINTO, A. C; SILVA, D. H. S. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas, **Revista Química Nova**, Vol. 25, São Paulo, 2002.

BOTAS G. S; CRUZ R. A. S; ALMEIDA F. B; DUARTE J. L; ARAÚJO R. S; SOUTO R. N. P; FERREIRA R; CARVALHO J. C. T; SANTOS M. G; ROCHA L; PEREIRA V. L. P; FERNANDES C. P; *Baccharis reticularia* DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control, **Molecules**, 2017.

BRAGA I. A; VALLE D; *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16 n.4 Brasília dez. 2007.

BRAVO L; Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, **Nutrition reviews**, 1998.

BROWN A. W; Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review, **Journal of the American Mosquito Control Association**, 1986.

BUDAVARI, S., The Merck Index, 12th Ed., Whitehouse Station, NJ, Merck & Co.,p. 1381, 1996.

CARVALHO S. S; VENDRAMIM J. D; GIL DE SÁ J. C; SILVA M. F. G. F; RIBEIRO L. P; FORIM M. R; Efeito inseticida sistêmico de nanoformulações à base de nim sobre *Bemisia*

tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 3, p.298-306, 2015.

CEZAR A; SILVA S. L. R; SANTOS A. R; TESTES DE TOXICIDADE AQUÁTICA, UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA NO CONTROLE DA POLUIÇÃO, 4ª Edição, 1997.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/zika/>>

CLOYD, R. Natural indeed: Are natural insecticide safer and better then conventional insecticide? **Illinois Pesticide Review**, 17: 1-3, 2004.

Codevilla C. F; Bazana M. T; Silva C. B; Barin J. S; Menezes C. R; Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura** v.37, Ed. Especial- Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, 2015, p. 142– 151.

CONCEIÇÃO, S. R; FILHO, A. M. O; KUSTER, R. M; LAGE, C. L. S; LIMA, E. C; SIMAS, N. K. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue–atividade larvica de myroxylon balsamum (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides, **Revista Química Nova**, Vol. 27, N. 1, 46-49, 2004.

CONSOLI R. A. G. B; OLIVEIRA R. L; Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil, **Editora FIOCRUZ**, 228 p., 1994.

COSTA J. G. M; RODRIGUES F. F. G; ANGÉLICO E. C; SILVA S. R; MOTA M. L; SANTOS N. K. A; CARDOSO A. L. H; LEMOS T. L. G; Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de Hyptis martiusii, Lippia sidoides e Syzigium aromaticum frente às larvas do Aedes aegypti, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2005.

CÔRREA J. C. R; SALGADO H. R. N; Insecticidal activities of plants and applications: a review, **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 2011.

COUTINHO C. F. B; TANIMOTO S. T; GALLI A; GARBELLINI G. S; TAKAYAMA M; AMARAL R. B. D; MAZO L. H; AVACA L. A; MACHADO S. A. S; Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e Toxidez, Pesticidas: **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

D'AMATO C; TORRES J. P. M; MALM O; DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental: uma revisão, **Química Nova**, 2002.

DAVID J M; DAVID J P; Barreiros a l b s; estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, **Química Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

DHAWAN S; KAPIL R; SINGH B; Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery, **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2011.

DIAS J. M. C. S; Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos, **Pesquisa agropecuária brasileira**, 1992.

DIAS L. B. A; ALMEIDA S. C. L; HAES T. M; MOTA L. M; RORIZ-FILHO J. S; Dengue: Dengue: transmissão ansmisão, aspectos aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento, **Simpósio: Condutas em enfermaria de clínica médica de hospital de média complexidade - Parte 1**, Ribeirão Preto, 2010.

DUARTE J. L; AMADO J. R. R; OLIVEIRA A. E. M. F. M; CRUZ R. A. S; FERREIRA A. M; SOUTO R. N. P; FALCÃO D. Q; CARVALHO J. C. T; FERNANDES C. P; Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of Rosmarinus officinalis essential oil, **Revista brasileira de farmacognosia** vol.25 no.2, 2015.

DURET C; WAUTHOZ N; SEBTI T; VANDERBIST F; AMIGHI K; New inhalation-optimized itraconazole nanoparticle-based dry powders for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis, **International Journal of Nanomedicine**, 2012.

FURTADO R. F; LIMA M. G. A; NETO M. A; BEZERRA J. N. S; SILVA M. G. V; Atividade Larvica de Óleos Essenciais Contra Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae), **Neotropical Entomology** 34(5):843-847, 2005.

GADELHA, C. A. G; VILLAS BÔAS, G. K. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional, **Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz**, Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, Vol. 23, N.6, 1463-1471, 2007.

GAO Y; QIAN S; ZHANG J; Physicochemical and pharmacokinetic characterization of a spray-dried cefpodoxime proxetil nanosuspension, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** (Tokyo), 2010.

GAZZONI D L; HULSMeyer A; HOFFMAN-CAMPO C B; Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de anticarsia gemmataljs 1, **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.32, n.7, p.673-681, 1997.

GUSMÃO D. S; PÁSCOA V; MATHIAS L; VIEIRA I. J. C; BRZ-FILHO R; LEMOS F. J. A; Derris (Lonchocarpus) urucu (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of Aedes aegypti (Diptera:Culicidae), **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** vol.97 no.3 Rio de Janeiro Apr. 2002.

HITMI A; COUDRET A; BARTHOMEUF C; The Production of Pyrethrins by Plant Cell and Tissue Cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* Species **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** Vol. 35, Iss. 5, 2000.

HOLLINGWORTH R. M; Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides, **Environmental Health Perspectives**, Vol. 14, 1976.

HOLMGREN A; LU J; PAPP L. V; FANG J; RODRIGUEZ-NIETO S; ZHIVOTOVSKY B; Inhibition of Mammalian Thioredoxin Reductase by Some Flavonoids: Implications for Myricetin and Quercetin Anticancer Activity, **Cancer Research**, 2006.

HUANG Q; OZCELIK B; KARADAG A; Quercetin Nanosuspensions Produced by High-Pressure Homogenization, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014

- JOHNSON K. P; MATTEUCCI M.E; BRETTMAN B. K; ROGERS T. L; ELDER E. J; WILLIAMS III R. O; Design of Potent Amorphous Drug Nanoparticles for Rapid Generation of Highly Supersaturated Media, **Molecular Pharmaceutics**, 2007.
- KANADASWAMI C; LEE L; LEE P. H; HWANG J; KE F; HUANG Y; LEE M; The Antitumor Activities of Flavonoids, **in vivo** 19: 895-910 (2005).
- KAMESHWARARAN S; SURESH V; ARUNACHALAM G; KANTHLAL S. K; MOHANRAJ M; In vitro and in vivo anticancer activity of methanolic flower extract of Tecoma stans flower, **International Research Journal of Pharmacy**, 2012.
- KOVACEVIC G; MATULIC A; Effects of Quercetin on the Green Hydra (Hydra viridissima Pallas, 1766), **International Journal of Biology**, Vol. 5, No. 3; 2013.
- LI LV; LIU C; LI Z; SONG F; LI G; HUANG X; Pharmacokinetics of Quercetin-Loaded Methoxy Poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactic acid) Micelle after Oral Administration in Rats, **BioMed Research International**, 2017.
- LEFREVE L; FERREIRA A. M; VILHENA J. C; FLORENTINO A. C; CRUZ R. A; BEREAU D; ROBINSON J. C; AMADO J. R; CARVALHO J. C; FERNANDES C. P; Development of Quercetin Based Nanodispersions, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2016.
- LOPES R. M; OLIVEIRA T. T; NAGEM T. J; PINTO A. S; Flavonoides, **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2000.
- QIAO H; CHEN L; RUI T; WANG J; CHEN T; FU T; DI L; LI J; Fabrication and in vitro/in vivo evaluation of amorphous andrographolide nanosuspensions stabilized by d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate/sodium lauryl sulfate, **Journal of Nanomedicine**, 2017.
- LIMA A. L. S; LIMA J. A; AGUIAR A. P; CAVALCANTI L. P. A. N; Intoxicação por Organofosforados: Tratamento e Metodologias Analíticas Empregadas na Avaliação da Reativação e Inibição da Acetilcolinesterase, **Revista Virtual Química**, Vol 8, 2016.
- LOURO H; BORGES T; SILVA M. J; Nanomateriais manufaturados: novos desafios para a saúde pública, **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, 2013.
- LOVATTO P. B; GOETZE M; THOME G. C. H; Efeito de extratos de plantas silvestres da família Solanaceae sobre o controle de Brevicoryne brassicae em couve (Brassica oleracea var. acephala)1, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.971-978, jul-ago, 2004.
- MACHADO, L. A; SILVA, V. B; OLIVEIRA, M. M; Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura, **Centro Experimental do Instituto Biológico**, palestra, São Paulo, Vol. 69, N.2, 103-106, 2007.

- MAHESHWARI V. L; MOHAMMED S. I; VISHWAKARMA K. S; Evaluation of Larvicidal Activity of Essential Oil from Leaves of *Coccinia grandis* against Three Mosquito Species, **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, 2017.
- MAIA, A.; DIREITO, I. C. N., FIGUEIRÓ, R. Controle biológico de simuliídeos (Diptera: Simuliidae): panorama e perspectivas. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, nº 25, quadrimestral, p. 89-104, ago. 2014.
- MANDZY N; GRULKE E; DRUFFEL T; Breakage of TiO₂ agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions, **Powder Technology**, 2005.
- Ministério da Saúde: Brasília/DF, Doenças Infecciosas e Parasitárias: **Guia de Bolso. 8ª edição**. Pág. 131, 2010.
- MELOS J. L. R; HESS S. C; SILVA L. B; PERES M. T. L. P; MAPELI A. M; FACCENDA O; ANJOS H. H; TORRES T. G; TIVIROLI S. C; BATISTA A. L; ALMEIDA F. G. N; FLAUZINO N. S; TIBANA L. A; Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. ex. Willd (pteridaceae), **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 292-297, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Vigilância de A a Z [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde, Volume 48 N° 29 - 2017.
- MORAGAS W. M; SCHNEIDER M. O; Biocidas: Suas Propriedades E Seu Histórico No Brasil, Caminhos De Geografia - Revista On Line, 3(10)26-40, set/2003.
- MORAIS L. A. S; MARINHO-PRADO J. S; Plantas com atividade inseticida, EMBRAPA, CAP. 19, 2016.
- MOREIRA M. D; PICANÇO M. C; SILVA E. M; MORENO S. C; MARTINS J. C; Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas, Capítulo do livro: **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 89-120, 2006.
- MOREIRA M. F; MANSUR J. F; FIGUEIRA-MANSUR J; Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos, Tópicos Avançados em Entomologia Molecular - **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**, 2012.
- MOYES C. L; VONTAS J; MARTINS A. J; NG L. C; KOOU Y. S; DUSFOUR I; RAGHAVENDRA K; PINTO J; CORBEL V; DAVID J; WEENTMAN D; Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017.
- MOURA V. M; SCHILICHTING C. L. R; Alcalóides, Piretróides e Rotenóides: inseticidas naturais como uma alternativa ecológica sustentável Alkaloids, piretroids and rotenoids: natural insecticides as a sustainable ecologic alternative, **Revista UNINGÁ, Maringá – PR**, n.13, p.37-44, jul./set. 2007.
- MULLER RH; KECK CM; Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2006.

MUÑOZ-QUEZADA M, T; LUCERO B. A; IGLESIAS P. V; MUÑOZ M. P; CORNEJO C. A; ACHU E; BAURMET B; HANCHEY A; CONCHA C; BRITO A. M; VILLALOBOS M; Chronic exposure to organophosphate (OP) pesticides and neuropsychological functioning in farm workers: a review, **International Journal of Occupational and Environmental Health**, 2016.

NATAL D; Bioecologia do aedes aegypti, **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.205-207, jul./dez., 2002.

NGUYEN- NGOC H; DURRIEU C; TRAN-MINH C; Synchronous-scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2009.

NUNES M. R. T; FARIA N. R; VASCONCELOS J. M; GOLDING N; KRAEMER M. U; OLIVEIRA L; OLIVEIRA L. F; AZEVEDO R. S. S; SILVA D. E. A; SILVA E. V. P; SILVA S. P; CARVALHO V. L; COELHO G. E; CRUZ A. C. R; RODRIGUES S. G; VIANEZ JR. J. L. S. G; NUNES B. T. D; CARDOSO J. F; B TESH R; HAY S; G OYBUS O; VASCONCELOS P. F. C; Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil, **BMC Medicine**, 2015.

OBERDORSTER E; BLICKLEY M; ZHU S; MCCLELLAN-GREEN P; HAASCH M. L; Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms, **Carbon**, 2006.

OLIVEIRA A. E. M. F. M; DUARTE J. L; AMADO J. R. R; CRUZ R A. S; ROCHA C. F; SOUTO R. N. P; FERREIRA R. M. A; SANTOS K; CONCEIÇÃO E. C; OLIVEIRA L. A. R; KELECOM A; CARVALHO J. C. T; FERNANDES C. P; Development of a Larvicidal Nanoemulsion with Pterodon emarginatus Vogel Oil, **PLoS ONE**, 2016.

OLIVI P; COSTA C. R; BOTTA C. M. R; ESPINDOLA E. L. G; A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação, **Química Nova**, Vol. 31, No. 7, 1820-1830, 2008.

PASCHOALINO M. P; JARDIM W. F; MARCONE G. P. S; Os nanomateriais e a questão ambiental, **Quím. Nova**, vol.33, 2010.

PATEL V. R; AGRAWAL Y. K; Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs, **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology Research**, 2011.

PEREIRA M. M; MOUNTON L; YÉPREMIAN C; COUFÉ A; LO J; MARCONCINI J. M; LADEIRA L. O; RAPOSO N. RB; BRANDÃO H. M; BRAYNER R; Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cellulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*, **Journal of nanobiotechnology**, 2014.

PINTO JUNIOR V. L P; LUZ K; PARREIRA R; FERRINHO P. Vírus Zika: Revisão para Clínicos, **Acta Medica Portuguesa**, 2015.

PRANDINI J. M; MEZZARI M. P; SILVA M. L. B; AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* NO TRATAMENTO DE DEJETO SUÍNO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE, 7º jornada de iniciação científica, 2013.

- PRASAD R; BATTACHARYYA A; NGUYEN Q. D; Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives, **Frontiers in Microbiology**, 2017.
- PUPO, M. T; GALLO, M. B. C; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais, **Revista Química Nova**, São Paulo, Vol. 30, N. 6, 1446-1455, 2007.
- RAMOS R. S; ALMEIDA S. S; RODRIGUES A. B. L; 1 FARIAS A. L. F; SIMÕES R. C; 1 PINHEIRO M. T; 1 RICARDO MARCELO DOS ANJOS FERREIRA R. M. A BARBOSA L. M. C; SOUTO R. N. P; FERNANDES J. B; SANTOS L. S; Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae), **Scientific World Journal**, 2017.
- REPKA M. A; YE X; PATIL H; FENG X; TIWARI R. V; LU J; GRYCZKE A; KOLTER K; LANGLEY N; MAJUMDAR S; NEUPANE D; MISHRA S. R; Conjugation of Hot-Melt Extrusion with High-Pressure Homogenization: a Novel Method of Continuously Preparing Nanocrystal Solid Dispersions, **AAPS PharmSciTech**, Vol. 17, No. 1, 2016.
- SAFI C; ZEBIB B; MERAH O; PONTALIER P; VACA-GARCIA P; Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorellavulgaris*: **A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2014.
- SANTOS, K. F. R; OLIVEIRA T. T; NAGEM T. J; PINTO A. S; OLIVEIRA M. G. A; SOARES J. F; Efeitos das associações de morina-ácido nicotínico e quercetina-ácido nicotínico no controle de lipídeos, **Editoria da Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 1999.
- SANTOS M. A. T; AREAS M. A; REYES F. G. R; Piretróides – uma visão geral, *Alim. Nutr.* ISSN 0103-4235 , **Araraquara**, 2007.
- SANTOS-MAGALHÃES N. S; PIMENTEL L. F; JUNIOR A. T. J; MOSQUEIRA V. C. F; Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2007.
- DACOSTA, J. B. N ;SANTOS, V. M. R; CAIXEIRO, J. M. R; ; DONNICI, C. L; Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais, **Revista Química Nova**, Rio de Janeiro, Vol. 30, N.1,159-170, 2007.
- SATTAR A; CHEN D; JIANG L; PAN Y; TAO Y; HUANG L; LIU Z; XIE S; YUAN Z; Preparation, characterization and pharmacokinetics of cyadox nanosuspension, *Scientific Reports*, 2017.
- SHARMA R; SOHAL S K; Bioefficacy of quercetin against melon fruit fly, **Bulletin of Insectology**, 79-83, 2013.
- SIDDIQI K. S; HUSEN A; Fabrication of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Algae and their Toxic Effects, **Nanoscale Research Letters**, 2016.
- SIMAS N. K; LIMA E. C; CONCEIÇÃO S. R; KUSTER R. M; OLIVEIRA FILHO A. M; LAGE C. L. S; Natural products for dengue transmission control — larvicidal activity of

Myroxylon balsamum (red oil) and of terpenoids and phenylpropanoids, **Quím. Nova**, 2004.

TAUIL P. L; Critical aspects of dengue control in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, 2002.

TAUIL P. L; Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.23 n.4, 2014.

TURUSOV V; RATISKY V; TOMATIS L; Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks, **Environmental Health Perspectives**, 2002.

VALLE D; PIMENTA D. N; AGUIAR R; Zika, dengue and chikungunya: challenges and issues, *Epidemiol. Serv. Saude*, Brasília, 25(2):419-422, abr-jun 2016.

VESSAL M; HEMMATI M; VASEI M; Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 2003.

VIÉGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos, **Revista Química Nova**, Vol. 26, N. 3, São Paulo, 2003.

ZANETTI-RAMOS B. G; CRECZYNSKI-PASA T. B; O desenvolvimento da nanotecnologia: cen·rio mundial e nacional de investimentos, **Rev. Bras. Farm.**, 89(2): 95-101, 2008.

Zara A. L. S. A; Santos S. M; Fernandes-Oliveira E. S; Carvalho R. G; Coelho G. E; Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde** vol.25 no.2 Brasília Apr./June 2016.

ZHANG W; QIN M; CUI J; LIU D; LI W; CHEN W; Protective efficacy of inhaled quercetin for radiation pneumonitis, **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2017.

WANG R. L; STAEHELIN C; XIA Q. Q; SU Y. J; ZENG R. S; Identification and Characterization of CYP9A40 from the Tobacco Cutworm Moth (*Spodoptera litura*), a Cytochrome P450 Gene Induced by Plant Allelochemicals and Insecticides. **International Journal of Molecular Science**, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Guidelines For Laboratory And Field Testing Of Mosquito Larvicides, 2005. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf;jsessionid=F1196A944E00F78969F7D9118F630E81?sequence=1

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Dengue and severe dengue Fact sheet No 117, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Doença do vírus Zika, 2016.

WIDJAJA A; CHIEN C. C; JU Y. H; Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2009.

Artigo submetido para a Revista Brasileira de Farmacognosia

Nanosuspension of quercetin: preparation, characterization and effects against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae

Leticie Zulmira da Silva Pessoa^{1,3}, Jonatas Lobato Duarte², Ricardo Marcelo dos Anjos Ferreira³, Anna Eliza Maciel de Faria Motta Oliveira², Rodrigo Alves Soares Cruz², Silvia Maria Mathes Faustino⁴, José Carlos Tavares Carvalho⁵, Caio Pinho Fernandes², Raimundo Nonato Picanço Souto³, Raquel Silva Araújo^{1,2}

¹ Laboratório de Farmacotécnica Curso de Farmácia – Universidade Federal do Amapá – Campus Universitário Marco Zero do Equador – Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira – KM – 02 Bairro Zerão – CEP: 68902-280 – Macapá – AP – Brazil;

² Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica - Curso de Farmácia – Universidade Federal do Amapá – Campus Universitário Marco Zero do Equador – Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira – KM – 02 Bairro Zerão – CEP: 68902-280 – Macapá – AP – Brazil;

³ Laboratório de Artrópodes - Universidade Federal do Amapá - Curso de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Amapá – Campus Universitário Marco Zero do Equador – Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira – KM – 02 Bairro Zerão – CEP: 68902-280 – Macapá – AP – Brazil;

⁴ Laboratório de Cultivo de Algas, Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira, KM-02 Bairro Zerão, Macapá, AP CEP 68902-280, Brazil;

⁵ Laboratório de Pesquisa em Fármacos – Curso de Farmácia – Universidade Federal do Amapá – Campus Universitário Marco Zero do Equador – Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira – KM – 02 Bairro Zerão – CEP: 68902-280 – Macapá – AP – Brazil;

Abstract

Background: *Aedes Aegypti* is the main vector of neglected diseases such as dengue. Thus, it is very important to develop formulations that increase effectiveness with low toxicity. Quercetin (QUE) is a plant-derived flavonoid known to modulate the development of some insects. The low water solubility characteristics of QUE impairs the development of commercial products dispersible in aqueous media. To circumvent this problem, the preparation of nanoformulations is considered promising once they modify drug dispersability profile. Thus, this study aimed to evaluate the effect of bulk and nanosuspension of quercetin (NS-QUE) in *Aedes aegypti* larvae and, also investigate the ecotoxicity in a non-target organism.

Methods: NS-QUE was produced by solvent displacement followed by solvent evaporation and were maintained in two different temperatures, at 4 and 25°C for 30 days. The size distribution and zeta potential of the NS-QUE were monitored along the time. In the present study the influence of NS-QUE and bulk QUE was investigated against *Aedes aegypti* by treating larvae with different concentrations of NS-QUE and its bulk form. At pre-established time, larvae were removed and morphological alteration was evaluated.

Results: The NS-QUE presented higher stability when kept at 4°C. All the nanoformulations presented negative zeta potential values. NS-QUE and its bulk form adversely affected larvae development at all concentrations tested, especially at the highest concentrations. Larvae mortality was between 44 and 100% for NS-QUE at 100 and 500 ppm, respectively, after 48h. For bulk QUE, mortality was around 50% regardless the concentration used at this same time-period. Inhibitory effects such the absence of emerging mosquitos from water were observed on survival larvae of the treated groups. The findings revealed a toxic effect of NS-QUE on *A. aegypti* while no toxic effects could be seen on green algae *Chlorella vulgaris*.

Conclusion: These data indicate that NS-QUE might represent a potential utilization as a larvicide to control *Aedes aegypti*, once they induced larvae death and inhibited the survival ones to emerge from water. In addition, it did not demonstrated ecotoxicity contributing to the use of natural products as promising nanoproducts, due to better properties than the bulk QUE.

Keywords: *Aedes aegypti*, ecotoxicity, larvicidal, nanocarrier, flavonoid

1. Introduction

The *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) mosquito is responsible for transmission of arboviruses neglected diseases such as dengue, chikungunya and Zika, which are common in tropical and subtropical countries. The mosquito is adapted to the urban environment and preferably uses containers with clean water for the development of its larval phase (Lindsay et al., 2017). Dengue is among the most important viral diseases transmitted by arthropods with 2.3 million cases in the world, where Brazil alone exhibited the number of less than 1.5 million cases, approximately 3 times higher than in 2014 (Lindsay et al., 2017). In the last decades the incidence of this disease has increased, reaching new countries and are now under the concern of Center of Diseases Control and Prevention (CDC) of USA, and by Brazilian Government (Patterson et al., 2016; Petersen et al., 2016). More recently, the less studied Chikungunya and Zika infections have gained attention due to an increase in their incidence and the association of Zika infection with cases of microcephaly from 2014 to 2015 in northeast Brazil (1761 cases until December 2015) (Carneiro & Travassos, 2016). These three infections have similar symptoms that complicates the diagnosis including fever, headache, nausea and joint pain. In some cases, dengue infection develops into dengue hemorrhagic fever characterized by bleeding and decreases in platelet numbers in the blood that can lead to death (Patterson et al., 2016).

The expansion of these diseases is related to the increase in the incidence of their vectors and the unavailability of the vaccines. Their treatment is preventive with the control being focused especially in reducing the population density of the vector with synthetic insecticides, such as pyrethroids, in water where the larvae develops or spraying in the air where are the mosquitoes (Smith et al., 2016; Guzman et al., 2010; Ministry of Health, 2014a). The insecticides acting on larvae stage have received attention since they prevent the emergence of the adult form limiting them to their breeding sites (Farnesi & Valle, 2013). However, mosquito and larvae resistance to pyrethroids (Smith 2016) and environment

toxicity (Antwi & Reddy, 2015; Bradberry et al., 2005) are limiting their use. To circumvent this fact, research has focused on natural product alternatives as insecticides (biopesticides) in the late years, since they are biodegradable and potentially present very low or absence of toxic effects on non-target populations, when compared to synthetic insecticides (Oliveira et al, 2017). Biopesticides can lead to death due to their ability to act by different mechanism, acting on GABA, mitochondrial, or inhibiting acetylcholinesterase (Rattan et al., 2010), as well interfering with the growth and reproduction of the pest (Copping & Menn, 2000).

The co-evolution between plants and their natural enemies, have produced a great variety of herbal defensive secondary metabolites. In fact, plant extracts, essential oils and isolated compounds, such as terpenoids (Botas et al, 2017), alkaloids (Kim & Ahn, 2017) and flavonoids (Perumalsamy et al, 2015) have been described as larvicidal and mosquito repellents. Flavonoids are polyphenolic compounds which are related to the plant defense against UV radiation, fungi, bacteria and insects (Treutter, 2005).

Quercetin (QUE) is a naturally occurring flavonol abundantly present in food and medicinal plants (Garzón et al, 2017; Petersen et al, 2016). Several studies pointed out the beneficial biological activities of quercetin, which includes antioxidant, antiinflammatory, antitumor properties (Naderi et al., 2003; Mamani-Matsuda et al., 2006). It also can have larvicidal properties against bollworm, *Helicoverpa armigera* and melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Li et al 2014; Sharma & Sohal 2013). However, most natural compounds, including non-glycosilated flavonoids, such as quercetin, present low solubility in water avoiding the development of water-soluble products.

A strategy to allow the dispersion of this product in water can be the use of nanotechnology-based formulations, as nanosuspensions (NS). They are defined as active solid substances dispersed nanometrically in aqueous media using surfactants as stabilizers (Lefreve et al, 2016) and can be produced by different methods. In the bottom up technology,

the compound is dissolved in an organic solvent, and it is subsequently precipitated on addition of an anti-solvent in the presence of a stabilizer, as the emulsification method, with further removal of the organic solvent. The top down technology involves the disintegration of the bulk material into nanostructures and involve high-energy input (ex. high-pressure homogenization) (Patel & Agrawal, 2011). Recent studies in the literature shows high insecticidal efficacy of aqueous nanodispersions containing herbal bioactive compounds against mosquito larvae produced by a bottom-up method (Botas et al., 2017).

The employment of NS-QUE constitutes an alternative via to the synthetic insecticides for the mosquito's control that can causes diseases. However, to the best of our knowledge, there are no data concerning the effects of nanosuspension of quercetin (NS-QUE) on *Aedes aegypti*, despite the insecticidal activity of this compound against another pest insects. Thus, we considered relevant to investigate the effects regarding to bulk-QUE and NS-QUE on *Aedes aegypti* and evaluate their environmental toxicity in a non-target organism, the green algae *Chlorella vulgaris*.

2. Materials and methods

2.1- Chemicals

Quercetin was obtained from Henrifarma (SP, Brazil). Surfactant polyethylene glycol 400 monooleate (Hydrophile-lipophile balance value = 11) was obtained from Praid (SP, Brazil). Ethanol was purchased from Vetec (RJ, Brasil). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Labsynth (SP, Brasil).

2.2- Preparation of NS-QUE

NS-QUE were prepared as described elsewhere (Lefreve et al 2016) with some modifications. The organic to aqueous phase ratio was 1:10. Briefly, the organic phase was constituted by an ethanolic solution of quercetin. The organic phase was added at a constant

flow rate with a syringe into pre-heated (55°C) aqueous phase containing 3% (w/v) of polyethylene glycol 400 monooleate (PM 400) under magnetic stirring for 10 min. Then, the organic solvent was evaporated under reduced pressure and the final volume was adjusted with water to a final quercetin content of 1 mg/ml.

2.3-Physico-chemical characterization

Quasi-elastic light scattering (Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments, UK) analysis of NS-QUE samples was performed at 90° to determine the mean hydrodynamic diameter and polydispersity index of the particle population in three different ND-QUE batches. The zeta potential (ζ) measurements were made using Laser Doppler Anemometry (LDA) (Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments, UK) after diluting the NS-QUE in deionized water (200-fold). The effect of storage temperature on NS-QUE size distribution and ζ was monitored at 4°C and 25°C for 30 days.

2.4- *Aedes aegypti* larvae bioassay assay

The tests were performed on the Laboratory of Arthropoda (Amapá Federal University, Brazil), in a room with standardized climatic parameters, kept at a 25±2°C temperature, relative humidity of 75± 5 % and a 12-hours photoperiod. Experimental evaluation was performed according to World Health Organization protocol (WHO 2005) with some modifications. NS-QUE or bulk QUE were serially diluted to final concentrations of 100, 175, 250, 375 and 500 ppm. Each experiment was conducted with (alongside) five replicates and a concurrent control group using 10 late third-early fourth instar *A. aegypti* larvae. The control group consisted of distilled water. Observations were made daily. Dead larvae were counted and removed after 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 and, 240 hours after exposure with NS-QUE, bulk QUE or water. Food was provided after 48h.

2.5- Morphological assay

After the incubation with the formulations, died *A. aegypti* larvae were fixed on ethanol 70% and dried in the air. The dried samples were observed using a low vacuum using a Tabletop Microscope TM3030Plus (Hitachi, Japan). The morphology of the *Aedes aegypti* mosquito larvae was also acquired by the optical microscope (Mod. BX41, Olympus) and photographed with a camera MDCE 5C.

2.6-Environment toxicology assay

The green algae *Chlorella vulgaris* was isolated from water samples obtained at Lagoa dos Índios, situated on the municipality of Macapá (latitude 0.031368 and longitude 51.102559) and preserved in the LACAL (UNIFAP, Amapá, Brazil). Serial dilutions were carried out in order to isolate the colony and cells were inoculated into nitrogen/phosphorus/potassium (NPK) media. Algae was incubated under cool white fluorescent light (12 h light: 12 h dark) at a temperature of 20°C and counted using a Neubauer chamber. This organism was used as a non-target model for environmental toxicology assay. *C. vulgaris* inoculum was cultivated in NPK aqueous solution with initial cell density of 1×10^5 cell/mL for all tested groups. Cells were treated with different concentrations (100, 250, 375 and 500 ppm) of QUE or NS-QUE. Control group was constituted by NPK aqueous solution. Cell count was obtained after 24, 48, 72, 96, 216, 240 hours of incubation. The percentage of viable cells (%VC) was calculated as follows: $\%VC = (D/D_0) \times 100$, where: D is cell density before formulation addition, D₀ is cell density after at each specific day, according Oliveira et al. (2017).

2.7-Statistics

Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism 6.0 Software (GraphPad, San Diego, California, USA). Quantitative data were expressed as 'mean $\pm$

standard deviation'. The means were compared using Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey multiple-comparisons. A difference was defined to be significant at a P value less than 0.05.

3. Results and discussion

3.1. NS-QUE physico-chemical characterization

Many plant-derived substances present low solubility in water, such quercetin, impairing their use in aqueous media. To circumvent this, NS have been developed once reducing particle size is a promising way to improve dispersability of poorly soluble substances (Gao et al., 2011; Sun et al., 2010). NS-QUE were produced here by solvent displacement followed by solvent evaporation, a simple, rapid and low energy method of obtaining nanodispersions (Lefreve et al., 2016). Particle size distribution and zeta potential of NS-QUE were monitored at 25°C and 4°C over 30 days of storage and are presented in Table 1.

Table 1. Physicochemical characterization of NS-QUE during storage at different temperatures

Day	Size ^a ± SD (nm) 25°C	Size ^a ± SD (nm) 4°C	PI ± SD TA	PI ± SD 4°C	Zeta potential ^b ± SD (mV) TA	Zeta potential ^b ± SD (mV) 4°C
0	124.0 ± 1.1	123.8 ± 3.8	0.328 ± 0.03	0.332 ± 0.05	-26.36 ± 0.61	-25.83 ± 0.45
1	95.98 ± 0.2*	120.0 ± 1.1*	0.644 ± 0.00*	0.274 ± 0.00	-27.06 ± 0.41*	-28.9 ± 0.46*
7	136.7 ± 1.8*	126.5 ± 5.5	0.477 ± 0.04*	0.421 ± 0.01*	-28.3 ± 0.87*	-28.16 ± 4.63
14	168.0 ± 1.6*	133.2 ± 9.3	0.478 ± 0.05*	0.433 ± 0.03	-35.2 ± 1.60*	-28.66 ± 7.57
21	229.1 ± 9.2*	128.3 ± 8.8	0.367 ± 0.08	0.427 ± 0.00	-36.4 ± 1.46*	-25.96 ± 1.25
30	347.2 ± 5.8*	122.1 ± 6.8	0.738 ± 0.02*	0.401 ± 0.03	-31.26 ± 0.15*	-23.6 ± 3.34

SD – standard deviation. ^aStandard deviation (n = 3) of the population that was reported by the instrument; ^bMeasurement after 1:200 dilution in water, * statistically significant compared to day 0 in the same group.

The particle size of the nanodispersions increased significantly after all time-points from 124.0 ± 1.1 nm to 347.2 ± 5.8 nm after 30 days of storage. These data are in accordance with the literature for other nanosuspensions of quercetin (Lefreve et al.,2016; Anarjan & Tan 2013). However, when NS-QUE was kept at 4°C the sizes remained around 123 nm for all time-points investigated, except at day 1. The above results indicate greater better storage stability of NS-QUE at 4°C than 25°C. The increased stability at 4°C storage condition can be due the increased viscosity of the surfactant at this temperature room reducing the mobility the dispersed phase. Moreover, the fact that this surfactant can act as a plasticizer contributes to the lower aggregation along the time. Moreover, compounds with higher water insolubility would be more stable towards the Ostwald ripening phenomenon. Thus, at lower temperature the solubility will decrease on the external phase and higher stability would occur, which is in accordance with our results. It can be seen also in the literature that the use of other methods, stabilizers and quercetin concentration can alter the physico-chemical characteristics of the NS. Gao and coworkers (2011) obtained different nanosuspensions of QUE using more complex methods, the evaporative precipitation into aqueous solution (EPAS) and the high homogenization press (HPH) process with sizes greater than 200 nm at the moment of production. Also, Sun and coworkers (2010) employed the tandem of nanoprecipitation (NP) and high pressure homogenization (HPH) method and obtained nanosuspensions of quercetin with sizes around 390 nm, indicating that the results found in this work are in accordance with the literature. A main advantage of the method used in the present study is related to the absence of high energy method and utilization of a green-solvent, instead of more toxic solvents, which were the main strategies on the aforementioned literature data. Thus, it is in accordance with ecofriendly needs of vector control.

PI reflects homogeneity of particle size. It can be seen in Table 1 that IP varied significantly from 0.328 ± 0.03 to 0.738 ± 0.02 after 30 days of storage at 25°C. However,

no changes were observed in this parameter when NS-QUE was maintained at 4°C with IP around 0.35. Significant effect on PI could be seen along the time for y for nanosuspensions kept at 25°C, but not at 4°C, except at day 7. These data indicate this last temperature as the best condition for NS-QUE stability. Despite the absence of PI data of NS-QUE stored at 4°C, our results are in accordance with Lefreve and coworkers (2016) that obtained IP values from 0.173 ed IP values rs $\pm$ 0.013 after 7 days of storage of NS-QUE at 0.1% produced by emulsification evaporation technique with ethyl acetate as organic phase.

In addition, the potential zeta was also monitored during storage time presenting negative results and it is in accordance with the literature for others nanosuspensions of quercetin using other stabilizers and production methodology (Gao et al., 2011). The zeta potential of the NS-QUE increased significantly after all time-points after 30 days of storage at 25°C from -26.36 ± 0.61 to -31.26 ± 0.15 mV. However, it could not be seen significantly changes for its values when stored at 4°C, except at day 1. The negative zeta potential can be due to the chemical nature of the particle/water interface, composed of QUE and MP 400 that possesses hydroxyl groups that can be deprotonated (Weiss-Angeli et al., 2012). ZP value measured in this study was between -25 to -35 mV, higher than $|25 \text{ mV}|$ as the index for stability of colloidal systems, indicating electrostatic long-term stability for aqueous dispersions (Patel and Agrawal, 2011).

3.2. Negative development effects of NS-QUE on *A. aegypti* larvae

Toxic effects of NS-QUE were compared with the bulk QUE, at various concentrations (100, 175, 250, 375 and 500 ppm) against the *Aedes aegypti* larvae and monitored for 240 h period. Our findings did not demonstrated a statistical correlation between the concentration of bulk QUE and the time necessary to achieve the maximum effect (Figure 1).

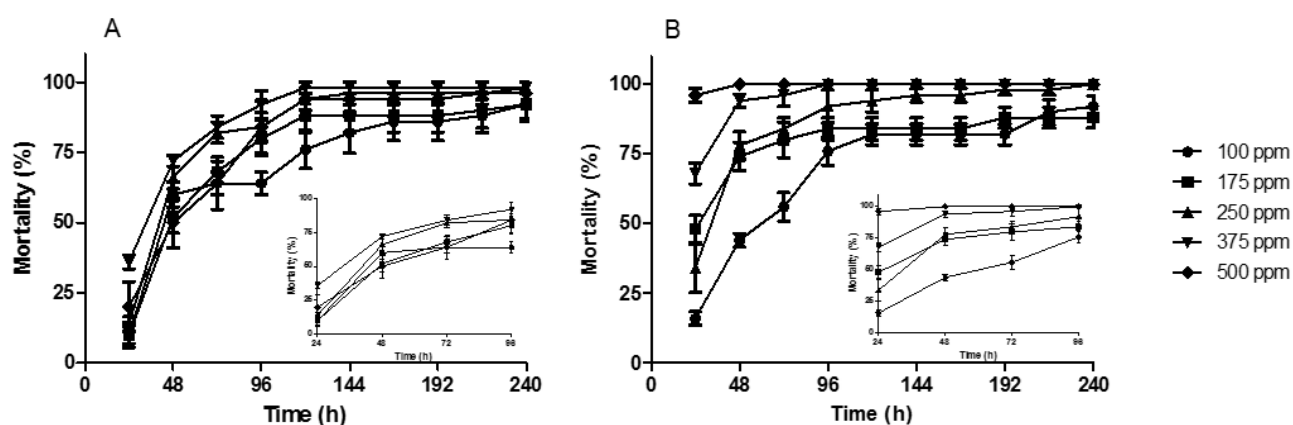


Figure 1. Effect of bulk QUE (A) and NS-QUE (B) on *Aedes aegypti* larvae after exposure with different concentrations (100, 175, 250, 375 and 500 ppm). Data are presented as mean $\pm$ SEM from three independent experiments.

In addition, only in few cases significant differences were detected between the activities of the different concentrations of bulk QUE for each time. On the other hand, the time to achieve de maximum larvicidal activity for NS-QUE reduced as the concentration increased. In fact, while NS-QUE at 100 ppm required 72 h to achieve maximum activity, NS-QUE at 500 ppm reached it in the first 24 h indicating that nanosuspensions were found to be more effective than its bulk counterpart. There was no statistical difference of the larvae mortality achieved between NS-QUE and its bulk form for concentrations lower than 375 ppm. However, NS-QUE at 375 and 500 ppm reached mortality values significantly higher than bulk QUE. The significance of this difference was reduced with increasing exposure time until 120h, from where it disappeared. NS-QUE showed a larvicidal action significantly higher than bulk QUE in a time-dependent manner. The results indicate that the main differences between NS-QUE and bulk QUE are not based on their maximum activities, but on the ability of NS-QUE to achieve mortality faster than its bulk form. In the case of the control group (water), no mortality was observed within 24 h and the development of larvae into pupae, and then adults, were considered normal (data not shown). *A. aegypti* larvae mortality after 24 h of exposition with bulk QUE at concentrations lower than 375 ppm were

less than 20%. However, at 500 ppm, the mortalities after 24 and 48 h were $36.0 \pm 5.5\%$ and $72.0 \pm 4.4\%$, respectively. For NS-QUE, these values were around 96 and 100% after the same time-points. Regarding 250 ppm, the values were $66.0 \pm 8.9\%$ and $78 \pm 10\%$ for bulk QUE and NS-QUE, respectively but did not demonstrated statistical significance.

Satisfactory results for natural larvicidal products in the literature are associated to samples that induce mortality levels higher than 75% at 250 ppm (Botas et al., 2017; Pimenta et al., 2006) as could be seen here for NS-QUE. The efficacy of natural derived plants against mosquito larvae can vary significantly depending on vegetal species, if the substances are isolated or not, the concentration of the active compound in the extract or oil, as well as upon the mosquito species. Because of it, larvicidal activity varies a lot in the literature. Sumroiphon and coworkers (2006) tested *Citrus reticulata* Rutaceae ethanolic extract against *A. aegypti* and found 75% of mortality levels with around 3.000 ppm after 24 h of exposure. On the other way, Chaithong and coworkers (2006) found 76% of mortality of *A. aegypti* after 24 h of exposure with the ethanolic extract of *Piper longum*.

Despite there is no data about the effect on *Aedes aegypti* of nanocarriers with QUE, this higher mortality is in accordance with Sugumar et al. (2014) and Anjali et al. (2010) that found superior mortality levels for nanoemulsions, another type of nanostructure, against *Cx. quinquefasciatus* mosquito larvae when compared to their bulk formulations. This can be explained by the higher superficial area contact provided by nanostructured systems with larvae. The highest mortality was observed for the highest concentrations, at 375 ppm and 500 ppm. For all surviving larvae incubated with QUE or NS-QUE it was found that they adversely affected the development of larvae avoiding the pupation and mosquito emergence. This fact is in accordance for larvae treated with QUE from another species, *B. cucurbitae* (Sharma & Sohal, 2013).

This can be explained by growth inhibitory effects on larvae incubated with quercetin once they can not assimilate food properly (Li et al., 2015; Sharma & Sohal, 2013). It was

suggested that QUE oxidation by larvae generates reactive oxygen species that can degrade the nutritional quality of food present in gut lumen of insect and also affect transhydrogenase activity impacting negatively on their growth what can lead them to death (Barbehenn et al., 2005; Vamdock et al 2012).

There is a lack of studies in the literature concerning isolated substances in free and nanostructured forms as larvicidal products. Despite there is no data about herbal-derived larvicidal nanosuspensions until now, other studies aimed to generate larvicidal herbal nanoemulsions through the use of vegetal oils against *A. aegypti* (Botas et al., 2017; Oliveira et al., 2016; Duarte et al., 2015; Rodrigues et al., 2014). These studies demonstrated mortality levels up to 80% after 48h of incubation with concentrations ranging from 200 to 500 ppm. Thus, our results are in accordance with mortality levels for larvicidal herbal nanostructures.

Morphological observation of the larvae treated with 500 ppm of NS-QUE and its bulk form revealed different trend of toxicity as can be seen in Figures 2 and 3. *Aedes aegypti* larvae incubated with NS-QUE and its bulk form exhibited morphological alterations, such as damaged anal papillae, distorted body, shrunken and darken body (Figure 2). However, it can be seen that larvae incubated with NS-QUE was more intensely damaged than that incubated with bulk QUE. On the other hand, the larvae of the control group showed elongated and vermiform appearance, with the body well defined.

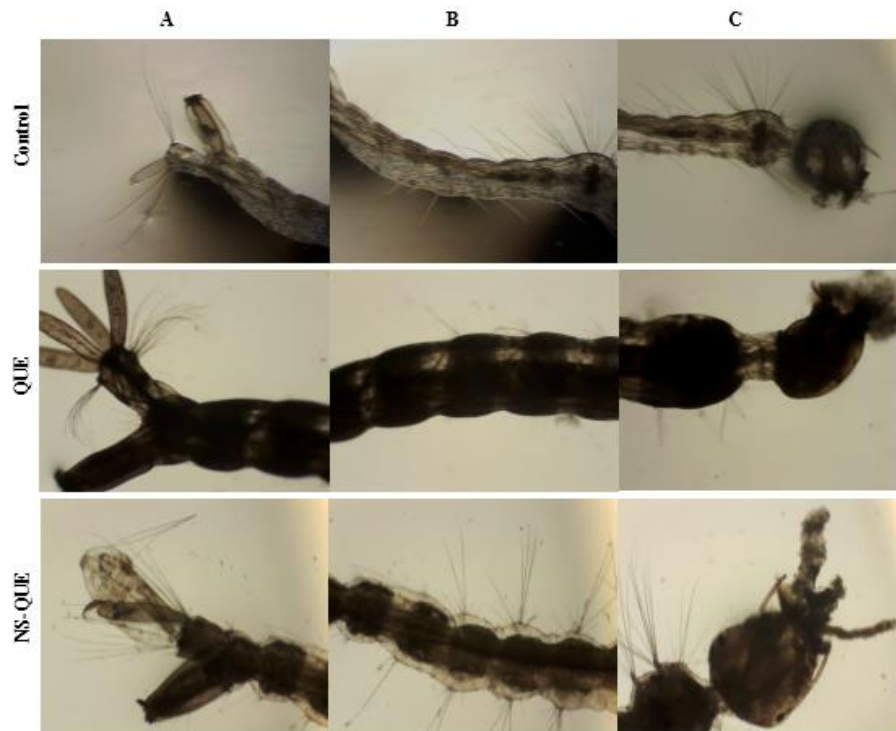


Figure 2. Light micrograph of *A. aegypti* larvae. Control showing no alteration. Larvae treated with QUE or NS-QUE at 500 ppm showing alterations on cuticle of abdomen and anal papillae.

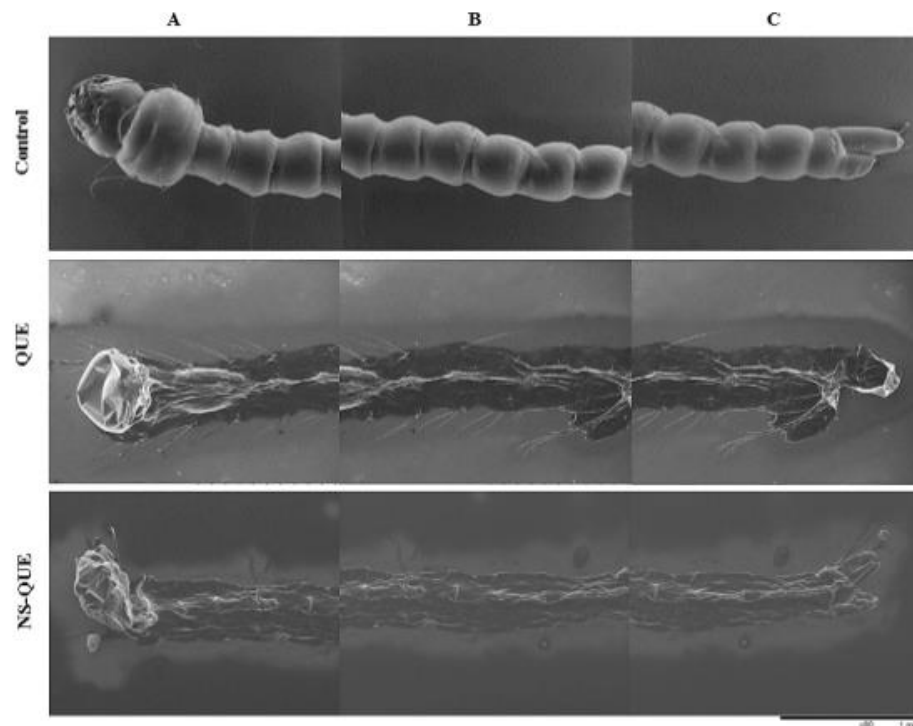


Figure 3. Scanning electron micrograph of *A. aegypti* larvae. Control showing no alteration. Larvae treated with QUE or NS-QUE at 500 ppm showing alterations on cuticle and anal papillae.

Aedes aegypti darkened body was also observed by Oliveira and coworkers et al. (2013) when they were incubated with essential oil of *Piper aduncum* and was attributed to overlap of cuticle segments. Another study with Pepper plants on *A. aegypti* also demonstrated extensive damage and shrunken cuticle of the anal papillae which they associated to the larvae death (Chaithong et al., 2006). It is demonstrated in the literature that *Culex quinquefasciatus* and *Aedes Aegypti* larvae incubated with larvicidal nanoemulsions have been reported to have shrunken cuticle after the treatment (Botas et al., 2017; Oliveira et al., 2017). The observed alterations here may affect larvae development contributing to the observed mortality and morphological changes in larvae subjected to treatments QUE-based formulations were observed. However, other factors can contribute for larvicidal activity on larvae, as the degradation of food by reactive oxygen species in gut lumen induced by QUE (Li et al., 2016; Sharma et al 2013; Alves et al., 2010).

Ecotoxicity effects of NS-QUE on *Chlorella vulgaris*

The environmental toxicity test was performed using the green algae *Chlorella vulgaris* to determine whether bulk QUE or NS-QUE would alter the algae development in aquatic ecosystems since QUE can demonstrate stimulating and, also inhibiting effects on organisms depending on its concentration (Kovačević & Matulić, 2013). This algae is a single-cell organism of rapid multiplication being an excellent model of eukaryotic organism for environmental toxicity studies. It has green photosynthesizes pigments, is easy to grow and adapt well to various conditions of development in fresh water (Simmons & Wallschlager, 2010; Zhang et al., 2016). The toxic effect is determined by the inhibition of algal biomass growth. For this, the algae were submitted to different concentrations of bulk QUE and NS-QUE formulations and the cells monitored during the period of 10 days. The

algae culture treated with different concentrations of bulk QUE and NS-QUE are shown in Figure 4.

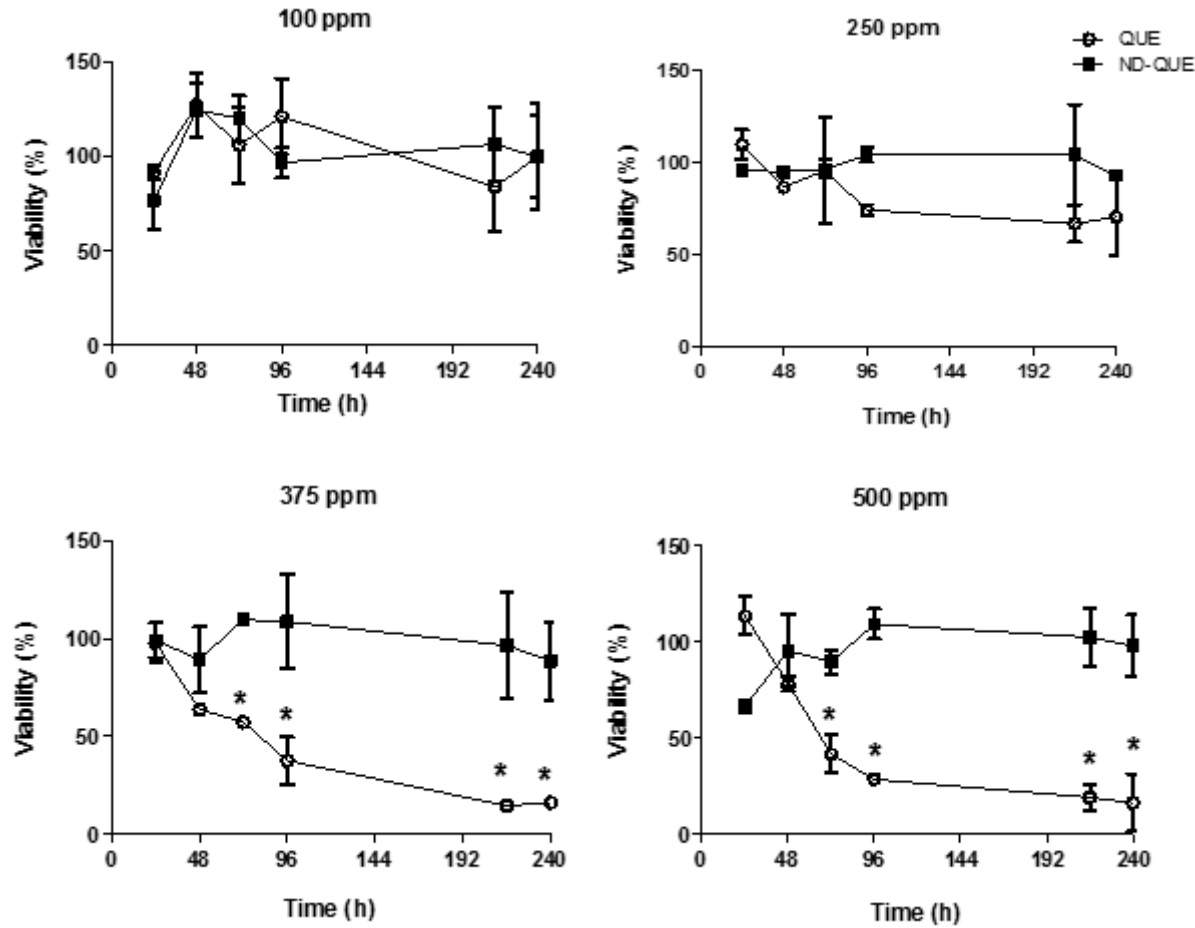


Figure 4. Effect of NS-QUE and bulk QUE on cell viability of *Chlorella vulgaris* algae after exposure with different concentrations (100, 250, 375 and 500 ppm). Data are presented as mean $\pm$ SEM from three independent experiments. Groups significantly different from the control group (QUE) are shown by $*P < 0.05$.

The algae growth is found to varied with the type and concentration of the formulation used. Least toxicity was observed for NS-QUE, whereas highest toxicity was observed for QUE on algal propagation, especially at 375 and 500 ppm. It could not be seen statistical difference on algae viability when they were incubated with 100 and 250 ppm regardless the sample. In addition, when *C. vulgaris* was incubated with 375 or 500 ppm of NS-QUE the viability did not alter significantly along the time. On the other hand, when the algae was incubated with QUE at 375 or 500 ppm the viability decreased to approximately 16% after 10 days. It can be noted a statistically significant difference ($p < 0.01$) on algae viability when treated with 375 and 500 ppm of QUE after 48h and 72h when compared with NS-QUE, respectively. These data are in accordance with Kovačević & Matulić (2013) that reported cell mortality from 10 to 46% when QUE was incubated for 48h with another algae, the green *Hydra*, at concentrations between 200 and 300 ppm. This mortality could be attributed to pro-oxidative processes and, also to a decrease in the cell diameter as well a change in chloroplast characteristics. After 48h of incubation with 500 ppm of QUE it was observed the presence of green precipitate. This may be an indicative of cell death as it was observed a loss of the typical green color of algae.

The group undergoing treatment with NS-QUE at the same concentrations kept the cell population viable along the time. Although studies showing the advantages of the nanostructured products it is known that, their toxicity can cause greater impacts on the ecosystem (POLONINI et al., 2015). Previous studies of a *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion with pesticidal activity also demonstrated toxic effects on *Chlorella vulgaris* algae with concentrations above 100 ppm (Oliveira et al., 2017). Suman and coworkers (2015) demonstrated that zinc oxide nanoparticles induced mortality on *Chlorella vulgaris* with concentrations varying from 50 to 300 ppm. These toxic effects can be due the release of polar molecules or ions with biological activity on these algae. In the present study, it was verified that the use of the NS-QUE showed less toxic effects when compared

to QUE against the *C. vulgaris* species indicating that this nanoparticle would be more advantageous when evaluating the ecotoxicity against *C. vulgaris*.

Conclusion

In conclusion, a NS-QUE was produced with a green solvent and by a low energy method. The homogeneity, the adequate sizes and the negative zeta potential along the time indicate that this formulation could be used. NS-QUE altered the development of *Aedes Aegypti* at all time-points investigated inducing them to death especially at higher concentrations. Thus, this nanocarrier can be considered a promising candidate for insects control once it is made of a natural product and well studied substance. Its use may allow for higher doses to be applied without lasting environmental toxic effects on algae once this formulation demonstrated to be target specific, and it may be useful in the tropical vectors control.

References

1. Alves, S.N., Serrao, J.E., Melo, A.L., 2010. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron*. 41, 592-597.
2. Anarjan, N., Tan, C.P., Chemical stability of astaxanthin nanodispersions in orange juice and skimmed milk as model food systems. *Food Chem.* 139(1-4), 527-531.
3. Anjali, C.H., Khan, S.S., Margulis-Goshen, K., Magdassi, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2010. Formulation of water-dispersible nanopermethrin for larvicidal applications. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(8), 1932-1936.
4. Antwi, F.B., Reddy, G.V.P., 2015. Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 40; 915–923.
5. Barbehenn, R., Dodick, T., Poopat, U., Spencer, B., 2005. Fenton-Type Reactions and Iron Concentrations in the Midgut Fluids of Tree-Feeding Caterpillars. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 60, 32-43.
6. Botas, G.D.S., Crus, R.A.S., de Almeida, F.B., Duarte, J.L., Araujo, R.S., Souto, R.N.P., Ferreira, R., Carvalho, J.C.T., Santos, M.G., Rocha, L., Pereira, V.L.P., Fernandes, C.P., 2017. Baccharis reticularia DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control. *Molecules*, 22(11), 1990.
7. Bradberry, S.M., Cage, S.A., Proudfoot, A.T., Vale, J.A., 2005. Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicol. Rev.* 24 (2), 93-106.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2014. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/29/BE-2014-45--3--primeiras-semanas.pdf>.
9. Carneiro, L.A.M., Travassos, L.H., 2016. Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Microbes Infect.* 18(3), 169-171.
10. Chaithong, U., Choochote, W., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Chaiyasit, D., Champakaew, D., Tuetun, B., Pitasawat, B., 2006. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J. Vector. Ecol.* 31(1), 138-144.
11. Copping, L.G., Menn, J.J., 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest. Manag. Sci.* 56(8), 651-676.
12. Duarte, J.L., Amado, J.R.R., Oliveira, A.E.M.F.M., Cruz, R.A.S., Ferreira, A.M., Souto, R.N.P., Falcao, D.Q., Carvalho, J.C.T., Fernandes, C.P., 2015. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Braz J Pharmacog.* 25, 189-192.
13. Gao, L., Liu, G., Wang, X., Liu, F., Xu, Y., Ma, J., 2011. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *Int. J. Pharm.* 404(1-2), 231-237.
14. Garzón, G.A., Narváez-Cuenca, C., Vincken, J., Gruppen, H., 2017. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. *Food Chem.* 217, 364-372.
15. Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martínez, E., Nathan, M.B., Pelegrino,

- J.L., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R.W., 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(12), 7-16.
16. Kim, S., Ahn, Y., 2017. Larvicidal activity of lignans and alkaloid identified in *Zanthoxylum piperitum* bark toward insecticide-susceptible and wild *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Parasit. Vectors.* 10,221.
17. Kovačević, G., Matulić, A., 2013. Effects of Quercetin on the Green Hydra (*Hydra viridissima* Pallas, 1766). *Int. J. Biol.* 5(3), 57-63.
18. Lefevre, L., Ferreira, A.M., Vilhena, J.C.E., Florentino, A.C., Cruz, R.A.S., Bereau, D., Robinson, J., Amado, J.R.R., Carvalho, J.C.T., Fernandes, C.P., 2016. Development of Quercetin Based Nanodispersions. *Curr. Top. Med. Chem.* 16(18), 2051-2056.
19. Li, Z., Guan, X., Michaud, J.P., Zhang, Q., Liu, X., 2016. Quercetin interacts with Cry1Ac protein to affect larval growth and survival of *Helicoverpa armigera*. *Pest. Manag. Sci.* 72(7), 1359-1265.
20. Lindsay, S.W., Wilson, A., Golding, N., Scott, T.W., Takken, W., 2017. Bulletin of the World Health Organization. *Bulletin of the World Health Organization.* 95:607-608. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.189688>
21. Lotito, S.B., Frei, B., 2006. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J. Biol. Chem.* 281(48), 37102-37110.
22. Mamani-Matsuda, M., Kauss, T., Al-Karrat, A., Rambert, J., Fawaz, F., Thiolat, D., Moynet, D., Coves, S., Malvy, D., Mossolayi, M.D., 2006. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochem. Pharmacol.* 72(10), 1304-1310.
23. Oliveira, A.E., Duarte, J.L., Cruz, R.A., Souto, R.N., Ferreira, R.M., Peniche, T., da Conceição, E.C., de Oliveira, L.A., Faustino, S.M., Florentino, A.C., Carvalho, J.C., Fernandes, C.P., 2017. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. *J. Nanobiotechnol.* 15, 2.
24. Oliveira, G.L., Cardoso, S.K., Lara, C.R. Jr, Vieira, T.M., Guimarães, E.F., Figueiredo, L.S., Martins, E.R., Moreira, D.L., Kaplan, M.A., 2013. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *An Acad Bras Cienc.* 85(4), 1227-1234.
25. Patel, V.R., Agrawal, Y. K., 2011. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *J Adv Pharm Technol Res.* 2(2), 81-87.
26. Patterson, J., Sammon, M., Garg, M., 2016. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med.* 17(6), 671–679.
27. Perumalsamy H., Jang, M.J., Kim, J., Kadarkaria, M., Ahn, Y., 2015. Larvicidal activity and possible mode of action of four flavonoids and two fatty acids identified in *Millettia pinnata* seed toward three mosquito species. *Parasit. Vectors.* 8:237.
28. Petersen, E., Wilson, M.E., Touch, S., McCloskey, B., Mwaba, P., Bates, M., Dar, O., Mattes, F., Kidd, M., Ippolito, G., Azhar, E.I., Zumla, A., 2016. Rapid Spread of

- Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *Int. J. Infect. Dis.* 44, 11-15.
29. Pimenta, A.T.A., Santiago, G.M.P., Arriaga, A.M.C., Menezes, G.H.A., Bezerra, S.B., 2006. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Braz J Pharmacog.* 16, 501-505.
30. Polonini, H.C., Brandão, H.M., Raposo, N.R.B., Brandão, M.A.F., Mouton, L., Couté, A., Yéprémian, C., Sivry, Y., Brayner, R., 2015. Size-dependent ecotoxicity of barium titanate particles: the case of *Chlorella vulgaris* green algae. *Ecotoxicology.* 24, 938–948.
31. Rattan, S.R., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* 29, 913-920.
32. Rodrigues, E.C.R., Ferreira, A.M., Vilhena, J.C.E., Almeida, F.B., Cruz, R.A.S., Florentino, A.C., Souto, R.N.P., Carvalho, J.C.T., Fernandes, C.P., 2014. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Braz J Pharmacog.* 24(6), 699-705.
33. Sharma, R., Sohal, S.K., 2013. Bioefficacy of quercetin against melon fruit fly. *Bull. Insectology*, 66 (1), 79-83.
34. Silva, A., Figueiredo, S.A., Sales, M.G., Delerue-Matos, C., 2009. Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris*—a useful tool in hazardous effluents management. *J Hazard Mater.*, 167:179–85.
35. Simmons, D.B.D., Wallschläger, D., 2011. Release of reduced inorganic selenium species into waters by the green fresh water algae *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* 45(6), 2165-2171.
36. Smith, L.B., Kasai, J., Scott, J.G., 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic. Biochem. Physiol.* 133, 1-12.
37. Sugumar, S., Clarke, S.K., Nirmala, B.K., Tyagi, B.K., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2014. Nanoemulsion of eucalyptus activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bull. Entomol. Res.* 104, 393–402.
38. Sukumar, K., Perich, M.J., Boobar, L.R., 1991. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am Mosq Control Assoc.* 7(2), 210– 237.
39. Suman, T.Y., Radhika, R.S.R., Kirubaqaran, R., 2015. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 23-30.
40. Sumroiphon, S., Yuwaree, C., Arunlertaree, C., Komalamisra, N., Rongsriyam, Y., 2006. Bioactivity of citrus seed for mosquito-borne diseases larval control. *Southeast Asian J Trop. Med. Pub. Hlth.* 37(3), 123-127.
41. Sun, M., Gao, Y., Pei, Y., Guo, C., Li, H., Cao, F., Yu, A., Zhai, G., Development of nanosuspension formulation for oral delivery of quercetin. *J Biomed Nanotechnol.* 6(4), 325-332.
42. Treutter, D., 2005. Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant. Biol.* 7(6), 581-591.

43. Vandock, K. P., M. J. Mitchell, and C. F. Fioravanti. 2012. Effects of plant flavonoids on *Manduca sexta* (tobacco hornworm) fifth larval instar midgut and fat body mitochondrial transhydrogenase. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 80, 15-25.
44. Weiss-Angeli, V., Poletto, F.S., de Marco, S.L., Salvador, M., da Silveira, N.P., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2012. Sustained Antioxidant Activity of Quercetin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol.* 12(3), 2874-2880.
45. World Health Organization (WHO), 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicidas. World health organization Communicable disease control, prevention and eradication WHO pesticide evaluation scheme. WHO, Geneva, Switzerland
46. Yang, D., Cui, D., Wang, C., Zhao, X., Zeng, Z., Wang, Y., Sun, C., Liu, G., Cui, H., 2017. Preparation and Characterization of Emamectin Benzoate Solid Nanodispersion. *J. Nanomater.* ID 6560780.
47. Zhang, L., Lu, H., Zhang, Y., Li, B., Liu, Z., Duan, N., Liu, M., 2016. Nutrient recovery and biomass production by cultivating *Chlorella vulgaris* 1067 from four types of post-hydrothermal liquefaction wastewater. *J Appl Phycol* 28:1031–103.
- 48.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Foi possível produzir NS-QUE utilizando solvente ecológico por um método simples e de baixo custo. A formulação apresentou boa estabilidade física quando armazenada a 4°C.
- ✓ QUE e NS-QUE (100 a 500 ppm) apresentaram ação larvicida contra *Aedes Aegypti*;
- ✓ A NS-QUE (375 e 500 ppm) apresentou ação larvicida superior à sua forma não estruturada nas mesmas concentrações;
- ✓ A NS-QUE não afetou o desenvolvimento das algas *Chlorella vulgaris* ao contrário da QUE indicando menor ação tóxica ambiental da forma nanoestruturada;
- ✓ O uso de QUE pode ser uma alternativa para eliminar larvas de mosquitos.
- ✓ Este foi o primeiro estudo do efeito de NS-QUE contra larvas de *Aedes aegypti* e algas *Chlorella vulgaris*

ANEXO 1 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO

Submission no: BJP_2018_60

Submission title: Nanosuspension of quercetin: preparation, characterization and effects against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae

Corresponding author: Dr Caio Fernandes

Listed co-author(s): Dr Anna Oliveira, Ms Ricardo Ferreira, Dr Silvia Faustino, Dr Raimundo Souto, Dr. José Carlos Carvalho, Mrs Leticie pessoa, Dr Raquel Araújo, Dr jonatas duarte, Dr Rodrigo Cruz

Dr Fernandes has submitted a manuscript to Revista Brasileira de Farmacognosia and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evise.com/profile/api/navigate/BJP?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach0102695X%23%2FBJP%2Fsubmission%2FBJP_2018_60&email=leticiepessoa00@gmail.com&firstName=Leticie&surname=pessoa&country=Brazil&title=Mrs

If you are not a co-author of this manuscript, please contact

Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Revista Brasileira de Farmacognosia

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

<http://www.evise.com/co-author/#/BJP/unsubscribe/leticiepessoa00@gmail.com/ZvZ5HYBEzfF-F-VRcGec6lZARP3ri4erAltVxsSIRiXDVbleaUxydYec2DcQ9Gjx>