

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS – POSMAT

Carolina Barbara Rogerio

**DESENVOLVIMENTO DE LARVICIDA A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS
DE LIGNINA CONTENDO ATIVOS NATURAIS PARA COMBATE À
PROPAGAÇÃO DE ARBOVIROSES**

SOROCABA

2022

Carolina Barbara Rogerio

**DESENVOLVIMENTO DE LARVICIDA A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS
DE LIGNINA CONTENDO ATIVOS NATURAIS PARA COMBATE À
PROPAGAÇÃO DE ARBOVIROSES**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, área de concentração Biomateriais sob orientação do Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto.

SOROCABA

2022

R723d Rogerio, Carolina Barbara
Desenvolvimento de larvicida a partir de nanopartículas de lignina contendo ativos naturais para combate à propagação de arboviroses / Carolina Barbara Rogerio. -- Sorocaba, 2022
128 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba
Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto

1. Nanotecnologia. 2. Arboviroses. 3. Vetores. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CAROLINA BARBARA ROGERIO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 01 dias do mês de dezembro do ano de 2022, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de CAROLINA BARBARA ROGERIO, intitulada **Desenvolvimento de larvicida a partir de nanopartículas de lignina contendo ativos naturais para combate à propagação de arboviroses**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Engenharia Ambiental / Unesp ICT Sorocaba, Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Araraquara - UNESP , Profª. Drª. LIGIA NUNES DE MORAIS RIBEIRO (Participação Virtual) do(a) Instituto de Biotecnologia / Universidade Federal de Uberlandia. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO

Leonardo
Fernandes
Fraceto:206339958
19

Assinado de forma digital
por Leonardo Fernandes
Fraceto:20633995819
Dados: 2022.12.01
17:25:51 -03'00'

Dedico esse trabalho à minha mãe, Idalina,
assim como dedico toda a minha gratidão
e cada batida do meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Senhor dos meus dias e que torna tudo possível.

Agradeço a Maria, mãe de Deus e minha, eterna advogada e protetora.

Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – 2020/05415-8, 2021/11145-6) pelo apoio financeiro ao longo do projeto.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, pela oportunidade de ingresso ao laboratório de Nanotecnologia Ambiental durante a iniciação científica, assim como por todas as demais oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Agradeço pela forma gentil e extremamente rápida com que fui orientada ao longo desses anos.

Ao Laboratório de Nanotecnologia Ambiental e seus respectivos alunos, que se empenham diariamente em realizar ciência com excelência, dividimos bancada, equipamentos, experiências e muitos aprendizados, por isso sou muito grata. Em especial ao Jhones e Patrícia, que com bom humor e simpatia me transmitiram conhecimento e atenção.

À Daniele e Lucas, que acreditaram em mim e nesse projeto, mesmo quando eu tive dúvidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia dos Materiais e ao ICTS-UNESP (Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba) pelo apoio institucional e oportunidade de evolução profissional.

À Prof^a. Dr^a. Susana Loureiro por me receber em seu grupo de pesquisa e orientação nos ensaios de ecotoxicidade, realizados no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), na Universidade de Aveiro.

Ao grupo de pesquisa do CESAM, por me acolherem e transmitirem conhecimentos. Andréia, Patrícia, Fábio, José e Giselle, minha estadia em Portugal foi melhor na companhia de vocês.

À Prof^a. Dr^a. Renata de Lima pelo apoio e parceria nos ensaios de citotoxicidade realizados no Laboratório de avaliação de Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais (LaBiTON) da Universidade de Sorocaba. Taís, mais uma vez obrigada pela amizade e parceria.

À Prof^a Dr^a Daiana S. Ávila e sua aluna Daniela pelo apoio e parceria nos ensaios com *Caenorhabditis elegans*, realizados no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans*, da Universidade Federal do Pampa.

Ao Prof. Jayme Souza-Neto pela parceria nos ensaios de atividade larvicida em *Aedes aegypti* realizados no Laboratório de Genômica Funcional & Microbiologia de Vetores (Vectomics) localizados Unesp de Botucatu. Obrigada Felipe, por toda paciência e repetições dos ensaios.

Agradeço aos meus pais, Idalina e Lauro, por me fornecerem suporte para continuar estudando e por terem paciência com meu fone de ouvido.

Aos meus irmãos, Vanessa e Lauro, por todas as caronas, lanches e risadas nesse período.

Aos meus sobrinhos, Ana Clara e Luan, por me inspirarem a ser alguém melhor todos os dias.

À minha avó Clara, meus tios, tias e primos, por me incentivarem e depositarem em mim confiança.

Aos meus avôs, que me iluminam com a luz da esperança, me mantendo firme mesmo com tanta saudade.

Ao meu tio Dalico, que ao lado de sua família me mimou e acompanhou cada passo meu, viu o início desse trabalho, mas um vírus impediu que visse sua conclusão.

Aos meus amigos que me incentivam e apoiam em cada decisão, em especial Paloma, irmã que a farmácia me deu, Andreia e Nereide, família que a vizinhança me deu. Vocês são inspirações para mim.

À Ingrid, que com seu profissionalismo me mostrou que era possível sonhar e realizar.

À Giulianna, por me apoiar e ajudar, parte essencial do começo dessa jornada.

Sou eternamente grata a todos que fizeram parte desses anos de pesquisa e aprendizado. Realizei muitos sonhos nesse período e lembrarei dessa fase com muita gratidão.

RESUMO

Os arbovírus, uma ameaça crítica à saúde humana, causam milhares de infecções anualmente e torna seu controle uma questão de saúde pública mundial. A prevenção de doenças transmitidas por mosquitos está estritamente ligada ao manejo bem-sucedido das populações de vetores. O mosquito *Aedes aegypti* é conhecido como vetor de arboviroses como dengue, zika, chikungunya e febra amarela. Apesar de existirem vários métodos alternativos disponíveis, o controle de vetores ainda é amplamente baseado no uso de compostos químicos sintéticos, embora útil no combate ao vetor, tem intensificado a seleção de mosquitos resistentes a estes agentes químicos. O uso de larvicida é um método interessante por impedir o surgimento do mosquito adulto, que devido a sua mobilidade torna mais difícil seu controle. Neste contexto, diversos mecanismos estão sendo estudados para tornar o controle de vetores mais eficiente e seguro. O desenvolvimento de sistemas de liberação modificada, uso de produtos biodegradáveis e utilização de pesticidas botânicos, são exemplos de metodologias que geram menos impacto ao meio ambiente. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento (preparo e caracterização) de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico produzidas a partir de lignina e contendo os óleos de neem (*Azadirachta indica*) e óleo de rícino (*Ricinus communis*). Aliado a boa estabilidade em temperatura ambiente, as formulações apresentaram baixo perfil de toxicidade em ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade (células HaCaT e *Allium Cepa*), assim como de ecotoxicidade em organismos não-alvo (*Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Chironomus riparius* e *Caenorhabditis elegans*), sendo que nanocápsulas carregadas com a combinação dos óleos foi a formulação que apresentou maior toxicidade nos ensaios. Ensaio de atividade larvicida em larvas de *Aedes aegypti*, foi possível determinar concentração letal de 50% das larvas apenas para nanocápsulas carregadas com óleo de neem, sendo CL₅₀ em 3000 mg/L.

Palavras-chave: *Ricinus communis*; *Azadirachta indica*; *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Arboviruses, a critical threat to human health, cause thousands of infections annually and make their control a global public health issue. The prevention of mosquito-borne diseases is strictly linked to the successful management of vector populations. The *Aedes aegypti* mosquito is known as a vector of arboviruses such as dengue, zika, chikungunya and yellow fever. Although there are several alternative methods available, vector control is still largely based on the use of synthetic compounds, although useful in combating the vector, it has intensified the selection of mosquitoes resistant to these chemical agents. The use of larvicide is an interesting method for preventing the emergence of the adult mosquito, which, due to its mobility, makes its control more difficult. In this context, several mechanisms are being studied to make vector control more efficient and safer. The development of modified release systems, use of biodegradable products and use of botanical pesticides are examples of methodologies that generate less impact on the environment. The present work presents the development (preparation and characterization) of polymeric nanocapsules with lipid core produced from lignin and containing the oils of neem (*Azadirachta indica*) and castor oil (*Ricinus communis*) oils. Allied to good stability, the formulations showed a low toxicity profile in cytotoxicity and genotoxicity assays (HaCaT and *Allium Cepa* cells), as well as ecotoxicity in non-target organisms (*Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Chironomus riparius* and *Caenorhabditis elegans*), being that nanocapsules loaded with the combination of oils was the formulation that showed greater toxicity in the tests. Larvicidal activity assays in *Aedes aegypti* larvae, it was possible to determine a lethal concentration of 50% of the larvae only for nanocapsules loaded with neem oil, with LC50 at 3000 mg/L.

Keywords: *Ricinus communis*; *Azadirachta indica*; *Aedes aegypti*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	08
CAPÍTULO 1.....	12
PERSPECTIVAS PARA LARVICIDAS USADOS NO CONTROLE DO MOSQUITO <i>Aedes Aegypti</i> : UMA REVISÃO.....	13
1.Introdução.....	13
2.Revisão Bibliográfica	14
3.Considerações finais.....	51
CAPÍTULO 2.....	53
NANOLARVICIDAS A BASE DE LIGNINA CONTENDO ÓLEO DE NEEM COMO UMA ALTERNATIVA DE BAIXA TOXICIDADE PARA CONTROLE DE PROPAGAÇÃO DO MOSQUITO <i>Aedes Aegypti</i>	54
1. Introdução.....	54
2. Materiais e Métodos.....	55
3. Resultados e Discussão.....	62
4. Conclusões.....	78
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	79
CAPÍTULO 3.....	80
DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CARREADAS COM ÓLEO DE RÍCINO E COM A COMBINAÇÃO DE ÓLEO DE RÍCINO E ÓLEO DE NEEM.....	81
1. Introdução.....	81
2. Materiais e Métodos.....	82
3. Resultados e Discussão.....	87
4. Conclusões.....	101
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	102
REFERENCIAS.....	105

INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças globais causadas pelas modificações no ecossistema, mudanças climáticas, mudanças nas práticas agrícolas, desmatamento, aumento na urbanização e globalização, afetam fortemente a expansão de insetos vetores de doenças (RAHOLA et al., 2022). As infecções virais transmitidas por mosquitos são uma grande preocupação em áreas endêmicas, o mosquito *Aedes aegypti* é o vetor dos agentes causadores das principais arboviroses, sendo dengue, chikungunya, febre amarela e zika (USHIJIMA et al., 2022).

Entre essas doenças, apenas a vacina contra febre amarela está disponível regularmente e para a dengue existe uma vacina do grupo Sanofi-Pasteur que se encontra comercializada, mas não para vacinação em massa (DE SANTANA SILVA et al., 2019), desse modo, a carga econômica e de recursos nos serviços de saúde permanece substancial em ambientes endêmicos (WILDER-SMITH et al., 2019).

Os ciclos epidemiológicos de arboviroses atingem historicamente todo o território do Brasil, a dengue é a doença de maior importância, apresentando ciclos anuais desde a década de 80, com um aumento na incidência a partir do ano de 2014 (AVELINO-SILVA; RAMOS, 2017). Apesar da baixa mortalidade associada à dengue, a alta morbidade gera a consequente sobrecarga de recursos nos serviços de saúde (WILDER-SMITH et al., 2019).

Com base nas notificações ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), base de dados vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS), o quantitativo de casos prováveis de dengue e óbitos ocasionados pela dengue durante o ano de 2019 foi de 1.544.987 e 782 respectivamente (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020). Até o fechamento da semana epidemiológica 37, em setembro, o ano de 2022 totaliza 1.346.636 prováveis casos de dengue no país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2022).

A prevalência das doenças transmitidas por vetores necessita de ações integradas entre órgãos públicos e a população, essas estratégias envolvem a remoção de criadouros, aplicação de produtos químicos, monitoramento dos mosquitos e larvas, análise das condições ambientais, monitoramento da saúde da comunidade e educação da população (ARTSOB; LINDSAY, 2008; WILDER-SMITH et al., 2019). A abordagem comumente utilizada para controle do mosquito incluem uso de inseticidas para pulverizações, materiais tratados com inseticidas de longa duração, repelentes e larvicidas (WILDER-SMITH et al., 2019).

O uso de inseticidas por décadas, embora útil no combate as arboviroses, tem

intensificado a seleção de mosquitos resistentes a estes agentes químicos (VONTAS et al., 2012). Já foram reportados dados sobre resistência nas classes dos carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretídeos, para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, o gera uma preocupação mundial visto que múltiplas mutações podem resultar em populações altamente resistentes e dificultar o controle do vetor (AMELIA-YAP et al., 2018; MOYES et al., 2017; SMITH; KASAI; SCOTT, 2016; VALLE et al., 2019). Estudos recentes apresentam alternativas entre os controles biológico, genético e químico (VONTAS et al., 2012; WILDER-SMITH et al., 2017a).

O uso de diferentes estratégias envolvendo o combate aos mosquitos se faz necessário devido a adaptabilidade, mobilidade dos mosquitos e resistência a inseticidas (CHELLAPPANDIAN et al., 2018). Uma estratégia bastante eficaz é o uso de larvicidas (PEZZI et al., 2019), que impedem o surgimento de insetos adultos capazes de transmitir patógenos (CHELLAPPANDIAN et al., 2018). No entanto, como o controle químico através de larvicidas é feito em águas estagnadas, existem riscos ao meio ambiente, animais e humanos ao introduzir compostos sintéticos em corpos d'água. Assim, larvicidas derivados de fontes naturais, tornam-se uma alternativa promissora (AL-MEKHLAFI et al., 2021).

Produtos baseados em extratos de plantas e óleos essenciais podem ser utilizados como uma alternativa aos larvicidas comerciais (CHELLAPPANDIAN et al., 2018). Esses produtos naturais são compostos promissores devido à alta eficácia e forte atividade larvicida contra larvas de mosquitos do gênero *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (GALVÃO et al., 2018; PAVELA et al., 2019). A utilização de compostos naturais se torna uma alternativa promissora por indicar menos toxicidade ao meio ambiente, aliado a isso compostos que apresentam diversos componentes ativos possibilitam diferentes modos de ação, diminuindo as chances de resistência do vetor (DA SILVA SÁ et al., 2022).

Apesar do potencial destes compostos, sua aplicação comercial ainda é limitada devido a necessidade de estudos direcionados na validação da eficácia no campo (PAVELA et al., 2019), bem como de sua análise toxicológica em organismos não-alvo (PIPLANI et al., 2019).

É conhecido a atividade larvicida dos óleos de neem (*Azadirachta indica*) (BENELLI et al., 2017), assim como do óleo de rícino (*Ricinus communis*) (KUMAR, 2017).

Os pesticidas à base de neem são populares devido a seus aspectos multidimensionais de atividade repelente, larvicida e segurança para organismos não-alvo (KALA et al., 2019). A *Azadirachta indica* tem reconhecidos efeitos contra *A.*

gambiae, *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* (WACHIRA et al., 2014; MURUGAN et al., 2011; SHARMA, MOHAN, SRIVASTANA al., 2009; CHANDRAMOHAN et al., 2016). (SHADRACH et al., 2018). Estudos relatam atividade larvícida do principal composto ativo do óleo de neem, Azadirachtina, em $CL_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ contra diferentes cepas larvais (PIPLANI et al., 2019).

Por outro lado, *Ricinus communis*, popularmente conhecida como mamona, é tradicionalmente usada como planta medicinal, sendo a única espécie do gênero *Ricinus* apresenta várias atividades biológicas, hepatoprotetor, anti-inflamatório, diurético, hipoglicêmico, antimicrobiana e inseticida (WAFA et al., 2014). Estudos indicam que o óleo de rícino pode apresentar ação larvícida contra as espécies, em *A. albopictus*, *A. stephensi*, *C. quinquefasciatus* resp., *A. aegypti*, *A. gambiae* e *C. pipiens* (WACHIRA et al., 2014; KUMAR et al., 2012, MANDAL, 2010, WAFA et al., 2014). (WAMAKET et al., 2018)

Outro aspecto interessante é que o uso da nanotecnologia no encapsulamento de ativos, visando o controle de pragas tem se mostrado uma importante estratégia para sistemas mais eficazes e com menos impactos indesejáveis. Tais formulações fornecem liberação controlada e lenta dos ativos no ambiente, aumentando a duração do efeito e reduzindo a exposição ao ativo. Ressaltando que o encapsulamento também protege o ativo da degradação prematura (CAMPOS et al., 2020). Sistemas baseados em compostos biodegradáveis é uma opção ambientalmente interessante, desse modo, utilizar no preparo de nanocarreadores, biopolímeros como a lignina, que são muitas vezes produtos ou subprodutos de resíduos do processo de produção do segmento agroindustrial, agrega valor a bioeconomia e fornece produtos mais sustentáveis (SCHNEIDER; DILLON; CAMASSOLA, 2021).

Diante desse cenário, o principal objetivo desse trabalho foi preparar e caracterizar um sistema carreador baseado em nanocápsulas de lignina para carrear os óleos de neem e rícino, para uma aplicação em controle do vetor de arboviroses (*Aedes aegypti*), visando um produto sustentável, menos tóxico e ecologicamente interessante. Também foram investigados os possíveis efeitos tóxicos dos nanolarvicidas para humanos em ensaios citotóxicos e genotóxicos (células HaCaT, queratinócitos humanos), para organismos não-alvo (*Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Chironomus riparius* e *Caenorhabditis elegans*) e especialmente a atividade larvícida em larvas do organismo alvo, *Aedes aegypti*. A dissertação está estruturada em três capítulos, conforme apresentados a seguir.

No **primeiro capítulo** é apresentada uma revisão de literatura abordando os

mecanismos de controle de mosquitos vetores, com destaque para os larvicidas utilizados, mecanismos de ação e resistência, além disso é abordado perspectivas para o desenvolvimento e aprimoramento dos produtos larvicidas, assim como o uso da nanotecnologia como aliada ao controle de vetores.

O **segundo capítulo** apresenta o desenvolvimento das nanocápsulas de lignina contendo óleo de neem. Além do preparo e caracterização do sistema, estão descritos os resultados os ensaios de citotoxicidade e ecotoxicidade em organismos não-alvo, bem como a atividade larvicida em larvas de *Aedes aegypti*.

O **terceiro capítulo** corresponde ao desenvolvimento e caracterização das nanocápsulas contendo óleo de rícino, assim como com a combinação dos óleos (neem e rícino). Os ensaios de citotoxicidade e toxicidade em organismos não-alvo também são apresentados. As formulações descritas nesse capítulo não demonstraram atividade larvicida significativa e por isso são apresentadas apenas nessa seção.

Por fim, o item **conclusão geral e perspectivas** completam a dissertação.

CAPÍTULO 1

PERSPECTIVAS PARA LARVICIDAS USADOS NO CONTROLE DO MOSQUITO

Aedes Aegypti: UMA REVISÃO

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o transmissor de doenças como dengue, zika, chikungunya e febre amarela. O combate a essas doenças é complexo e exige uma combinação de mecanismos, juntamente com ações governamentais e cooperação da população. O químico envolve o uso de inseticidas, repelentes e larvicidas. O mecanismo biológico envolve o uso de bactérias, predadores e inserção de mosquitos geneticamente modificados no ambiente. E, o mecanismo mecânico envolve mudanças no habitat, destruição de criadouros, limpeza do ambiente, bem como redução do contato entre homem e vetor. Dentre esses mecanismos, o larvicida tem chamado a atenção devido aos problemas associados ao uso de mecanismos contra mosquitos adultos, que já apresentam resistência a diversos dos produtos convencionalmente utilizados. O uso de compostos sintéticos por décadas, embora útil no combate as arboviroses, tem intensificado a seleção de mosquitos resistentes a estes agentes químicos. Alternativas para o controle de vetores são necessárias e apresentam atualizações no controle químico, botânico e biológico. Buscando maior eficiência, mais estabilidade de ativo, com redução de aplicações e bom custo-benefício existe o uso de nanotecnologia associada a ativo larvicidas para produção de sistemas de liberação controlada. O uso de diferentes estratégias envolvendo o combate aos mosquitos se faz necessário devido a adaptabilidade, mobilidade dos mosquitos e resistência a inseticidas.

Palavras-chave: arboviroses: resistência, vetores;

1. INTRODUÇÃO:

Arboviroses ou *arthropod-borne-viruses* são doenças causadas por vírus, amplificadas em vertebrados e transmitidas pela picada de vetores. Sua expansão foi e é impulsionada pelo aumento demográfico, expansão comercial, mobilidade humana e animal, degradação ambiental e falta de controle de mosquitos (SHOPE; MEEGAN, 1997; WILDER-SMITH et al., 2019).

Os humanos são atingidos acidentalmente e não suportam sua transmissão contínua. Dentre essas doenças, as mais prejudiciais atualmente são a dengue, zika e chikungunya. A dengue é a arbovirose de maior importância, principalmente em regiões tropicais, sendo que anualmente cerca de 400 milhões de pessoas são infectadas. A zika foi inicialmente registrada no Brasil em 2015, quando houve seu primeiro surto, tornando-se um problema de saúde pública internacional. A chikungunya foi inicialmente registrada em 2014 no Brasil, mas já causou epidemias na Ásia, Europa e Américas (NDIAYE et al., 2018; PRATA-BARBOSA et al., 2019).

Essas doenças são principalmente transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, que é diurno e capaz de picar diversas pessoas em curto período, além de ser adaptado ao ambiente urbano (WILDER-SMITH et al., 2019).

Existem diversas estratégias para garantir a manutenção dessas doenças, que associado a ausência de tratamentos, como vacina, tornam essas doenças um prejuízo a saúde humana e economia. O combate a essas doenças é complexo e exige uma combinação de mecanismos de combate, juntamente com ações governamentais e cooperação da população. Os mecanismos de controle podem ser divididos em químico, biológico e mecânico. O químico envolve o uso de inseticidas (piretróides, organofosforados, organoclorados e carbamatos), repelentes sintéticos (DEET, IR3535 e picaridin), repelentes naturais (óleos essenciais) e larvicidas, que podem ser sintéticos, reguladores de crescimento e naturais. O mecanismo biológico envolve o uso de bactérias, predadores e inserção de mosquitos geneticamente modificados no ambiente. E, o mecanismo mecânico envolve mudanças no habitat, destruição de criadouros, limpeza do ambiente, bem como redução do contato entre homem e vetor (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Dentre esses mecanismos, os larvicidas tem chamado a atenção devido aos problemas associados ao uso de mecanismos contra mosquitos adultos, que já apresentam resistência a diversos dos produtos convencionalmente utilizados. Além disso, há a adaptabilidade e mobilidade dos mosquitos, o que torna mais difícil seu controle (CHELLAPPANDIAN et al., 2018).

Assim, os larvicidas são uma estratégia eficiente, já que impedem que as larvas e pupas de atingir a maturidade como um mosquito adulto. Esses produtos precisam ser eficientes, sustentáveis, com baixa toxicidade em organismos não-alvo e não devem alterar as características da água (DIAS; MORAES, 2014).

Os larvicidas podem ser químicos sintéticos, como o temefós, clorpirifós, fention e pirimifós-metil, que são organofosforados e irão inibir as enzimas acetilcolinesterases (AChE) (JANKOWSKA et al., 2018; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). Os larvicidas reguladores de crescimento podem ser os análogos ao hormônio juvenil, como o metopreno e o piriproxifeno ou inibidores da síntese de quitina, como o diflubenzuron e nuvaluron (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). Os primeiros compostos irão interagir com o organismo do animal da mesma forma que o hormônio juvenil, impedindo a metamorfose do inseto (BELLES, 2020). Já os inibidores de quitina irão atuar na síntese de quitina, que é um componente da cutícula e exoesqueleto do animal, cuja má-formação pode ser fatal para o organismo (DHADIALLA; RETNAKARAN; SMAGGHE, 2005).

Os larvicidas botânicos são baseados em óleos essenciais, como uma alternativa aos químicos que podem causar algum prejuízo aos organismos não-alvo. Esses produtos são eficazes contra larvas de mosquitos *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, sendo alguns dos produtos o carvacrol, o timol, o p-cimeno, o α -pineno e o β -pineno (GALVÃO et al., 2018; PAVELA et al., 2019). Já os larvicidas biológicos podem ser predadores de larvas, como peixes, insetos, anfíbios e crustáceos, bem como bactérias, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus (Lysinibacillus) sphaericus* e spinosad, que são eficientes e sem registros de resistência pelos organismos-alvo (MARCOMBE et al., 2011).

Buscando maior eficiência, mais estabilidade de ativo, com redução de aplicações e bom custo-benefício existe o uso de nanotecnologia associada a ativo larvicidas para produção de sistemas de liberação controlada. A nanotecnologia tem sido reportada para estes fins, pois é vantajosa ao lidar com materiais de características únicas devido a sua alta área superficial específica conferindo grande reatividade a esses sistemas se comparadas a materiais de maior escala (FOLDBJERG et al., 2015; JOSHUA ASHAOLU, 2021).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arboviroses

Devido ao crescimento populacional desenfreado, os principais desafios do século 21 são a produção de alimentos e o controle de doenças (RONI et al., 2015). Associado

ao aumento demográfico há a expansão populacional e comercial, migração rural-urbana, mobilidade humana e de animais, degradação das áreas urbanas e falta de programas de controle de mosquitos. Esses fatores possibilitam a manutenção de doenças e sua disseminação a diversas partes do mundo, tornando seu combate um desafio atual (LIANG; GAO; GOULD, 2015; WILDER-SMITH et al., 2019).

Diversos patógenos podem ser transmitidos por mosquitos, sendo que existem aproximadamente 50 vírus causadores de doenças em humanos e animais. Entre essas doenças há a arbovirose, também conhecida como *arthropod-bone-viruses*, que são vírus amplificados em vertebrados e transmitidos pela picada de vertebrados, como, mosquitos e carrapatos (SHOPE; MEEGAN, 1997).

Essas doenças são zoonóticas, transmitidas de animais para humanos, sendo que os humanos são acidentalmente atingidos por esses vírus e não suportam a transmissão contínua dessas doenças. Assim, nos seres humanos os efeitos das doenças podem ser mais leves envolvendo febre de curta duração até efeitos mais graves como febre hemorrágica e encefalite (NDIAYE et al., 2018).

Geralmente as arboviroses que atingem humanos são transmitidas por mosquitos de RNA das famílias Flaviviridae, Togaviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae e Reoviridae (LIU et al., 2018). Nos últimos séculos as arboviroses que receberam mais destaques mundialmente foram a dengue (DENV), febre amarela (YFV), zika (ZIKV), chikungunya (CHKYV) e Nilo Ocidental (WNV). Existem doenças que também recebem destaque, porém ocorrem em regiões pontuais no mundo, como o vírus de Usutu (USUV) e O'nyong nyong (ONNV) (LIANG; GAO; GOULD, 2015; GOULD et al., 2017).

A DENV é a arbovirose de maior importância e mais frequente no mundo, apresentando ciclos anuais desde a década de 80, com um aumento na incidência de 400% entre 2000 e 2013. Essa doença é transmitida por mosquitos fêmea do gênero *Aedes*, principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* em regiões tropicais e subtropicais, cujas áreas infestadas por esses mosquitos abrigam mais de 3 bilhões de pessoas. Cerca de 400 milhões de pessoas são infectadas por DENV anualmente, principalmente na região da Ásia, seguida da América Latina e África. Outro fator associado à sua disseminação em áreas temperadas é o aquecimento global (AVELINO-SILVA; RAMOS, 2017; WILDER-SMITH et al., 2019).

A YFV pode ser transmitida pelo *Ae. aegypti*, *Ae. africanus* e *Ae. simpsoni*. Originário na África, espera-se que esse vírus tenha sido introduzido nas Américas, durante o período de comércio de escravos no século XVI. Essa doença está mais associada à América do Sul, atualmente. No entanto, em meados do século XVIII a XX

essa doença ameaçou a população com repetidas epidemias na América do Norte, Europa e Caribe. Após 1900 houve um declínio nas infecções devido ao controle do mosquito, seguido da descoberta da vacina em 1930 e distribuição em 1940 (WEAVER; REISEN, 2010; MONATH; VASCONCELOS, 2015; GOULD et al., 2017).

O vírus ZIKV foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2015 e no mesmo ano houve um surto da doença, que resultou em vários milhares de casos de microcefalia neonatal (MAITRA et al., 2019). Após a notificação brasileira, em fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional. Apesar de a microcefalia ter sido o sinal clínico inicial mais impactante para o acompanhamento de crianças, acredita-se que o espectro da infecção congênita pelo ZIKV possa ir muito além da microcefalia e outras anormalidades neurológicas em recém-nascidos (PRATA-BARBOSA et al., 2019).

Na última década, o vírus CHIKV também causou epidemias na Ásia, ilhas do Oceano Índico, sul da Europa e nas Américas, incluindo o Brasil. No Brasil, o CHIKV foi registrado pela primeira vez em 2014 e rapidamente se espalhou por todo o país (MAITRA et al., 2019). A infecção pelo CHIKV causa uma síndrome febril associada a dor nas articulações intensa e debilitante, dor de cabeça e mialgia. Embora condições graves não sejam comuns, como o que ocorre na dengue, manifestações neurológicas, bolhas cutâneas e miocardite podem trazer gravidade aos casos, principalmente em bebês e idosos (ARAGÃO et al., 2018).

Em 5 anos, o vírus WNV, cujos relatos iniciaram-se em 1999 em Nova York, tornou-se endêmico em toda a América. Sugere-se que esse vírus foi naturalmente disperso por aves migratórias. Na América do Norte os surtos de WNV ocorrem após o fim do verão, que é após a migração de aves migratórias para regiões mais quentes (LIANG; GAO; GOULD, 2015; GOULD et al., 2017).

Essas doenças podem infectar diversos animais em seus habitats silvestres, mantendo uma relação equilibrada com os mesmos e causando poucas mortes aos seus hospedeiros. Porém, para os seres humanos, essas relações não são equilibradas e podem causar mortalidade significativa quando infectados. O contato de seres humanos com artrópodes transmissores de arboviroses se intensificou com o avanço da população em habitats selvagens, devido ao aumento demográfico e desmatamento para o desenvolvimento da agropecuária e indústrias. Assim, as relações entre vetores-vírus-hospedeiros têm se alterado nos últimos séculos, causando graves consequências ao ambiente e aos seres humanos (GOULD et al., 2017).

Além disso, existem estratégias ambientais que garantem a sobrevivência e

dispersão com sucesso das arboviroses. Esses vírus se associam a artrópodes específicos, que garantem sua distribuição e sobrevivência durante o ciclo silvestre do vírus e podem ser mantidos em dormência em ovos de mosquitos aguardando a eclosão nas épocas mais propícias, ou seja, período chuvoso.

2.2 Mosquitos vetores

As arboviroses podem infectar uma variedade de artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos, sendo que existem cerca de 300 espécies de mosquitos e 116 espécies de carrapatos capazes de transmitir essas doenças (LIANG; GAO; GOULD, 2015). Os principais gêneros de mosquitos vetores de doenças são *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (PEZZI et al., 2019; PARK et al., 2020).

O gênero *Anopheles* é conhecido pela transmissão do protozoário responsável pela malária e por ter seus mosquitos com características semelhantes. O *Anopheles funestus* e *Anopheles gambiae* transmitem malária e ONNV, enquanto o *Anopheles annularis* transmite o vírus da encefalite japonesa (JEV) (GOULD et al., 2017; PEZZI et al., 2019; PARK et al., 2020).

O gênero *Aedes* geralmente está associado a vírus que causam doenças febris e hemorrágicas. O mosquito *Ae. aegypti* é o principal vetor de transmissão de arboviroses em países tropicais, como DENV, ZIKV, CHIKV e febre amarela. Essa espécie é antropofílica, peridomiciliar diurna, capaz de picar várias pessoas em curto período, pode se reproduzir em árvores e em ambientes artificiais que coletam água e mais adaptado ao ambiente urbano (GOULD et al., 2017; WILDER-SMITH et al., 2019). Esse mosquito também está associado com a transmissão urbana de YFV nas Américas (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019)

O *Aedes albopictus* (“mosquito tigre asiático”) e *Aedes vexans* podem servir como vetores potenciais para o ZIKV e CHIKV. Os mosquitos *Ae. albopictus* são mais adaptados a áreas semiurbanas e rurais, de climas temperados e tropicais. Essa espécie é encontrada em todos os continentes, exceto Antártida, pois seus ovos podem sobreviver a desidratação e serem transportados em recipientes, como vasos e pneus. Além disso, podem se reproduzir em diversos habitats e sobreviver mesmo em temperaturas baixas (-10 °C) (TANGENA et al., 2018; PEZZI et al., 2019; WILDER-SMITH et al., 2019; PARK et al., 2020).

Os mosquitos do gênero *Culex* podem transmitir doenças como JEV, encefalite de St. Louis (SLEV), encefalite Murray Valley (MVEV), WNV e USUV. Os vírus transmitidos pelos mosquitos *Culex* spp. geralmente induzem infecções encefálicas e são

associados a aves migratórias, que podem transportar os vírus por longas distâncias. O *Culex tritaeniorhynchus* e *Culex pipiens* podem transmitir WNV, Emilia-Romagna e USUV (GOULD et al., 2017; PEZZI et al., 2019; PARK et al., 2020). Os mosquitos e suas respectivas doenças estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Dados de gênero e espécie de mosquitos e suas respectivas doenças transmitidas

Gênero	Espécie	Doença	Referência
Aedes	<i>Ae. aegypti</i>	DENV	(GOULD et al., 2017; WILKE et al., 2019)
		YFV	
		ZIKV	
		CHKYV	
	<i>Ae. africanus</i>	YFV	(GOULD et al., 2017)
		ZIKV	
	<i>Ae. albopictus</i>	DENV	(GOULD et al., 2017; WILKE et al., 2019)
		YFV	
		ZIKV	
		CHKYV	
		WNV	
	<i>Ae. simpsoni</i>	JEV	(GOULD et al., 2017)
		YFV	
Anopheles	<i>Ae. vexans</i>	ZIKV	(GOULD et al., 2017)
		CHKYV	
		JEV	
	<i>An. funestus</i>	ONNV	(GOULD et al., 2017; PEZZI et al., 2019; PARK et al., 2020)
		Malária	
	<i>An. gambiae</i>	ONNV	(GOULD et al., 2017; PEZZI et al., 2019; PARK et al., 2020)
		Malária	
	<i>An. annularis</i>	JEV	(GOULD et al., 2017)
	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Malária Vírus Mayaro WNV	(WILKE et al., 2019)

	<i>Culex. annulirostris</i>	MVEV	(GOULD et al., 2017)
	<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	JEV MVEV	(GOULD et al., 2017)
		WNV	
		Emilia-	
	<i>Cx. pipiens</i>	Romagna USUV	(GOULD et al., 2017)
		JEV	
		SLEV	
<i>Culex</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ZIKV CHKYV WNV JEV SLEV Vírus Mayaro	(GOULD et al., 2017; WILKE et al., 2019)
		WNV	
		Emilia-	
	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Romagna USUV JEV	(GOULD et al., 2017; PEZZI et al., 2019; PARK et al., 2020)
	<i>Culex vishnui</i>	WNV JEV	(GOULD et al., 2017)

2.3 Mecanismos de controle

As arboviroses são prejudiciais para a humanidade e para a economia, ocasionando diversos surtos e mortes no mundo. Assim, essas doenças precisam de mecanismos de controle e monitoramento como medidas preventivas de seus efeitos na população (WILKE et al., 2019). Esse controle é bastante complexo, mas necessário, considerando que existem poucas vacinas para essas doenças, sendo que apenas a vacina contra YFV está disponível regularmente e para a DENV existe uma vacina do grupo Sanofi-Pasteur que já se encontra comercializada, mas não para vacinação em massa (SILVA et al., 2019).

Dessa forma, a carga econômica e de recursos nos serviços de saúde permanece substancial em ambientes endêmicos. Assim, a principal estratégia para a prevenção da

disseminação dessas doenças é uma ação integrada da população e dos órgãos públicos no âmbito municipal. Essas estratégias envolvem a remoção de criadouros, aplicação de produtos químicos, monitoramento dos mosquitos e larvas, análise das condições ambientais, monitoramento da saúde da comunidade e educação da população (ARTSOB; LINDSAY, 2008; WILDER-SMITH et al., 2019).

Uma combinação de métodos de controle é indicada, e de modo geral esses métodos podem ser divididos em três: controle químico, biológico e mecânico, conforme fase do ciclo de vida do mosquito (Tabela 2).

Tabela 2: Descrição dos principais métodos de controle de mosquitos vetores de arboviroses, conforme controle químico, biológico e mecânico.

Controle	Produtos indicados conforme fase	
	Ovos, Larvas e pupas	Adulta
Químico	Larvicidas sintéticos:	
	- Temefós;	Inseticidas:
	- Clorpirifós;	- Piretóides;
	- Fention;	- Organosforados;
	- Pirimifós-metil	- Organoclorados;
	Larvicidas reguladores de crescimento:	- Carbamatos;
	Análogo ao hormônio juvenil	Repelentes sintéticos:
	- Metopreno;	- DEET;
	- Piriproxifeno;	- IR3535;
	Inibidores da síntese de quitina:	- Picaridin;
Biológico	- Benzoilfenilureias;	Repelentes naturais
	Larvicidas naturais	- PMD
	- Óleos essenciais;	- Geraniol;
		Bactérias:
	Bactérias:	- <i>Wolbachia</i> ;
	- <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> ;	Modificações:
	- <i>Saccharopolyspora spinosa</i> ;	- Mosquitos geneticamente modificados;
		- Mosquitos esterilizados com irradiação;

Mecânico	- Mudanças no habitat; - Limpeza e encerramento de reservatório de água;	Redução do contato entre vetores e humanos: - Telas e mosquiteiros; - Roupas;
-----------------	---	---

Fonte: Adaptado de PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (2019).

O controle mecânico envolve estratégias de controle dos criadouros buscando formas eficazes de diminuir a reprodução dos mosquitos em recipientes artificiais. Esta estratégia é baseada na remoção de recipientes de água temporários e cobertura de permanentes, diminuição do contato do mosquito com o homem, a partir da instalação de telas em portas e janelas, evitar ambientes com espaços abertos nos horários de maior atividade de mosquitos e uso de roupas que evitem deixar a pele exposta (ARTSOB; LINDSAY, 2008; BALDACCHINO et al., 2015; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Outro fator é o monitoramento dos artrópodes relacionados à essas doenças, através da identificação de potenciais vetores de determinados vírus, seus ciclos, maior incidência de determinados vetores conforme diferentes estações. E, assim, com esses dados pode-se criar estratégias coerentes para a tomada de decisões no controle de surtos de arboviroses (NDIAYE et al., 2018). Em Barkedji, Senegal, por exemplo, possui um programa de vigilância ativo desde 1990 que conseguiu identificar as arboviroses: Semliki Forest, Babanki, Barkedji, Bagaza, USUV, Yaounde, WNV, Koutango e Saboya, Bunyamwera, Ngari, Febre do Vale Raft, Gabek Forest, Sanar e Chandipura, os vetores e ciclo da Febre do Vale Raft. No entanto, para melhor atender as necessidades de identificação das arboviroses foram ampliadas as armadilhas e iscas de vetores, aumentando as frequências de análises e regiões monitoradas (NDIAYE et al., 2018).

Dessa forma, esse controle de mosquitos e seu habitat é bastante complexo e difícil de ser utilizado, precisando ser atualizado conforme necessidade local, vigilância contínua, educação pública e legislação ambiental, sendo dependente de toda a comunidade (WILKE et al., 2019). Assim, além do controle mecânico, há o controle biológico e químico como combate ao vetor na tentativa de romper a cadeia de transmissão de doenças (WILDER-SMITH et al., 2019).

O controle químico é o mais usual e inclui produtos químicos com ação ovicida, larvicida, repelentes e inseticida, atuando em todas as etapas do desenvolvimento do mosquito. Esses produtos podem ser associados a remoção de criadouros de mosquitos, sendo mais eficazes em ambientes onde as larvas são pequenas e difíceis de monitorar.

Pode-se utilizar larvicidas e inseticidas em sprays para pulverização dos criadouros, por exemplo, porém seu uso deve ser racional e seguro ao meio ambiente e população. O uso de inseticidas ocasionou uma resistência dos mosquitos a estes químicos, comprometendo ainda mais seu controle (VONTAS et al., 2012; WILDER-SMITH et al., 2019; WILKE et al., 2019).

O controle biológico baseia-se no uso de predadores e patógenos para redução dos vetores, incluindo peixes, invertebrados aquáticos, bactérias e fungos. Mosquitos transgênicos, mudanças em RNAi e patógenos têm sido reportados para estes fins (WILDER-SMITH et al., 2019). Em Juazeiro, Brasil, machos geneticamente modificados de *Ae. aegypti* carregando a cepa OX513A foram liberados, em um estudo que durou mais de um ano e reduziu essa espécie local em 95%. Resultados similares foram apresentados em experimentos nas Ilhas Cayman em 2010 (CARVALHO et al., 2015). No entanto essa técnica pode demandar liberações contínuas de mosquitos modificados mesmo que em níveis mais baixos do que os iniciais, considerando a migração de mosquitos não modificados (DORIGATTI et al., 2018).

Outra abordagem é a inserção de mosquitos *Ae. aegypti* infectados com uma bactéria chamada *Wolbachia* que pode controlar a reprodução destes mosquitos por tornar os ovos gerados pela fecundação inviáveis (DORIGATTI et al., 2018). Um teste foi realizado em Yogyakarta, Indonésia, em 2016. Foram inseridos mosquitos *Ae. aegypti* infectados e 90 % da população ficou infectada e a transmissão de DENV foi interrompida. No entanto, existe uma preocupação de que essa infecção leve a substituição de *Ae. aegypti* por *Ae. albopictus* (GIRARD et al., 2020), que é um transmissor de DENV naturalmente infectado por *Wolbachia* (DORIGATTI et al., 2018).

2.4 Agentes utilizados no controle de mosquitos vetores de arbovirose

2.4.1 Inseticidas

Os inseticidas sintéticos podem ser divididos em: carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretídeos. Os carbamatos são ácidos carbâmicos e em baixas doses podem não causar a morte de mosquitos *Aedes*. Os organoclorados, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) foram os primeiros inseticidas a serem criados, em 1934. No entanto, o DDT não é recomendado desde 2001 devido aos riscos de seu metabólito, o diclorodifenil-dicloroetileno (DDE). Os organofosforados, como temefós, malation, fenitrothione e primifós metil, são formados por ésteres de ácido fosfórico, desenvolvido entre 1939-1945, que apesar da baixa persistência no ambiente podem ser muito prejudiciais ao homem (VONTAS et al., 2012; SÁ et al., 2022).

Os piretóides são derivados de piretrina, como deltametria e permetrina, representam cerca de 25% do mercado mundial de inseticidas, utilizados em sprays e aerossóis. Sua popularidade ocorre devido a sua toxicidade baixa para humanos e rápido efeito nos insetos. Esses compostos são rapidamente eliminados do corpo humano, mas, ainda podem trazer complicações neurológicas aos homens (HEMINGWAY et al., 2004; VONTAS et al., 2012; SÁ et al., 2022).

Os inseticidas botânicos também têm sido estudados como uma alternativa aos inseticidas convencionais, já que são menos agressivos aos organismos não-alvo, a matéria-prima é renovável e produzir combinações de compostos que podem diminuir a resistência a inseticidas. Esses inseticidas podem atuar no ovo do inseto, causando danos na casca e afetando o processo de quitinização do ovo. Nas larvas, esses compostos podem comprometer as estruturas do organismo, afetar sua mobilidade e desenvolvimento. Já na pupa, podem afetar seu sistema respiratório, natação e causar má formação. E, em adultos podem prejudicar a produção de hormônios, prejudicar seu desenvolvimento e comprometer a reprodução (SÁ et al., 2022).

Podem ser citados os óleos essenciais, como (E)-nerolidol e α -selineno, obtidos de *Manglietia dandyi* (BAN et al., 2020), o α -pineno, 1,8-cineol, limoneno e α -terpineol de *Callistemon citrinus* (THI GIANG AN et al., 2020) e, o mentol, acetato de mentila e limoneno da *Mentha arvensis* (MANH; TUYET, 2020). Além disso, existem os extratos de plantas, que podem ser extraídos de diversos tecidos e órgãos das plantas (SÁ et al., 2022), como as folhas de *Hyptis suaveolens*, *Lantana camara*, *Nerium oleander* e *Tecoma stans* (HARI; MATHEW, 2018) e casca do fruto *Persea americana* (LOUIS et al., 2020).

2.4.1.1 Resistência de mosquitos aos químicos de controle

O uso de inseticidas por décadas, embora útil no combate as arboviroses, tem intensificado a resistência de mosquitos a estes químicos (VONTAS et al., 2012). Os mecanismos de resistência isolados ou combinados podem causar resistência de todas as classes de inseticida. Os carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretóides, já foram reportadas para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (em níveis mais baixos de resistência) nas Américas e Ásia (MOYES et al., 2017), porém poucos estudos relatam dados da África e Europa (RAWAT et al., 2011).

Esses mecanismos podem estar atrelados a menor penetração do inseticida no inseto, mutações no local-alvo do mosquito pelo inseticida ou resistência metabólica em enzimas de desintoxicação (MOYES et al., 2017). A menor penetração de inseticidas

pode estar atrelada ao desenvolvimento de cutículas mais espessas (HEMINGWAY et al., 2004) e está mais relacionada a mosquitos do gênero *Anopheles* e sua importância ainda não foi confirmada para mosquitos do gênero *Aedes* (MOYES et al., 2017).

Em relação aos locais-alvo, os mecanismos envolvem substituição de aminoácidos no canal de sódio dependente de voltagem, conhecida como *Knockdown* (Kdr), causando resistência a DDT e piretróides (MARCOMBE et al., 2019), fato já relatado em *Ae. aegypti* no sudeste asiático (LI et al., 2015), Mianmar (KAWADA et al., 2014) e Cingapura (KASAI et al., 2014). A resistência Kdr é muito comum em *Ae. aegypti* para permetrina, deltametrina e DDT (MOYES et al., 2017). Outra resistência de local-alvo é a mutação no receptor γ -aminobutírico (GABA), associado aos inseticidas ciclodienos em *Drosophila melanogaster* e *Ae. aegypti* (HEMINGWAY et al., 2004).

Para a resistência causada por base metabólica, há a biotransformação dos inseticidas em enzimas desintoxicantes, como citocromo P450, a glutatona-S-transferase (GSTs), e carboxil/colinesterases (CCE) (MARCOMBE et al., 2019). Citocromos P450 e atividade de CCE também foram reportadas em Cingapura em *Ae. aegypti* (KASAI et al., 2014) e Tailândia em *Ae. aegypti* (POUPARDIN et al., 2014), respectivamente.

A superexpressão dos citocromos P450, CCE e GSTs, indicam resistência de piretróides. Em relação aos citocromos P450, principalmente os da subfamília CYP6 e CYP9, o CYP6D1 pode estar envolvido na resistência a piretróides em *Musca domestica* (KASAI; SCOTT, 2000), enquanto o CYP6A1 pode estar associado a resistência de organofosforados (SABOURAULT et al., 2001). Embora o mecanismo de resistência ainda é pouco entendido, geralmente há uma elevação dos níveis de citocromos P450 em espécies resistentes (SABOURAULT et al., 2001).

CCE catalisam a hidrólise de ésteres e sua resistência está relacionada a inseticidas organofosforados e carbamatos, principalmente em mosquitos do gênero *Culex*, como *Cx. pipens*, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. tritaeniorhynchus*. O registro de alterações de estares em *An. gambiae*, *Anopheles albimanus* e *Ae. aegypti* também foram registradas. Em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* das Américas, Europa e Ásia, as alfas-esterases CCEAE3A e CCEAE6A causam resistência a temefós através de seu sequestro ou metabolismo lento (HEMINGWAY et al., 2004; MOYES et al., 2017).

As GSTs estão envolvidas na resistência de organofosforados, DDT, devido a sua descloração direta, e em relação à resistência de piretróides, o mecanismo não é claro, mas pode envolver a proteção da peroxidase contra o estresse oxidativo. Geralmente, a resistência dos insetos está associada a um aumento na quantidade de enzimas, como uma amplificação dos genes ou aumento da taxa de transcrição das enzimas (HEMINGWAY

et al., 2004; MOYES et al., 2017).

Marcombe et al. (2019) determinaram que a resistência aos temefós e malation pelos mosquitos *Ae. aegypti* em Laos (Ásia) estava relacionada a atividade de CCE, enquanto a resistência a deltametrina pode estar relacionada aos P450s e as GSTs. A resistência gerada na região de Laos é preocupante e o governo tem investido em larvicidas alternativos para conseguir controlar os vetores de arboviroses. Tangena et al. (2018) também analisaram a região de Laos (Ásia), porém em populações de *Ae. albopictus*. Esses mosquitos apresentaram resistência ao DDT, malation (adultos) e temefós (larvas), mas não apresentaram resistência aos piretróides.

Nas populações *Ae. aegypti* de Trinidad e Tobago (POLSON et al., 2011), bem como na Ilha Grande Caimão (*Grand Cayman*, Caribe) foram detectados mosquitos resistentes a DDT e piretróides (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010). Essa resistência foi associada ao aumento dos níveis de GSTs, acetilcolinesterases (AChE), citocromos P450 e mutações no canal de sódio.

Em Havana (Cuba), as populações testadas de *Ae. aegypti* entre os anos de 2006-2008 se mostraram resistentes a temefós, que foi associado ao aumento da atividade de esterases (BISSET et al., 2011). Em 2000-2001 e 2006 houve dois surtos de dengue em Cuba e o aumento da resistência aos temefós na cidade de Havana foi uma preocupação dos programas de controle de mosquitos. O estudo também apontou que as aplicações mensais de temefós em Havana podem não ser suficientes para controlar a população de *Ae. aegypti*. A resistência a temefós associada ao aumento da atividade de esterases também foi descrita na Tailândia (SAELIM et al., 2005), Brasil (MACORIS et al., 2003) e Malásia (DHANG et al., 2008). No Brasil a resistência de *Ae. aegypti* também foi associada ao citocromo P450, no gene CYP6N12 e GSTs (GSTi1, GSTo1 e GSTx2) (STRODE et al., 2012). Também houve registro de resistência do *Cx. quinquefasciatus* á temefós, em Pernambuco (Brasil) (AMORIM; HELVECIO; AYRES, 2013) e em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, em Campinas (Brasil) (CAMPOS; ANDRADE, 2003).

2.4.2 Ovicidas

Ovicidas são substâncias ou agentes utilizados para impedir a eclosão de ovos de insetos, por exemplo. Alguns compostos larvicidas também tem funções ovicidas, como o caso dos análogos de hormônio juvenil e benzoilfeniluréias atuando no desenvolvimento embrionário ou na supressão da oviposição, como o kinopreno e buprofezina (DHADIALLA; RETNAKARAN; SMAGGHE, 2005).

Diversas plantas possuem essa capacidade, mas ovicidas botânicos ainda são pouco estudados comparados aos larvicidas e repelentes naturais, apesar de sua importância no controle dos danos causados por outras etapas do ciclo de vida de mosquitos (BENELLI, 2015; SINGH et al., 2021).

Al-mekhlafi et al. (2021) analisaram a atividade ovicida da combinação dos extratos de *Foeniculum vulgare* e *Matricaria chamomilla* em *Cx. pipens*. A eclosão dos ovos caiu de 95 % para 15 % com concentrações do extrato variando de 62,5 mg/L a 500 mg/L. Kovendan et al. (2013) estudaram o efeito ovicida de extratos de *Acalypha alnifolia* contra *Ae. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Cx. quinquefasciatus*. Para as três espécies a eclodibilidade atingiu 0 % em concentrações a partir de 250 mg/L do extrato vegetal em metanol. Prathibha; Raghavendra; Vijayan, (2014) estudaram as propriedades larvicidas de *Eugenia jambolana*, *Solidago canadensis*, *Euodia ridleyi* e *Spilanthes mauritiana* contra *Ae. aegypti*, *An. stephensi* e *Cx. quinquefasciatus*. Para os ovos do mosquito *Ae. aegypti* nenhum dos extratos causou impediu a eclodibilidade, mas o extrato *S. mauritiana* a eclosão atingiu 3,2 % na concentração de 100 mg/L. No caso dos ovos de *An. stephensi* e *Cx. quinquefasciatus* a eclosão atingiu 0 % quando tratados com os extratos de *E. ridleyi* e *S. mauritiana*.

2.4.3 Repelentes

Repelentes tópicos são a primeira linha de defesa dos seres humanos contra artrópodes transmissores de arboviroses, pela proteção das pessoas contra mordidas. Assim, repelente são produtos químicos voláteis que formam uma barreira que anula a atração de um inseto a um hospedeiro. Esses compostos devem ter baixa toxicidade e permeabilidade, não causar irritação da pele, mucosa e olhos, ter odor agradável, possuir ação repelente de longa duração, com ampla ação aos principais artrópodes, ser resistente a água e suor, estável quimicamente, não manchar tecidos e ser economicamente viável (ISLAM et al., 2017; TAVARES et al., 2018; FRANCES; DEBBOUN, 2022).

Os principais repelentes sintéticos são o N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), o éster 1-metilpropil do ácido 2-(2-hidroetil) -1-piperidina-carboxílico (picaridina/icaridina) e o etil butilacetilaminopropionato (IR3535) (FRANCES; DEBBOUN, 2022). O DEET foi sintetizado pelo Departamento de Agricultura dos EUA em 1956 e tornou-se o ativo mais utilizado como repelente tópico (padrão-ouro) contra moscas, mosquitos, carrapatos e outros artrópodes que picam. Esse ativo pode ser utilizado em aerossóis, cremes, loções, sprays, e géis em concentrações variando de 5% a 100% de DEET, sendo de maior eficácia em mosquitos do tipo *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*

e *Verrallinas* em comparação ao *Anopheles*. Seu modo de ação está associado a receptores olfativos (TAVARES et al., 2018; FRANCES; DEBBOUN, 2022).

A picaridina foi desenvolvida pela Bayer AG em 1990 e registrada como Cutter Advanced em 2005. Esse ativo é comparável ao DEET em termos de proteção contra vetores, sendo mais eficaz em *An. gambiae* do que o DEET e o IR3535. Seu mecanismo de ação em *Aedes* e *Anopheles* é desconhecido, porém em *Cx. quinquefasciatus* espera-se que o modo de ação seja semelhante ao DEET. Já o IR3535 é derivado da β -alanina, desenvolvida em 1970, pode ser usado em concentrações de 5% para mulheres grávidas e crianças com menos de 6 anos, e 25% para adultos (TAVARES et al., 2018; FRANCES; DEBBOUN, 2022).

Já os repelentes botânicos mais conhecidos são os óleos de eucalipto-limão e o óleo de citronela, cujos principais componentes são o 16,4-p-metano-3,8-diol (PMD) e o geraniol, respectivamente (TAVARES et al., 2018; DA SILVA; RICCI-JÚNIOR, 2020). O PMD é um produto de hidrodestilação do óleo essencial de eucalipto-limão, utilizado em sprays com concentração de 10% a 40%, e de eficácia semelhante ao DEET. Este é o único repelente botânico considerado pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) devido à sua eficácia na prevenção de malária (MAIA; MOORE, 2011; DIAZ, 2016; FRANCES; DEBBOUN, 2022).

2.4.4 Larvicidas

O uso de diferentes estratégias envolvendo o combate aos mosquitos se faz necessário devido a adaptabilidade, mobilidade dos mosquitos e resistência a inseticidas. Essa resistência pode ser associada ao uso intensivo de inseticidas desde a década de 1960 em diversos países (CHELLAPPANDIAN et al., 2018). Uma estratégia bastante eficaz é o uso de larvicidas (PEZZI et al., 2019), que impedem o surgimento de insetos adultos capazes de transmitir patógenos (CHELLAPPANDIAN et al., 2018). Os larvicidas ideais são eficazes, sustentáveis, economicamente viáveis, com baixa toxicidade em mamíferos e não devem alterar as características da água (DIAS; MORAES, 2014).

No entanto, como o controle químico através de larvicidas é feito em águas estagnadas, existem riscos ao meio ambiente, animais e humanos ao introduzir compostos sintéticos em corpos d'água. Assim, larvicidas derivados de fontes naturais, tornam-se uma alternativa promissora (AL-MEKHLAFI et al., 2021). Nesse sentido, diferentes abordagens, além dos larvicidas convencionais, têm sido exploradas para controlar vetores (SANTOS; LIMONGI; PEREIRA, 2020).

Dessa forma, um manejo integrado de larvas é uma estratégia complexa, que deve abordar os aspectos químicos, culturais e biológicos de controle, através da alteração do ambiente larval, drenagem de água parada e cobertura de recipientes que possam acumular água, aplicação de produtos químicos (larvicidas) e inserção de predadores de larvas no ambiente (CHELLAPPANDIAN et al., 2018).

Figura 1: Esquema de seleção do larvicida ideal.



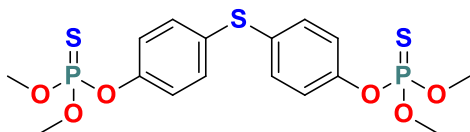
Fonte: Adaptado Dias; Moraes, (2014).

2.4.4.1 Larvicidas químicos sintéticos

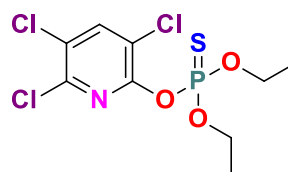
Os larvicidas químicos sintéticos podem ser divididos em temefós, clorpirifós, fention e pirimifos-metil (Figura 2), sendo que o temefós pode ser utilizado em águas potáveis, enquanto fention pode ser utilizado em águas não potáveis em recipientes (GERIS et al., 2012; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Figura 2: Estrutura química dos larvicidas químicos sintéticos: a) temefós; b) clorpirifós; c) fention; d) pirimifos-metil.

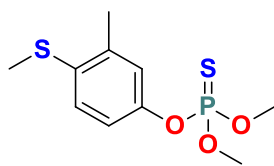
a)



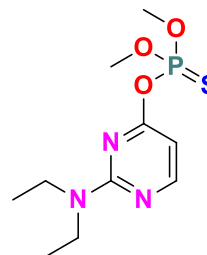
b)



c)



d)



O temefós é um larvicida organofosforados, eficaz, de baixa toxicidade, utilizado na Ásia, América e Europa para o combate de mosquitos transmissores de DENV (GEORGE et al., 2015; GRIGORAKI et al., 2016; VANI et al., 2018), principalmente o *Ae. aegypti* (MOYES et al., 2017). No entanto, atualmente seu uso na Europa foi banido na maioria dos países (GRIGORAKI et al., 2016). Seu uso deu-se desde 1965 em concentrações de 0,1-0,5 Kg/ha para o controle de vetores e este composto é reportado como improvável de causar risco agudo em condições corretas de uso, quando a dosagem não excede 1 mg/L (GEORGE et al., 2015).

Esses compostos podem ser depositados em recipientes d'água próximo a focos de mosquitos ou fumigação (GRIGORAKI et al., 2016; VANI et al., 2018). Apesar de mosquitos *Aedes* já apresentarem resistência a este composto (GRIGORAKI et al., 2016), temefós ainda é uma ferramenta amplamente utilizada devido a facilidade de aplicação e efeito duradouro. Esse produto tem sido utilizado em emulsões, soluções, pós, grânulos e sistemas de liberação controlada (GEORGE et al., 2015).

A resistência a temefós ao mosquito *Aedes* tem sido maior em regiões do Brasil, Guiana Francesa e Caribe, em menos incidência em regiões do Oeste Africano e resultados variados dependendo das regiões da Ásia. Essa resistência pode estar associada as enzimas desintoxicantes, como citocromo P450, as colinesterases e as GSTs (MOYES et al., 2017).

Alguns dos genes super expressos envolvendo a resistência à temefós foram: CYP6N12, CCEAE3A e GSTX2 (Brasil), CCEAE3A, CCEAE6A, CYP6Z8, CYP9M9, CYP6H1 e CYP4H28 (Tailândia) e CCEAEA6A, CCEAEA3A, CYP6M11 e GSTX2 (Grécia) (MOYES et al., 2017). Além disso, os genes CCEAE3A e CCEAE6A aparentam estar envolvidos no mecanismo de resistência a temefós para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, sendo capazes de sequestrar e metabolizar os temefós, pois esses genes podem ligar-se mais facilmente ao temefós do que a enzima AChE (GRIGORAKI et al., 2016; MOYES et al., 2017).

O clorpirifós é um larvicida organofosforados clorado, inibidor de AChE, tóxico,

de baixo custo e registrado na maioria dos países do mundo, desde que começou a ser utilizado em 1965 nos EUA pela Dow Chemical Company. Seus metabólitos, o clorpirifós oxon (3,5,6-tricloro-2-piridinol) e o TPC (3,5,6-tricloro-2-piridinol) são mais perigosos com o composto original (JOHN; MANAKULAMSHAIKE, 2015; HITES, 2021).

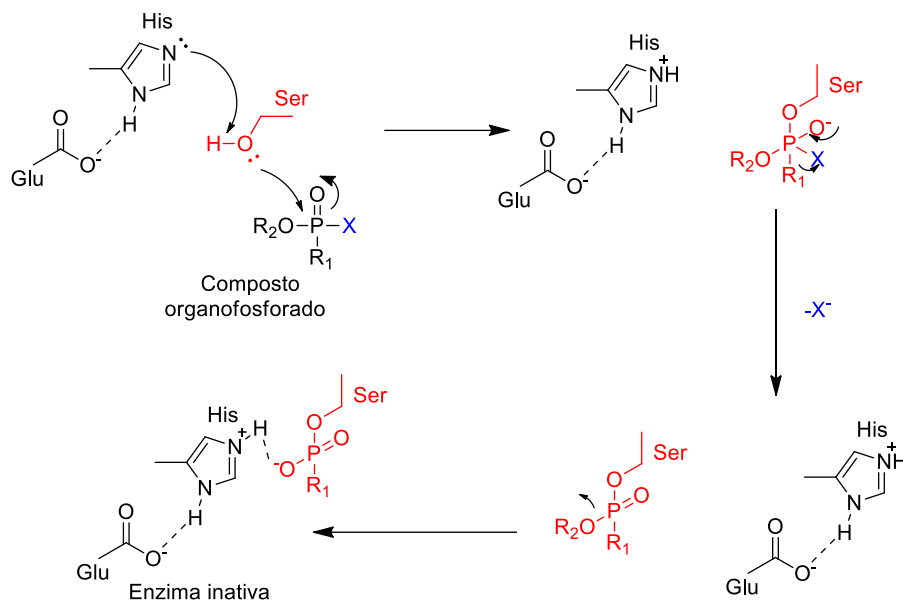
O fention (*O,O*-dimetil-*O*-[3-metil-4-metiltilfenil]fosforotioato) é um organofosforado sistêmico mais utilizados em áreas agrícolas e urbanas. Esse composto é um neurotóxico que atua inibindo a atividade de AChE e causa peroxidação lipídica (ALTUNTAS; DELIBAS, 2002; BRUN et al., 2004). Devido a sua toxicidade para aves, humanos e outros organismos não-alvo (BRUN et al., 2004), esse composto foi banido em países da Europa, EUA, Canadá e Nova Zelândia. Seus produtos de oxidação, fention-sulfóxido, fention-sulfona e fenoxo, também podem contaminar o ambiente e devem ter no máximo 1 mg/kg de resíduos no ambiente (BAKAS et al., 2014).

Pirimifos-metil (4-dimetoxifosfinotioiloxi-*N,N*-dietil-6-metilpirimidin-2-amina) é um organofosforado, que pode induzir danos ao DNA, diminuir atividade de colinesterase e causar hepatotoxicidade, afetando diversos organismos não-alvo, como peixes, mamíferos e aves (PATAKIOUTAS; ALBANIS, 2002; BORRÁS et al., 2017).

Esses compostos, embora tenham estruturas diferentes, seu modo de ação é semelhante e está relacionado a inibição da AChE do sistema nervoso. AChE é uma enzima, serina hidrolase, com função de catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e acetato (Figura 3). Essa função é necessária para que o neurônio retorne ao seu estado de repouso e a taxa de degradação de ACh pela enzima AChE é de 25.000 moléculas por segundo (SATO, 2006; COLOVI et al., 2013).

Em uma situação normal, os aminoácidos envolvidos neste processo são a serina (Ser₂₀₀), a histidina (His₄₀₀) e o ácido glutâmico (Glu₃₂₇), chamado de a tríade catalítica (COLOVI et al., 2013). Porém, em uma situação em que essa reação ocorre na presença de organofosforados, há a fosforilação irreversível de colinesterases, ou seja, a inativação de ACh. Os compostos organofosforados ligam-se covalentemente a serina (Ser₂₀₀) e perdem um dos grupos ligantes. O composto formado é a enzima inativa, e como consequência de não realizar a reação de hidrólise, há o acúmulo de ACh, colapsando o sistema nervoso (Figura 3; COLOVI et al., 2013).

Figura 3: Mecanismos de inibição da acetilcolinesterase na presença de compostos organofosforados



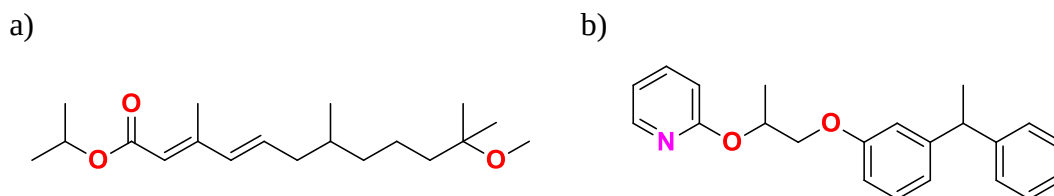
Fonte: Adaptado de DA SILVA et al. (2013).

2.4.4.2 Larvicidas reguladores de crescimento

2.4.4.2.1 Análogos ao hormônio juvenil

Como exemplo de larvicidas reguladores de crescimento há o metopreno e piriproxifeno (Figura 4), que podem ser utilizados em águas potáveis (GERIS et al., 2012; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). A eficiência do larvicida irá depender da sensibilidade do estágio do organismo, da sua taxa de penetração cuticular, de sua capacidade de não ser degradado por enzimas e compatibilidade com o receptor do organismo (WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018).

Figura 4: Estrutura química dos larvicidas reguladores de crescimento análogos ao hormônio juvenil: a) metopreno; b) piriproxifeno.



O metopreno, 1-metiletil (E,E)-11-metoxi-3,7,11-trimetil-2,4,dodecadeinoato, é o JHA mais parecido com o natural, que foi o primeiro a ser registrado comercialmente em 1975 (JINDRA; BITTOVA, 2020). Esse hormônio está relacionado ao crescimento e

desenvolvimento dos insetos, impedindo que estágios larvais de insetos se desenvolvam em adultos viáveis (SILBERHORN, 2005; WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018). Esse composto é muito utilizado nos EUA, Europa e outras regiões economicamente avançadas onde podem existir maiores limitações de compostos sintéticos (LAWLER, 2017). O composto pode ser utilizado contra insetos, como formigas, mosquitos, moscas, pulgas, besouros, piolhos e mariposas, desde que não estejam em fase adulta, dispostos em formulações de cápsulas, emulsões, comprimidos, grânulos e aerossóis (SILBERHORN, 2005).

Já o piriproxifeno, 4-fenoxifenil(R,S)-2-(2-piridiloxi) éter propílico, também atua como um JHA inibindo a metamorfose, apesar de possuir estrutura diferente do JH natural (WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018). Esse composto possui maiores indícios de toxicidade em organismos não-alvo, como invertebrados aquáticos e pequenos peixes (LAWLER, 2017; MAOZ et al., 2017), mas sua toxicidade é baixa em seres humanos e mamíferos, permitindo seu uso no controle de mosquitos *Aedes*, por exemplo (YUNTA et al., 2016). O piriproxifeno é mais estável que o metopreno e ativo contra mais insetos (JINDRA; BITTOVA, 2020).

Os larvicidas JHAs afetam o comportamento celular (atuação a nível celular) e regula a expressão dos genes durante a muda larval e formação de pupa (atuação a nível molecular). O desenvolvimento e crescimento dos insetos são coordenados principalmente pelo JH e ecdisteróide (20-hidroxiecdisona, 20E), cujas concentrações irão interferir no tipo de muda (larva-larva ou larva-pupa). O JH auxilia na manutenção do estado juvenil do inseto durante a muda larval (larva-larva), prevenindo a metamorfose do inseto imaturo devido ao aumento de ecdisteróide. No último instar, em que há diminuição de JH e aumento de ecdisteróide para que haja a mudança de larva para pupa, há repressão irreversível dos genes específicos de larva e alteração da célula (WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018).

No organismo, os receptores ativos de JH são duas proteínas: a Metopreno-tolerante (*Met*) e Taiman (*Tai*), que tem função de regular as principais funções de JH e a metamorfose do organismo. O complexo JH-*Met-Tai* liga-se a região de resposta ao JH no DNA e ativa a transcrição do gene alvo. Dentre estes está o Kruppel homólogo 1 (Kr-h1), que traduz a ação antimetamórfica do JH (ZHU; NORIEGA, 2016; WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018; BELLES, 2020).

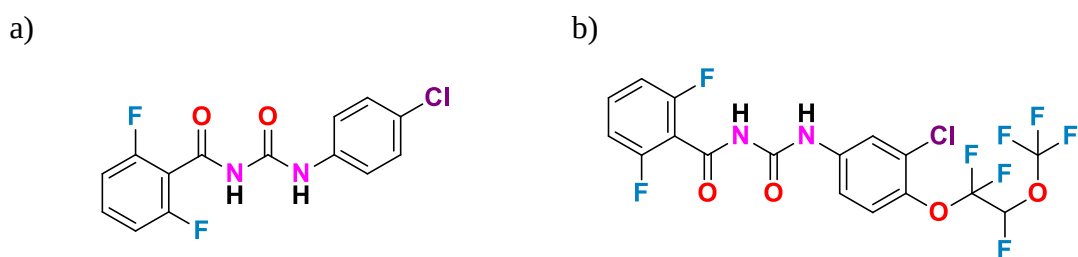
Essas alterações não são simultâneas no corpo do organismo, assim, aplicações externas de JH (JHA) produzem um inseto com características de larva e pupa. Isso ocorre porque os larvicidas JHAs irão interagir com os receptores de JH da mesma forma que o

hormônio natural. Os compostos sintéticos podem ser ainda mais potentes em efeito biológico que o hormônio natural, devido a sua estabilidade química e resistência a degradação dentro do organismo do inseto (WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018; JINDRA; BITTOVA, 2020).

2.4.4.2.2 Inibidores da síntese de quitina

Os larvicidas inibidores da síntese de quitina, os benzoilfeniluréias, como o diflubenzuron e nuvaluron (Figura 5) (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019), também são inibidores de crescimento de insetos e vem sendo utilizados como uma alternativa aos larvicidas neutoróxicos, cujos organismos-alvo vem apresentando resistência (MOYES et al., 2017; WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018).

Figura 5: Estrutura química dos larvicidas reguladores de crescimento análogos ao hormônio juvenil: a) diflubenzuron; b) nuvaluron



O diflubenzuron foi descoberto em 1972, como um regulador de crescimento não sistêmico, muito utilizado na Europa, que age na muda dos insetos ou na eclosão dos ovos em uma ampla variedade de insetos que se alimentam de folhas ou de plantas de interesse agrícola, bem como mosquitos, moscas e gafanhotos. Porém, é ineficiente contra pulgões e cochonilhas (MERZENDORFER, 2013; GRIGORAKI et al., 2017). Esse composto é ecologicamente correto, altamente tóxico para larvas de insetos (COHEN, 2010) e não há indicações de resistência de mosquitos a este larvicida (GRIGORAKI et al., 2017).

O nuvaluron é muito utilizado em culturas de campo, plantas, frutas e vegetais, contra insetos Lepidoptera, Coleptera, Hemiptera e Diptera. Nos EUA, o larvicida tem sido utilizado para controlar pragas de maçãs, plantas ornamentais, batata e algodão. Sua toxicidade é muito baixa para mamíferos, não é tóxico para aves, minhocas e a microflora do solo, e de modo geral apresenta um baixo risco para o ambiente (XU et al., 2017; CATCHOT et al., 2020; FIAZ et al., 2021), além de apresentar alta toxicidade contra larvas de mosquito *Ae. aegypti* (FARNESI et al., 2012).

Assim como os JHAs, esses larvicidas não matam adultos, mas interferem na muda dos insetos, impedindo que cheguem a fase adulta, inibindo a eclosão de ovos ou causando mortalidade larval. Esses larvicidas são menos tóxicos para organismos não-alvo e não tem efeitos adversos em humanos (WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018). Neste caso, os larvicidas irão atuar na prevenção da síntese de quitina, um polissacarídeo presente na cutícula dos insetos, como seu maior componente (30-60 %). A cutícula fornece estrutura ao exoesqueleto e sua quebra durante a formação pode ser letal ao organismo (DHADIALLA; RETNAKARAN; SMAGGHE, 2005; WIJAYARATNE; ARTHUR; WHYARD, 2018).

O modo de ação desses compostos é diferente dos outros. Esses compostos podem interferir nos níveis de quitina na cutícula, alterando a sua composição resultando em uma deposição endocuticular anormal que afeta suas características, como perda de seu arranjo multicamadas, e interferem na muda do inseto (DHADIALLA; RETNAKARAN; SMAGGHE, 2005; MERZENDORFER, 2013).

Além da alteração na produção de quitina, outros modos de ação desses larvicidas são comentados, como (1) inibição do transporte de UDP-GLcNAc, que é um substrato para a síntese de quitina; (2) bloqueio da ligação entre a quitina e a cutícula; (3) inibição das enzimas ligadas ao catabolismo de quitina; (4) acúmulo de ecdinosa que estimula a quebra da quitina (DHADIALLA; RETNAKARAN; SMAGGHE, 2005; REZENDE-TEIXEIRA et al., 2022). Ainda não está completamente definido seu modo de ação, mas espera-se que esses compostos interfiram na síntese ou transporte de proteínas para a montagem da quitina polimérica. De modo geral, esses larvicidas interferem na muda do organismo, a integridade da cutícula, rompimento da ecdise, morte do organismo ou má-formação de pupas (CATCHOT et al., 2020)

2.4.4.3 Larvicidas Naturais

A busca por estratégias de controle de mosquitos que sejam eficazes e mantenham a segurança humana é uma preocupação atual. Assim, o uso de produtos naturais baseados em plantas tem recebido destaque para estes fins. Assim, produtos baseados em extratos de plantas e óleos essenciais podem ser utilizados como uma alternativa aos larvicidas comerciais (CHELLAPPANDIAN et al., 2018). Esses produtos naturais são compostos promissores devido à alta eficácia e forte atividade larvicida contra larvas de mosquitos do gênero *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (GALVÃO et al., 2018; PAVELA et al., 2019).

As plantas produzem compostos bioativos que atuam como defensivos químicos, que são: acetogeninas, alcalóides, alcanoides, antraquinonas, cumarinas, esteróides,

fenólico, flavonoides, limonóides, poliacetilenos, tiofenos, terpenóides, xantonas e óleos essenciais. Esses compostos são biodegradáveis e desempenham diversas atividades biológicas. As plantas avaliadas quanto à sua eficácia larvicida contra mosquitos vetores, dividem-se principalmente entre as famílias *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Fabaceae* e *Rutaceae* (CHELLAPPANDIAN et al., 2018; PAVELA et al., 2019).

Os óleos essenciais são gerados a partir de misturas de fitoquímicos, geralmente com mais de 60 compostos, podendo ser extraídos de flores, sementes, raízes, cascas e folhas, por exemplo (CHELLAPPANDIAN et al., 2018). Podem ser citados alguns exemplos de óleos extraídos das partes das plantas: das folhas e galhos podem ser extraídos eugenol (CAVALCANTI et al., 2004) e timol (CAVALCANTI et al., 2004), e das partes aéreas podem ser extraídos α -pineno (GIATROPOULOS et al., 2013) e metil eugenol (GBOLADE; LOCKWOOD, 2007). Das cascas das frutas podem ser extraídos limoneno (CAVALCANTI et al., 2004) e geraniol (CAVALCANTI et al., 2004); das raízes podem ser extraídos geraniol (LIU et al., 2013), e, das frutas pode ser extraído o linalol (BENELLI et al., 2013).

Apesar do potencial destes compostos, sua aplicação comercial ainda é limitada devido a necessidade de estudos direcionados na validação da eficácia no campo (PAVELA et al., 2019), bem como de sua análise toxicológica em organismos não-alvo (PIPLANI et al., 2019). Outros desafios são a produção em massa de óleos essenciais, a otimização do processo de extração, o rendimento deste processo, composição química dos óleos, que pode variar conforme época do ano, e, composição do solo e organismos presentes no meio (CHELLAPPANDIAN et al., 2018). Assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que os testes com larvicidas se iniciem em laboratório, seguido de testes em campo considerando os efeitos em organismos não-alvo, a eficácia dos larvicidas e seus efeitos em diferentes ambientes (WHO, 2005).

Alguns estudos abordaram óleos essenciais como agente larvicida de vetores de arboviroses e consideraram sua eficácia baseados em sua LC_{50} . Se $LC_{50} < 50$ mg/L, o larvicida é ativo, se 50 mg/L $< LC_{50} < 100$ mg/L, o larvicida é moderadamente ativo, se 100 mg/L $< LC_{50} < 750$ mg/L, o larvicida é efetivo e se $LC_{50} > 750$ mg/L, o larvicida é inativo (KOMALAMISRA et al., 2005).

DIAS; MORAES (2014) analisaram os trabalhos reportados na literatura que utilizaram óleos essenciais como agentes larvicidas. Dos 361 óleos estudados, 60% foram considerados ativo ($LC_{50} < 100$ mg/L) (LC_{50} definida por CHENG et al., 2003), principalmente os óleos extraídos da família *Myrtaceae*. Dentre os constituintes dos óleos essenciais o δ -3-careno, limoneno, α -felandreno, β -pineno, α -terpineno, terpinoleno,

ascaridol, *cis*-carveol, (*E*)-nerolidol, metil cinamato e estragole, por exemplo, apresentaram $LC_{50} < 50$ mg/L.

Cheng et al. (2009) estudaram a atividade larvica de óleos essenciais a partir de eucalipto (*Eucalyptus camaldensis* e *Eucalyptus urophylla*) contra *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. O óleo extraído das folhas de *E. camaldensis* mostrou excelente atividade larvica contra ambas as espécies, com LC_{50} de 31 e 55,3 mg/L para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente. Os componentes individuais do óleo essencial de *E. camaldensis* também mostraram atividade larvica, sendo α -terpineno o melhor composto, com LC_{50} de 14,7 mg/L e 25,2 mg/L para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente.

Maheswaran; Ignacimuthu (2012) utilizaram uma formulação a base de óleo essencial de *Azadirachta indica* e *Pongamia glabra* em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Essa formulação apresentou atividade larvica (100% de mortalidade) em ambas as espécies de mosquitos em concentrações de 0,1 mg/L mesmo após 12 meses da fabricação em condições com e sem luz solar. Al-mekhlafi et al. (2021) estudaram larvicidas combinando os extratos de *F. vulgare* e *M. chamomilla* em *Cx. pipens*. Em relação a sua atividade larvica, a mortalidade variou entre 13,33% e 93,33% em doses de 31,35 mg/L a 250 mg/L, sendo a LC_{50} e a LC_{90} de 148,3 mg/L e 242,17 mg/L, respectivamente. Alguns estudos utilizando extratos vegetais como agentes larvicidas podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Estudos sobre potenciais larvicidas baseados em extratos de plantas.

Planta utilizada	Mosquito vetor	LC_{50} (mg/L)	Referência
<i>Aspergillus</i> sp. Extraído de <i>Bertholletia excelsa</i>	<i>Ae. Aegypti</i>	26,86	(ARAÚJO et al., 2022)
<i>Xylopia aromatica</i>		12,10	
<i>Myrcia dictyophylla</i> <i>Campomanesia</i> <i>adamantium</i>	<i>Ae. Aegypti</i>	17,60 18,00	(SILVA et al., 2022)
<i>Machaerium</i> <i>acutifolium</i>	<i>Ae. Aegypti</i>	205,39	(MELO et al., 2021)

<i>Argemone mexicana</i>	<i>Cx. Quinquefasciatus</i>	18,61	(GRANADOS- ECHEGOYEN et al., 2019)
<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Ae. Aegypti</i>	43,22	(INTIRACH et al., 2019)
	<i>Ae. Aegypti</i>	34,22	
	<i>Ae. Albopictus</i>	45,55	
<i>Galinsoga parviflora</i>	<i>An. Stephensi</i>	31,04	(GOVINDARAJAN et al., 2018)
	<i>Anopheles subpictus</i>	40,97	
	<i>Cx. Quinquefasciatus</i>	37,10	
	<i>Cx. Tritaniorhynchus</i>	49,56	
<i>Trachuspermum ammi</i>		17,60*	
<i>Smyrniolum olusatrum</i>		17,50*	
<i>Pimpinella anisum</i>		25,90*	
<i>Helosciadium nodiflorum</i>		20,60*	
<i>T. ammi</i> + <i>S. olusatrum</i> (2:1)	<i>Cx. Quinquefasciatus</i>	29,40*	(BENELLI et al., 2017)
<i>T. ammi</i> + <i>P. anisum</i> (1:2)		15,20*	
<i>S. olusatrum</i> + <i>P. anisum</i> (1:1)		16,90*	
<i>Zanthoxylum</i>	<i>Cx. Pipens</i>	5,91	
<i>piperitum</i>	<i>Ae. Aegypti</i>	3,95	(KIM; AHN, 2017)
<i>Bunium persicum</i>	<i>An. Stephensi</i>	27,72	(SANEI- DEHKORDI; VATANDOOST; ABAEI, 2016)
	<i>Cx. Pipens</i>	20,61	
	<i>Ae. Aegypti</i>	169,49	(SUSITRA
<i>Clausena dentata</i>	<i>An. Stephensi</i>	45,68	MANJARI et al.,
	<i>Cx. Quinquefasciatus</i>	150,27	2014)

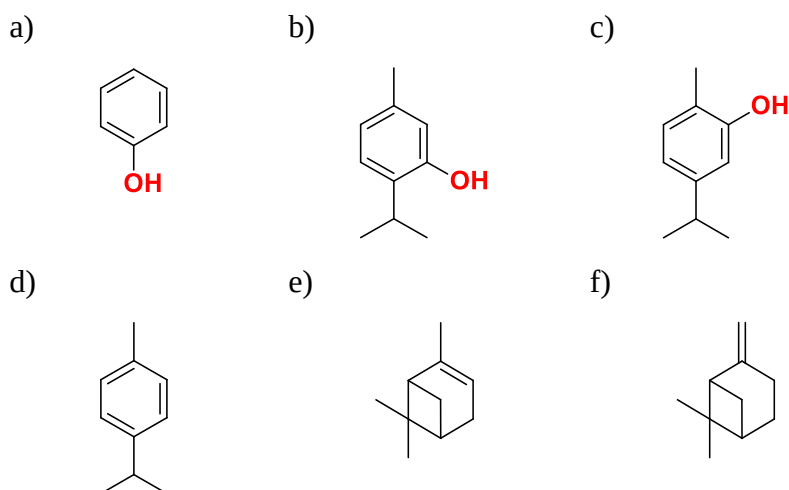
*LC₅₀ representado na concentração de µg/L

Entender a relação entre a eficácia dos óleos essenciais e sua ação larvicida é complexo. Mas, alguns autores buscam relacionar essa função com as estruturas dos

compostos. Por exemplo, o fenol, o timol e o carvacrol (Figura 6) apresentaram LC_{50} de 194 mg/L, 81 mg/L e 69 mg/L, respectivamente, para o *Ae. aegypti*. Assim, anéis aromáticos tem a tendência a apresentar ação larvicida, mas a presença de aldeídos, metil e ésteres podem aumentar a atividade do composto (SANTOS et al., 2010). Além disso, a presença de –OH nas estruturas dos compostos podem reduzir sua ação larvicida, visto que o p-cimeno (Figura 6) apresenta LC_{50} de 51 mg/L para o *Ae. aegypti* (SANTOS et al., 2010), indicando maior ação larvicida que o fenol, timol e carvacrol.

As ligações duplas exocíclicas também foram reportadas como importantes na ação larvicida. O β -pineno (Figura 6), que possui ligação dupla externa ao ciclo, apresentou maior toxicidade que o α -pineno (Figura 6) para as espécies de *Ae. aegypti*, *Cx. pipiens* e *Ochlerotatus togoi*, considerando os valores de LC_{50} (PERUMALSAMY; KIM; AHN, 2009). Longas cadeias alquílicas, como o ácido oleico e linoleico foram reportadas como agentes larvicidas em *Ae. aegypti*, *An. stephensi*, *Cx. quinquefasciatus*, cuja LC_{50} foi de 9,79 mg/L, 8,80 mg/L e 7,66 mg/L, respectivamente para o ácido oleico e de 11,49 mg/L, 18,20 mg/L e 27,24 mg/L, respectivamente para o ácido linoleico (RAHUMAN; VENKATESAN; GOPALAKRISHNAN, 2008).

Figura 6: Estrutura química dos componentes de óleos essenciais utilizados como agentes larvicidas: a) fenol; b) timol; c) carvacrol; d) p-cimeno; e) α -pineno; f) β -pineno.



Em relação ao seu modo de ação, os larvicidas naturais podem atuar na desnaturação de proteínas, inibição enzimática e desintegração da membrana. Os larvicidas podem ser absorvidos pelo trato digestivo ou sistema respiratório, bem como atuar em hormônios dos animais inibindo seu desenvolvimento. A lipofilicidade pode estar associado ao seu modo de ação, pois podem penetrar e romper membranas celulares.

Outro fator é difusão desses compostos pelos tecidos do animal, causando efeitos sistêmicos (SOUZA et al., 2012; DIAS; MORAES, 2014). A ação neurotóxica também foi reportada, cujos larvicidas podem causar excitação, convulsão, hiperatividade e paralisia (ISMAN, 2006).

2.4.4.4 Larvicidas biológicos

2.4.4.4.1 Predadores de larvas de mosquitos

O controle biológico aborda o uso de predadores ou patógenos para parasitar, competir ou reduzir a população vetorial (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019), como uma alternativa aos produtos químicos sintéticos, cujos insetos já tenham se tornado resistentes (DAMBACH, 2020).

O uso de predadores aquáticos naturais, como peixes, anfíbios, insetos e crustáceos tem sido reportado, dependendo de sua preferência por habitat, abundância e dificuldade de estabilizar as populações. Os peixes são os predadores mais reportados, principalmente do gênero *Gambusia* e *Poecilia*. Apesar de seu uso, deve-se ter atenção ao seu comportamento alimentar agressivo, altas taxas de crescimento e alimentação de outros animais pequenos e aquáticos, além de larvas de mosquitos (DAMBACH, 2020).

As espécies *Danio rerio* e *Oryzias melastigma* também têm sido utilizadas na redução de larvas e pupas de mosquitos após duas semanas de sua introdução no ambiente (CHANDRA et al., 2008a). O peixe larvívoros *Oreochromis niloticus*, por exemplo, foi utilizado na redução de mosquitos *Anopheles* em lagoas tratadas no Quênia, após 15 semanas da introdução do predador (HOWARD; ZHOU; OMLIN, 2007).

Em relação aos anfíbios, as ordens Anura e Caudata recebem destaque no controle de larvas (DAMBACH, 2020). Nos EUA, as larvas da salamandra *Ambystoma maculatum* podem preda as larvas de mosquitos *Culex* e os girinos da rã *Lithobates sylvaticus* podem competir com as larvas de mosquitos *Culex* pelos recursos alimentares (RUBBO et al., 2011). O anfíbio *Notophthalmus viridescens* e as larvas de salamandra *Ambystoma talpoideum* também foram testadas no consumo de larvas de mosquitos *Culex*, que foi de 439 mosquitos/dia e 316 mosquitos/dia (DURANT; HOPKINS, 2008). A rã *Hoplobatrachus tigerinus* também foi reportada no controle de *Aedes* (MURUGAN et al., 2015), e larvas de mosquito Culidae também foram controladas por girinos *Phyllodytes luteolus* (SALINAS et al., 2018).

Os crustáceos podem ser copépode e notostraca. Os copépodos são pequenos crustáceos aquáticos (alguns milímetros) que podem atacar animais com até o dobro de seu tamanho. As espécies não parasitárias podem se alimentar de larvas de mosquitos,

como os da família Cyclopidae (*Cyclops*, *Megacyclops* e *Mesocyclops*). Além disso, esses organismos podem habitar diversos habitats de água doce ou salgada, áreas rasas e com vegetação densa. Essas espécies também podem resistir a variações de temperatura da água (0-43 °C). Notostraca são pequenos crustáceos (< 10 cm) que podem reduzir larvas de mosquitos. No entanto, essas espécies podem ser consideradas pragas em alguns campos de cultivo de arroz (DAMBACH, 2020).

Os insetos também podem atuar como agente larvicidas. As larvas de mosquitos do gênero *Toxorchynchites* (Culicidae) podem preda mosquitos *Aedes* (FOCKS, 2007), sendo que essas espécies podem consumir de 300 a 5000 larvas durante seu desenvolvimento (DAMBACH, 2020). No caso da ordem Hemiptera há a predação de larvas de mosquitos *Diplonychus* spp. (SHAALAN et al., 2007) e *Sphaerodema annulatum* (ADITYA et al., 2004), já a ordem Coleoptera há predação das larvas *Acilius sulcatus* (CHANDRA et al., 2008b) e *Rhantus* spp. (OHBA; TAKAGI, 2010). As libélulas (Odonata) são insetos voadores, cujas ninfa predadoras de mosquitos (*Aedes*, *Anopheles* e *Culex*) podem existir em na maioria dos criadouros, como piscinas abertas e córregos (DAMBACH, 2020).

2.4.4.4.2 Larvicidas bacterianos

Outro método promissor é o uso de bactérias, como exemplo, *Bacillus thuringiensis israelenses* (*Bti*) e *Bacillus (Lysinibacillus) sphaericus* (*Bs*), que são larvicidas microbianos, eficazes e seguros para organismos não-alvo (ZHOU et al., 2020). *Bti* e *Bs* vem sendo utilizados desde 1980 como agentes biológicos contra larvas de mosquitos e moscas, como alternativa ao temefós, devido a sua atual resistência em alguns mosquitos *Aedes* e legislação proibitiva em alguns países europeus quanto ao temefós (MARCOMBE et al., 2011; SILVA-FILHA et al., 2021).

Essas bactérias são Gram-positivas aeróbias e esporulantes (SILVA-FILHA et al., 2021). Elas agem inibindo a digestão dos alimentos das larvas, e, como consequência, seu crescimento, agindo de forma seletiva como larvicida contra Diptera, incluindo mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Simulium* (ZHOU et al., 2020; SILVA-FILHA et al., 2021). De modo geral, essas bactérias geram protoxinas durante a esporulação, que agem nas células epiteliais do intestino médio das larvas após a ingestão, ligando-se em receptores da membrana celular e formando poros (SILVA-FILHA et al., 2021).

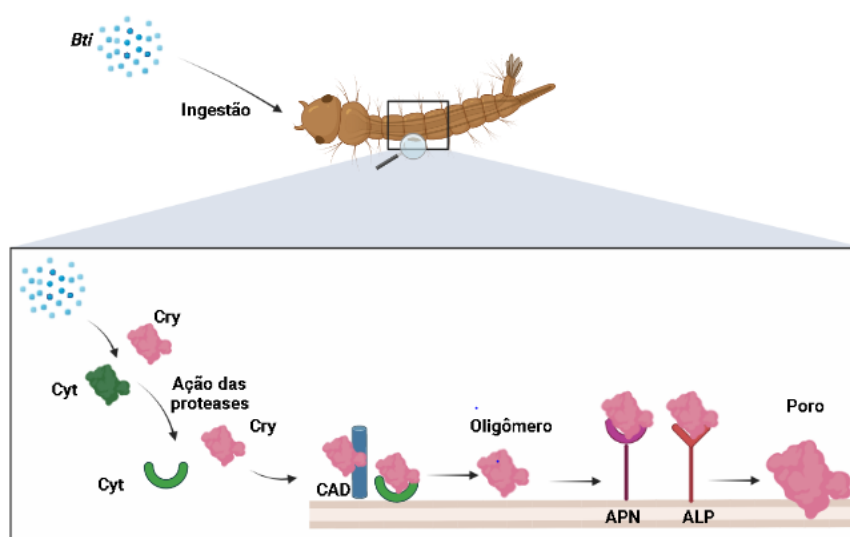
O esporo da *Bti* é seletivo para larvas das espécies Culicidae, Simuliidae e Chironomidae, agindo de forma eficiente e sem registros de resistência até o momento (SILVA-FILHA et al., 2021). A *Bti* produz dois tipos de proteínas, a Cry e a Cyt

(DAHMANA; MEDIANNIKOV, 2020), sendo que as principais protoxinas são Cry4Aa, Cry4Bb, Cry11Aa e Cyt1Aa (SILVA-FILHA et al., 2021).

A ação desses larvicidas começa com a sua ingestão, seguido de sua solubilização no intestino das larvas, ativação das protoxinas pelas proteases do intestino, e, por fim, formação de poros nas células do intestino, que irão destruir as células do seu epitélio. As toxinas de Cry necessitam de receptores para poderem agir, enquanto Cyt liga-se diretamente a membrana da célula. Após a ingestão, Cry liga-se a proteínas glicosifosfatidilinositol, sendo inicialmente a caderina (CAD), que é uma proteína de maior afinidade à toxina, causando a formação de oligômeros. Essa etapa de Cry-CAD é necessária para seu efeito tóxico, exceto para a toxina Cry4Bb, que pode oligomerizar após a ativação com proteases. Além disso, a Cyt1Aa também irá agir como um receptor adicional de Cry. Assim, Cry liga-se aos receptores da membrana, aminopeptidases (APN) e fosfatases alcalina (ALP), causando a interação entre membrana e oligômeros, formação de poros, e, como consequência morte das larvas, conforme Figura 7 (SILVA-FILHA et al., 2021).

Diferente de Cry, a Cyt age de forma inespecífica, não ligando-se a receptores, mas sim diretamente com os lipídios da membrana, destruindo a membrana celular e causando a lise da célula. Cry e Cyt atuam de forma sinérgica como agentes larvicidas, o que pode contribuir para a ausência de toxicidade de *Bti*. O modo de ação de Cyt mais convencional é formação de poros após a oligomerização de Cyt através do seu contato com a membrana (COHEN et al., 2011).

Figura 7: Representação do mecanismo de toxicidade causada pelas protoxinas de *Bacillus thuringiensis israelenses* (Cry e Cyt) em larvas de mosquitos.



Fonte: Adaptado de SILVA-FILHA et al. (2021).

Para a Bs, seu principal agente larvicida, seletivo para as larvas *Culicidae* se dá principalmente pela formação da protoxina binária (Bin). Bin é uma proteína constituída de BinA e BinB, que se combinam em um heterodímero e atuam de modo sinérgico para gerar efeito tóxico. Assim como o caso de Cry e Cyt, Bin precisa ser ingerido pela larva e solubilizado no intestino para se tornar ativo. Porém, sua atividade larvicida é muito específica, dependendo de uma ligação de alta afinidade com o receptor α -glicosidades, que varia conforme a espécie (Cpm1 para *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, Agm3 para *An. gambiae* e Aam1 para *Ae. aegypti*). Esses genes estão ancorados na proteína glicosifosfatidilinositol e sua expressão irá conferir a toxicidade de Bin. As células do intestino têm perda de microvilosidade, inchaço mitocondrial, danos a membrana, vacuolização e quebra de retículo endoplasmático (TANGSONGCHAROEN et al., 2015; SILVA-FILHA et al., 2021).

Saccharopolyspora spinosa é uma bactéria que vive no solo e tem sido utilizada no controle de vetores através do larvicida Spinosad. Esse composto é formado por dois fatores inseticidas (Spinosyn A – $C_{41}H_{65}NO_{10}$ e Spinosyn B – $C_{42}H_{67}NO_{10}$), como uma nova classe de inseticidas policetídeos-macrólidos. Spinosad atua nos receptores nicotínicos de acetilcolina, sendo ativo no controle de diversas pragas, incluindo mosquitos (DAHMANA; MEDIANNIKOV, 2020). Esse composto vem sendo utilizado como larvicida no controle de mosquitos em recipientes de água potável. Spinosad DT, que é a mistura dos compostos A e B, na concentração de 7,48 % tem sido usado no combate de *Ae. aegypti* em fontes de água potável, de acordo com a OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O modo de ação de Spinosad é único, com alta taxa de atividade para organismos-alvo e baixa toxicidade em organismos não-alvos (THOMPSON; SPARKS, 2002). Seu mecanismo envolve a ruptura de ambos os receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina e dos canais iônicos controlados pelo ácido γ -aminobutírico (GABA), causando excitação do sistema nervoso, contrações musculares e paralisia (THOMPSON; SPARKS, 2002; MARCOMBE et al., 2011).

Assim, Spinosad excita o sistema nervoso do organismo, interrompendo atividade neural por excitar os neurônios motores, causando contrações involuntárias, paralisia, e, por fim, a morte. Spinosyn liga-se a um receptor no canal de cloreto glutamato de modo semelhante a ivermectina, apesar do mecanismo de Spinosad não ser bem definido ainda. Além disso, sabe-se que Spinosyn atua nos receptores nicotínicos acetilcolina (nAChR), que é seletivo de cátions, sendo a ativação deste receptor o início da cascata de eventos causando a morte do organismo (BACCI et al., 2016)

Alguns estudos buscaram comparar os resultados dos larvicidas químicos com os não-químicos. Por exemplo, Spinosad, *Bti* e temefós foram usados no controle de *An. albimanus*, *Culex* spp. e *Uranotaenia lowii* em piscinas temporárias no sul do México (MARINA et al., 2014). Spinosad, seguido de temefós foram os larvicidas mais eficazes, enquanto *Bti* não apresentou resultados consistentes ou significativos na redução das larvas dessas espécies. Esses larvicidas também foram analisados quanto aos efeitos em organismos não-alvo. Spinosad e temefós afetaram severamente insetos Coleoptera, Hemiptera e Odonata, e *Bti* mostrou pouco efeitos nesses organismos.

Marcombe et al. (2011) estudaram a resistência de mosquitos *Ae. aegypti* na região de Matinica (França) a *Bti*, temefós, piriproxifeno e spinosad. Os mosquitos foram resistentes a temefós, tolerantes ao piriproxifeno e suscetíveis a *Bti* e spinosad. As toxinas *Bti* possuem estruturas complexas, que podem retardar sua resistência aos organismos-alvo, enquanto spinosad atua em dois receptores pós-sinápticos, dificultando o aparecimento de resistência em relação aos métodos clássicos.

2.4.4.5 Larvicidas mecânicos

O controle mecânico inclui práticas para eliminar vetores e criadores, assim como a redução do contato entre mosquito e homem, sendo o uso de telas o principal exemplo (ZARA et al., 2016). As armadilhas fazem parte dos métodos mecânicos de controle e que auxiliam na pesquisa, identificação e controle dos mosquitos. É importante ressaltar a importância das ferramentas de controle de criadouros, eficazes em diminuir a reprodução dos mosquitos em recipientes artificiais. Esta estratégia é baseada na remoção ou viragem de recipientes de água temporários e cobertura de recipientes de água permanentes (BALDACCHINO et al., 2015)

2.5 Novas tecnologias para larvicidas

Os métodos convencionais de aplicação de pesticidas, envolvendo químicos sintéticos com aplicações constantes tornou-se uma ameaça ao ambiente devido a sua persistência e acúmulo de compostos tóxicos não biodegradáveis no ambiente. Dessa forma, a busca por compostos mais naturais, biodegradáveis, ou que causem menor impacto no ambiente é necessária (BHAN; MOHAN; SRIVASTAVA, 2014).

Assim, o uso de nanotecnologia para o controle de mosquitos tem sido reportado. Essa tecnologia explora as propriedades únicas que os materiais com tamanho nanométrico têm a oferecer, considerando características físicas, químicas e biológicas.

Esses materiais possuem tamanho na faixa de nanômetros e apresentam grande área superficial em relação ao seu volume, conferindo maior reatividade aos sistemas do que se comparado as partículas maiores (FOLDBJERG et al., 2015; JOSHUA ASHAOLU, 2021).

As vantagens dessas tecnologias consistem numa produção rápida e barata, com maior estabilidade, baixa demanda de pressão, energia e temperatura (RONI et al., 2015). Esses materiais nano podem ser nanopartículas metálicas, nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsões e nanogéis (KONAPPA et al., 2021).

Esses materiais podem ser utilizados para a encapsulação de ativos em sistemas de liberação controlada como uma tecnologia atrativa, devido a proteção do composto em uma matriz, aumento da eficácia do ativo, redução de aplicações, alta especificidade, melhor penetrabilidade e estabilidade. Dessa forma, o agente larvicida fica retido em uma matriz, que permite a liberação lenta do ativo com melhor absorção do composto pelo organismo-alvo (BHAN; MOHAN; SRIVASTAVA, 2014; KONAPPA et al., 2021).

2.5.1 Nanopartículas metálicas

Diversos materiais a base de plantas têm sido utilizados para fins de produção de nanopartículas metálicas, com benefícios de custo, pouca requisição de energia e produtos químicos altamente tóxicos (BENELLI; CASELLI; CANALE, 2017).

Arasu et al. (2019) estudaram nanopartículas de óxido de ferro (FeONP) e óxido de manganês (MnNP) utilizando extrato de *Acorus calamus* como larvicidas de *Cx. quinquefasciatus*. MnNP apresentou mortalidade variando de 35% a 100% conforme variação de concentração das nanopartículas de 5 mg/L a 80 mg/L, sendo que 100% de mortalidade foi alcançada em apenas 20 mg/L de MnNP. Já FeONP apresentou um máximo de 10% de mortalidade em concentrações de 80 mg/L.

Hajra; Dutta; Mondal (2016) produziram nanopartículas de cádmio (CdNP) a partir de extrato de calêndula (*Tagetes erecta*) e rosa (*Rosa* sp.) como agentes larvicidas de *Ae. albopictus*. A mortalidade das larvas foi de 43,5% com 10 mg/L de nanopartículas (CdNP-rosa) e de 68,9% na mesma concentração de CdNP de calêndula.

Roni et al. (2015) desenvolveram nanopartículas de prata (AgNP) a partir de extrato de alga (*Hypnea musciformis*), que é um material barato, atóxico e ecologicamente correto. As AgNPs se mostraram tóxicas para larvas e pupas dos mosquitos *Ae. aegypti* e para a praga de repolho *P. xylostella*. Para o mosquito a LC₅₀ foi de 18,14-27,99 mg/L e 30,79 mg/L para larvas e pupa, respectivamente, enquanto, para a praga de repolho esse

valor foi de 24,51 mg/L e 38,23 mg/L, respectivamente, para larvas e pupa. As AgNPs também afetaram a longevidade e fecundidade de ambas as espécies.

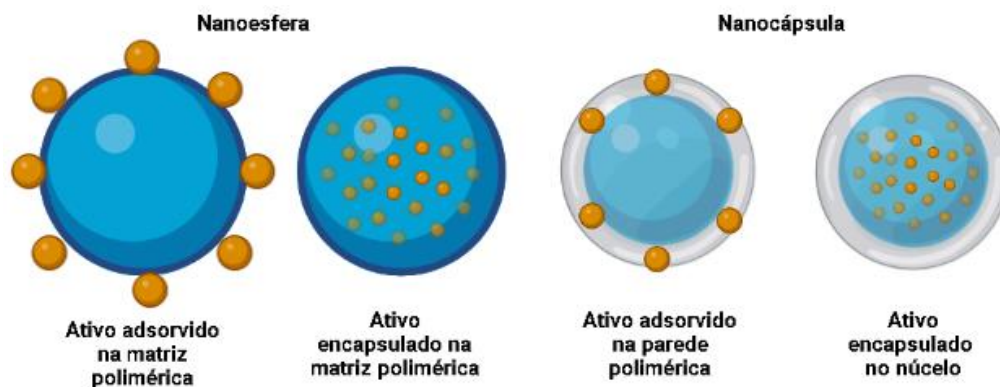
Ainda não foi esclarecido os mecanismos de atividade larvicida que levam a morte de pupas e larvas de mosquitos. Acredita-se que essa toxicidade pode estar relacionada à penetração dessas partículas no exoesqueleto dos organismos, que ao penetrar no espaço intracelular pode interagir com o DNA, causar desnaturação de organelas e enzimas, alterar a permeabilidade da membrana, e perda de função celular (BENELLI; CASELLI; CANALE, 2017). HAJRA; DUTTA; MONDAL (2016), por exemplo, realizaram microscopias que comprovam que CdNPs podem aderir no corpo de larvas de mosquitos, embora não tenham estudado o mecanismo de toxicidade.

2.5.2 Nanocápsulas e nanoesferas

As nanopartículas são utilizadas para melhorar a biodisponibilidade de diversos ativos com baixa ou nenhuma solubilidade em água, melhorando a eficácia do ativo, sua especificidade, estabilidade, proteção do ativo, penetração intracelular e reduzindo a quantidade de aplicações. Essas características dependem do sistema polimérico escolhido, tamanho da partícula, carga superficial e hidrofobicidade do sistema. O tamanho das partículas irá influenciar em quais barreiras biológicas o material pode penetrar, dependendo do tecido e local-alvo, enquanto a carga influencia na interação do sistema com as células (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

As nanopartículas funcionam como reservatórios de ativos, que podem ser divididas em nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas são formadas por um núcleo, onde o ativo pode estar encapsulado, cercado por uma casca polimérica, onde o ativo pode estar adsorvido. Já as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica que pode encapsular o ativo ou este pode estar adsorvido em sua superfície, conforme uso de surfactante e características anfifílica (ZIELÍ NSKA et al., 2020), conforme pode-se observar na Figura 8.

Figura 8: Representação das nanopartículas: nanocápsulas e nanoesferas, com ativos encapsulados ou adsorvidos.

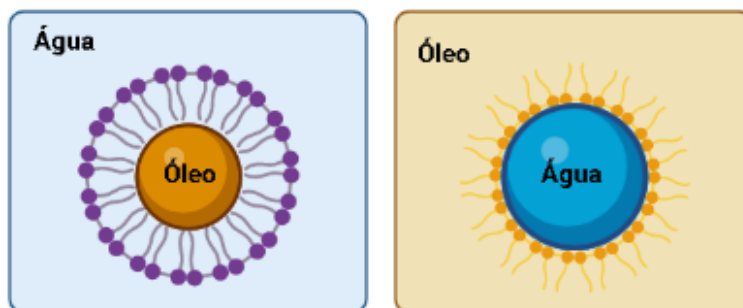


BHAN; MOHAN; SRIVASTAVA (2014) encapsularam os larvicidas temefós e imidaclopride em nanopartículas de polietilenoglicol (PEG), que foram usados contra as larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Os larvicidas não encapsulados apresentaram LC_{50} de 0,006 mg/L e 0,027 mg/L para temefós e imidaclopride, respectivamente. Temefós encapsulado apresentou LC_{50} de 2,304 mg/L, 0,592 mg/L, 0,495 mg/L e 0,164 mg/L, em formulações com 1%, 2%, 4% e 8% de temefós, respectivamente. Imidaclopride encapsulado apresentou LC_{50} de 21,376 mg/L, 4,642 mg/L, 1,220 mg/L e 1,357 mg/L, em formulações com 1%, 2%, 4% e 8% de imidaclopride, respectivamente.

2.5.3 Nanoemulsões

Nanoemulsões são produzidas através de diversos aditivos, que podem influenciar em aparência, textura, fortificação e estabilidade. Esses sistemas são formados por água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), cujos tamanhos de gotículas variam de inferior a 100 nm (Figura 9). Esses líquidos são imiscíveis, sendo emulsionados por um surfactante ou co-surfactante para formar suspensões estáveis. Nesse caso, a estabilidade cinética ocorre quando o movimento browniano das nanopartículas é maior do que a força gravitacional da emulsão (JOSHUA ASHAOLU, 2021).

Figura 9: Nanoemulsões formadas por gotículas de óleo em água e água em óleo



2.5.4 Nanogéis

Nanogéis são materiais tridimensionais (3D), com estrutura *core-shell*, biocompatíveis, formados por uma rede polimérica hidrofílica expansível, capaz de reter água sem se dissolver no meio, cujas características dos sistemas (tamanho, carga, porosidade, anfifilicidade e degradabilidade) irão variar conforme a composição química dos nanogéis. Esses materiais além de proteger os ativos encapsulados, também participam do processo de liberação controlada, já que são responsivos a estímulos. Nanogéis são versáteis e podem encapsular macromoléculas (SONI; DESALE; BRONICH, 2016).

Alguns trabalhos desenvolvidos através de nanotecnologia para fins de controle de mosquitos transmissores de arboviroses, neste caso, agentes larvicidas, podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Dados de biotoxicidade de novos materiais para controle de mosquitos transmissores de arboviroses.

Material	Características do material	Ativo encapsulado	Organismo	LC ₅₀ /EC ₅₀ (mg/L)	Referência
Nanopartículas metálicas					
FeNP <i>Cassia auriculata</i>	Partícula esférica, monodispersa e com tamanho de 15 a 35 nm	—	<i>Ae. aegypti</i>	63,56	(SUDHAKAR et al., 2022)

FeONP <i>Acorus calamus</i>	Aglomerados esféricos de 20 a 30 nm	—	Cx. <i>quinquefasciatus</i>	10,00*	(ARASU et al., 2019)
MnNP <i>Acorus calamus</i>	-			100,00*	
AgNP <i>Annona reticulata</i>	Partículas esféricas com tamanho de 8 nm	—	<i>Ae. aegypti</i>	4,43	(PARTHIBAN et al., 2019)
CdNP <i>Rosa sp.</i>	Partículas	—	<i>Ae. albopictus</i>	45,70*	(HAJRA; DUTTA; MONDAL, 2016)
CdNP <i>Tagetes erecta</i>	esféricas			43,50*	
AgNP <i>Hybanthus enneaspermus</i>	Partículas esféricas com tamanho de 25,2 nm	—	<i>An. subpictus</i> Cx. <i>quinquefasciatus</i>	17,24 13,12	(SUMAN et al., 2016)
AgNP <i>Morinda tinctoria</i>	Partículas esféricas com tamanho de 60 a 95 nm	—	Cx. <i>quinquefasciatus</i>	8,08	(KUMAR et al., 2015)
				18,14 (larva)	
AgNP <i>H. musciformis</i>	Partículas esféricas com tamanho de 40 a 65 nm	—	<i>Ae. aegypti</i> <i>Plutella xylostella</i>	30,79 (pupa) 24,51 (larva) 38,23 (pupa)	(RONI et al., 2015)
AuNP <i>Aspergillus niger</i>	Tamanho de 10 a 30 nm	—	<i>Ae. aegypti</i> <i>An. stephensi</i>	24,00 1,69	(PRAKASH; SONI, 2012)
Nanopartículas poliméricas					
Eudragit L100	Tamanho de	<i>Piper spp.</i>	<i>Ae. aegypti</i>	35,37	(DE OLIVEIRA et al., 2022)

	187 nm, PDI de 0,116				
CS/TPP	Partículas com 160 nm	<i>T. ammi</i>		13,67	(ZARENEZHAD et al., 2022)
	Partículas com 158 nm	<i>Laurus nobilis</i>	<i>An. stephensi</i>	26,51	
Zeína NP	Partículas com 381,6 nm e PDI 0,057	Ácido Anacárdico	<i>Ae. aegypti</i>	11,70**	(PINTO et al., 2021)
Pectina	Partículas esféricas de 40 a 80 nm eficiência de encapsulação de 60%	<i>Cedrus deodara</i>	<i>Anopheles culicifacies</i>	70,00*	(KALA et al., 2020)
CS/TPP	Partículas com 8 nm e 80 nm	—	<i>Ae. aegypti</i>	66,42	(ANAND et al., 2018)
CS	Tamanho de 438 nm, PDI 0,358, eficiência de encapsulação de 38%	<i>Geranium maculatum</i>		22,63	
PEG	Tamanho de 253 nm, PDI 0,268, eficiência de encapsulação de 77%		<i>Cx. pipiens</i>	35,64	(GONZÁLEZ et al., 2017)
CS	Tamanho de 535 nm, PDI 0,379, eficiência de encapsulação de 22%	<i>Citrus bergamia</i>		38,52	

PEG	Tamanho de 239 nm, PDI 0,198, eficiência de encapsulação de 68%			72,24	
PEG	Partículas com tamanho de 129,5 nm (8% de ativo)	Temefós	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0,16	(BHAN; MOHAN; SRIVASTAVA, 2014)
	-	Imidaclopride		1,22	
Nanoemulsões					
Policaprolactona-triol	Partículas com tamanho de 129,5 nm e PDI de 0,197	<i>Piper spp.</i>	<i>Ae. aegypti</i>	21,26	(DE OLIVEIRA et al., 2022)
<i>Artemisia dracunculus</i>	Partículas com 152 nm	–	<i>An. stephensi</i>	13,53	(OSANLOO et al., 2022)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Partículas com tamanho de 200 a 400 nm	–	<i>An. stephensi</i>	37,00	(FIROOZIYAN et al., 2021)
<i>Carlina acaulis</i> – óleo essencial	Distribuição monomodal	–	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0,76	(PAVELA et al., 2021)
Óxido de carlina	com tamanho de 140-145 nm			0,89	
<i>Ricinus communis</i>	Partículas de 114 nm	–	<i>An. culicifacies</i>	8,90	(SOGAN et al., 2018)
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Partículas esféricas de 200 nm	–	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	36,53 (2º instar) 38,89 (3º instar)	(SUNDARARAJAN et al., 2018)
<i>Baccharis reticularia</i>	Tamanho de 92,9 nm, PDI 0,412,	–	<i>Ae. aegypti</i>	221,27	(DA BOTAS et al., 2017)

D-Limoneno	Potencial zeta de -20,4 mV				
	Tamanho de 136 nm, PDI 0,728, Potencial zeta de -15,4 mV			91,25	
<i>Azadirachta indica</i>	Tamanho de 31,03 nm, PDI de 0,262			11,75	
	Tamanho de 93 nm, PDI de 0,364	—	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	25,99	(ANJALI et al., 2012)
	Tamanho de 251 nm, PDI de 0,211			62,89	
Nanogéis					
Carboximetilcelulose	Partículas com 152 nm	<i>Artemisia dracunculus</i>	<i>An. stephensi</i>	6,68	(OSANLOO et al., 2022)

*Dado de mortalidade (%), 24 h.

**LC₅₀ em µg/L.

NP, nanopartícula

CS, *chitosan* (quitosana)

TPP, *sodium tripolyphosphate* (tripolifosfato de sódio)

PEG, polietilenoglicol

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora existam larvicidas sintéticos com boa performance contra larvas de mosquitos transmissores de arboviroses, o risco de resistência dos insetos a esses compostos sintéticos, assim como os riscos ambientais que algumas classes de pesticidas apresentam, sugerem a necessidade de buscar novos mecanismos de controle de mosquitos vetores. O uso de compostos botânicos assim como controle biológico surge como alternativas eficazes, aliado a isso a nanotecnologia ganha destaque, por ser capaz

de formar um novo material com propriedades diferentes, melhorando perfil de biodisponibilidade, solubilidade, estabilidade, proteção contra degradação dos ativos, liberação controlada e assim possível redução da toxicidade. Desse modo, nanomateriais podem ser desenvolvidos unindo diferentes mecanismos de controle, encapsulando ativos naturais, sintéticos e suas combinações, assim como também é possível realizar encapsulamentos de microorganismo auxiliando a atividade do controle biológico. A nanoencapsulação de compostos químicos torna-se uma alternativa para a redução da concentração e aplicação desses compostos. Sistemas baseados em produtos biodegradáveis é uma proposta ecologicamente interessante, ainda assim seus impactos devem ser avaliados, contudo, sistemas nanoestruturados, mesmo que formulados a partir de compostos biodegradáveis, devem ser avaliados quando sua persistência no ambiente e ecotoxicidade em organismos não-alvo, o escalonamento desses sistemas pode avaliar sua viabilidade. Embora testes de caracterização e toxicidade devam ser realizados, o uso da nanotecnologia apresenta boas perspectivas para aplicação como larvicidas, auxiliando no combate ao vetor de arboviroses.

CAPÍTULO 2

NANOLARVICIDAS A BASE DE LIGNINA CONTENDO ÓLEO DE NEEM COMO UMA ALTERNATIVA DE BAIXA TOXICIDADE PARA CONTROLE DE PROPAGAÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

RESUMO

O aumento nos casos de arboviroses, tais como febre amarela, dengue, chikungunya e a zika, que possuem o mosquito *Aedes aegypti* como principal vetor, infectam milhares de pessoas anualmente, causando sequelas e podendo levar pacientes a óbito. Entre as alternativas para controle do vetor, encontra-se a classe de larvicidas, porém o uso excessivo e indiscriminado de produtos sintéticos tem gerado resistência juntamente com efeitos prejudiciais ao ambiente e saúde humana. Neste cenário foi proposto uma formulação larvicida, nesse estudo preparamos e caracterizamos nanocápsulas de lignina contendo óleo de neem (*Azadirachta indica*), a média das análises demonstraram boa estabilidade para o período de 120 dias, apresentando distribuição de tamanho de 172 ± 5 nm, índice de polidispersão $0,132 \pm 0,01$ e potencial zeta -46 ± 2 mV. Foi observado um aumento significativo da toxicidade em ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade proporcionais ao aumento da concentração dos larvicidas encapsulados. Os ensaios indicaram baixa toxicidade para organismos não-alvo (*Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Chironomus riparius* e *Caenorhabditis elegans*). A atividade biológica estudada em larvas de *Aedes aegypti* descreveu CL_{50} em 3000 mg/L. Tais resultados podem estar relacionados a composição variada do óleo de neem usado em teste, além disso o perfil de liberação pode não ter sido compatível ao tempo de exposição durante os ensaios de atividade, visto que no decorrer do ensaio de liberação foi quantificado 64% apenas após 120 horas. Estudos complementares e modificações na formulação podem tornar esse sistema uma alternativa para uso em larvicidas.

Keywords: *Azadirachta indica*; ecotoxicidade; *Aedes aegypti*, larvicida, nanotecnologia.

1. INTRODUÇÃO

Dengue, zika e chikungunya são arbovírus emergentes que possuem *Aedes aegypti* como vetor e causam condição febril aguda, apesar da baixa mortalidade associada à arboviroses, a alta morbidade gera a consequente sobrecarga de recursos nos serviços de saúde, ainda mais com o grande número de casos infectados gerados pela expansão geográfica ao longo do tempo, e ocorrência de complicações neurológicas graves, principalmente associados a infecção por zika (encefalite, mielite, meningite, síndrome de Guillain-Barré e más formas congênitas, como microcefalia) (PUCCIONI-SOHLER et al., 2017; WILDER-SMITH et al., 2017b).

Diversas estratégias são utilizadas para assegurar proteção contra mosquitos vetores de doenças, sendo fundamental a destruição de criadouros e redução do contato entre homem e vetor, com a utilização de telas e repelentes (BALDACCHINO et al., 2015). Ainda sim o combate ao mosquito exige ações mais complexas como a utilização de vacinas para proteção contra febre amarela (JÁCOME et al., 2019), distribuição pública da vacina para proteção contra dengue (SILVA et al., 2019) e controle químico envolvendo o uso de inseticidas, ovicidas e larvicidas. (BALDACCHINO et al., 2015).

A classe de larvicidas ganha destaque por impedir que as larvas e pupas tornem-se mosquitos adultos, transmissores de patógenos, aliado ao fato de que as larvas possuem uma facilidade de manejo por encontrar-se em águas estagnadas (CHELLAPPANDIAN et al., 2018).

No entanto, existem riscos ao meio ambiente, animais e humanos ao introduzir compostos sintéticos em corpos d'água, desse modo, é essencial avaliar os potenciais impactos que cada formulação pode causar ao ambiente, sendo assim o uso de espécies-chaves pode fornecer dados para compreender o mecanismo de interação das formulações larvicidas com organismo não-alvo no ambiente (AL-MEKHLAFI et al., 2021).

O uso excessivo de agentes químicos sintéticos na agricultura e controle de arboviroses e gerou problemas para o ser humano, meio ambiente e todo o ecossistema. A dificuldade atual está relacionada à resistência fisiológica dos vetores, sendo assim necessário novas tecnologias capazes de controlar os vetores (SHADRACH et al., 2018). (ABE et al., 2019; DONG et al., 2019; MOE et al., 2019). (FOTAKIS et al., 2020).

O uso de nanopartículas torna-se uma alternativa promissora para controle de vetores, uma vez que através desses sistemas é possível fornecer proteção desses compostos de uma degradação, aliado liberação modificada sendo possível reduzir a quantidade de ativo, diminuindo os riscos de gerar resistência ou toxicidade a organismos não-alvo (BENELLI et al., 2018; CAMPOS et al., 2020).

O uso de lignina em nanoformulações gera a possibilidade de formulações ambientalmente sustentáveis, pois este biopolímero é um subproduto agrícola de baixo valor agregado (PEREIRA et al., 2022) possui diversas funcionalidades conforme seus grupos funcionais, aliado ao fato de ser biodegradável (SCHNEIDER; DILLON; CAMASSOLA, 2021).

Aliado a isso, o uso de substâncias naturais apresenta benefícios, uma vez que tais compostos apresentam diversas propriedades devido à complexidade de sua composição (muitas vezes derivados do metabolismo secundário de plantas). Esses produtos ainda apresentam baixa persistência no ambiente e em muitos casos, apresentam menor toxicidade para organismos não-alvo em relação aos compostos sintéticos (SOGAN et al., 2018b).

O óleo de neem, obtidos a partir de sementes de *Azadirachta indica* (pertencente à família Meliaceae) contém aleloquímicos, como azadirachtina, nimbin e salannim, que perturbam os processos fisiológicos do inseto e interrompem seu desenvolvimento, sendo este um popular pesticida por apresentar eficácia, segurança, ser biodegradável, apresentar ação antifúngico e antioxidante (KALA et al., 2019). *Azadirachta indica* tem reconhecidos efeitos contra *A. Gambiae*, *A. Aegypti*, *C. Quinquefasciatus* (CHANDRAMOHAN et al., 2016; MURUGAN et al., 2011; SHARMA; MOHAN; SRIVASTAVA, 2009; WACHIRA et al., 2014).

Diante desse cenário, o presente trabalho descreve a preparação e caracterização de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem, para um possível uso como larvicida. Também foram avaliados perfil citotóxico e genotóxico, assim como a avaliação da ecotoxicidade com estudo em organismos não-alvo e atividade biológica em organismo alvo, larvas de *Aedes aegypti*. Sendo o objetivo obter uma formulação com menor impacto ao meio ambiente e saúde humana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Lignina foi adquirida da Sigma-Aldrich. O óleo de neem (Azamax) contendo 12 g/mL de azadiractina foi adquirido da UPL Brasil. Clorofórmio foi obtida Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil). Myritol líquido foi adquirido da BASF. A linhagem celular HaCaT (queratinócitos humanos) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Duque de Caxias, Brasil). As sementes de *Allium cepa* foram adquiridas da Isla sementes (empresa brasileira). Cordas de ovos de *Chironomus riparius*, ovos de *Danio rerio* e *Daphnia magna* foram coletadas de culturas de laboratório estabelecidas na Universidade

de Aveiro, Portugal. As cepas *Caenorhabditis elegans* foram adquiridas do Caenorhabditis Genetics Center, Minnesota, EUA. Larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller e colonizados no Laboratório de Genômica funcional & Microbiologia de Vetores/LACEM.

2.2 Preparo e caracterização das nanocápsulas

2.2.1 Preparo das nanocápsulas de lignina

As nanocápsulas de lignina foram preparadas em temperatura ambiente e com adaptações conforme o método de extração de solvente descrito por (SCHNEIDER; DILLON; CAMASSOLA, 2021). Sendo assim, o método utilizado consistiu em preparar inicialmente a fase orgânica, constituída por 1% do lipídio myritol e o 3% do ativo óleo de neem diluídos em clorofórmio. Na sequência esta fase orgânica foi misturada mecanicamente através de turrax (14.000 rpm) com a fase aquosa, constituída por 5mg/mL de lignina dissolvida em água. As formulações foram rotaevaporadas ao volume final de 25 mL, sendo a concentração final de óleo de neem 3% (m/v), como descrito por Gott et al. (2014).

2.2.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas

A distribuição do tamanho médio e o índice de polidispersidade das nanocápsulas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). O potencial zeta foi definido pelo método de microeletroforese. análises foram realizadas usando um sistema ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) em um ângulo fixo de 90° e 25°C, após diluição das amostras em água deionizada (Milli-Q). Todas as medidas foram realizadas em triplicata em um intervalo de 0,7,15,30,60,90 e 120 dias.

A morfologia das nanopartículas foi examinada por microscopia força atômica (MFA, Agilent 5500 AFM/SPM). Para as análises de AFM as suspensões de nanopartículas foram diluídas 15.000 vezes e gotejadas sobre uma placa de silício. Após secagem das amostras, as análises foram realizadas em um microscópio de força atômica com modo de não-contato. As amostras foram analisadas com cantilever TapAl-G (BudgetSensors®, Bulgária) com uma taxa de varredura de 90 Hz. As imagens foram tratadas pelo software Gwyddion.

2.2.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do óleo de neem nas nanocápsulas de lignina foi

quantificada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, com análise em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian). As amostras foram centrifugadas usando ultrafiltro de celulose regenerada Microcon 10 kDa (Millipore), que permitiram apenas a passagem do neem não encapsulado. A faixa de concentração da curva analítica foi de 10 a 100 µg/mL, em um comprimento de onda de 226 nm. Curva Analítica $y = 0,007300 \cdot x - 0,0272$; $R = 0,999$; Limite de Detecção 2,30 µg/mL; Limite de Quantificação 7,68 µg/mL.

2.2.4 Cinética de liberação *in vitro*

A cinética de liberação *in vitro* foi avaliada empregando sistemas de dois compartimentos, os quais foram separados por uma membrana de acetato de celulose com poro de exclusão de 1 kDa (Millipore®). Um mL das diferentes formulações foi adicionado no compartimento doador enquanto o compartimento receptor foi preenchido com água em condição de diluição *sink*. Em tempos pré-determinados alíquotas foram retiradas e a concentração dos ativos liberado foi quantificado por análise em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian). O mecanismo de liberação dos ativos a partir das nanopartículas foi avaliado a partir dos modelos matemáticos de ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (COSTA; LOBO, 2001).

2.3 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados com sistemas contendo nanocápsulas com óleo de neem, bem como nanocápsulas controle sem óleo de neem e para realizar uma comparação com o óleo de neem, devido à sua baixa solubilidade, foi preparada uma emulsão. No entanto, cabe ressaltar que uma emulsão também é um sistema carreador, no entanto esta é a única opção de comparação a ser realizada. Desta forma, os resultados a serem encontrados com a emulsão de neem, não necessariamente são o reflexo apenas do óleo e sim do sistema como um todo. Tal estratégia já foi publicada previamente em outros estudos (PŁACZEK et al., 2019; ROGERIO et al., 2022).

2.3.1 Viabilidade celular de acordo com a atividade mitocondrial (teste MTT)

Os ensaios foram realizados com linhagem celulares de queratinócitos (HaCaT). Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços numa densidade de 1×10^4 células, e incubadas a 37 °C, a 5% CO₂ por 24 horas. Após este período o meio foi removido e substituído por meio fresco (200 µL) contendo MTT (brometo de 3-[4,5-

dimetil-tiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazólio) (20 µL, 5mg.mL⁻¹) e a placa foi incubada por 4 horas (37°C, 5% CO₂). Imediatamente após a incubação, o sobrenadante foi removido, os cristais de formazan foram dissolvidos com 0,1M HCl em isopropanol e a absorbância foi medida usando leitor de placa (SpectraMax M5) a 570 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (\text{Equação 1}).$$

onde Abs_{amostra} e Abs_{controle} representam a absorbância da cultura celular na presença e na ausência de tratamento, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3.2 Genotoxicidade usando ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Singh et al. (1988). Após exposição de 1 hora, as células foram homogeneizadas com agarose de baixo ponto de fusão a 0,8% e aplicadas em lâminas recobertas com agarose comum a 1,5%, as quais foram cobertas com lamínulas e refrigeradas por 10 minutos, após a solidificação as lâminas passaram por solução de lise por 1 hora, e corrida de eletroforese por 20 minutos (22V, 10W e 300mA), seguidas de coloração em prata por 35 minutos. As lâminas foram preparadas em triplicatas. A análise das lâminas foi realizada por “*scoring visual*” classificando-se os danos em categorias de 0 a 4. Foram analisadas aleatoriamente cerca de 100 células por lâmina em microscópio ótico (aumento 40x). O índice de danos (ID) foi obtido conforme pela Equação 2.

$$\text{Índice de Danos} = \text{Total de dano observado} / \text{Total de células analisadas} \quad (\text{Equação 2})$$

2.3.3 Ensaio de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*

Inicialmente, sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar e ao atingirem dois centímetros, as raízes foram expostas por 24 horas. Após esse período, as raízes foram fixadas com Carnoy - álcool etílico e ácido acético (3:1 v:v) e mantidas em geladeira por 24 horas. Em seguida, foram submetidas à hidrólise com ácido clorídrico (1M) em banho-maria a 60 °C por 9 minutos e coradas com reativo de Schiff, por 2 horas, na ausência de luz. As lâminas foram preparadas cortando-se a região meristemática das raízes, corando com Carmim acético 2% e esmagando sob a lamínula. Para as análises foram realizadas contagem de cerca de 1000 células por raiz, considerando as fases da divisão celular e as alterações cromossômicas presentes nessas fases. Para a obtenção dos Índices Mitótico (IM) (Equação 3) e Índice de Alterações (IA) (Equação 4) e ambos os parâmetros relativos ao controle negativo (Equações 5 e 6).

$$IM = \text{Total de células em divisão} / \text{Total de células contadas} \quad (\text{Equação 3})$$

$$IA = \text{Total de alterações encontradas} / \text{Total de células em divisão} \quad (\text{Equação 4})$$

$$IM_{rel} = IM \text{ do tratamento} / IM \text{ do controle negativo} \quad (\text{Equação 5})$$

$$IA_{rel} = IA \text{ do tratamento} / IA \text{ do controle negativo} \quad (\text{Equação 6})$$

2.4 Avaliação da toxicidade em organismos não-alvo

2.4.1 Crustáceo *Daphnia magna*

Um teste de imobilização aguda foi realizado de acordo com a diretriz da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD 202 (OECD, 2004). Em cada repetição, cinco neonatos foram expostos em tubos de ensaio de 10 mL, em um total de cinco repetições por concentração/tratamento de controle, em uma faixa de concentrações de larvicidas durante 48 horas sem alimentos e sob condições de cultura. Um controle negativo apenas com American Society for Testing and Materials (ASTM) também foi configurado. A mortalidade foi registrada em 24 e 48 horas, considerados mortos quando, agitando suavemente o frasco de teste, nenhum movimento de natação for visível.

2.4.2 Embriões Peixe-zebra *Danio rerio*

O teste de toxicidade aguda de embriões de peixes (FET) foi realizado seguindo a diretriz OECD 236 (OECD, 2013) e a metodologia descrita por Lammer et al., (2009), com adaptação. Os ovos foram coletados dentro de 30 minutos após o acasalamento natural de peixes adultos, lavados em Fish System Water (FSW) e selecionados usando um estereomicroscópio (Stereoscopic Zoom Microscope-SMZ 1500, Nikon Corporation) para excluir ovos não fertilizados, embriões feridos, embriões com irregularidades durante a clivagem ou ovos opacos. O teste foi realizado em placas de Petri com 50 mm de diâmetro por 96 horas em condições de cultura, contendo ≈ 15 mL de cada concentração dos larvicidas; com 10 ovos por repetição em um total de três réplicas, 30 ovos por tratamento. Um controle negativo apenas com FSW também foi configurado. A mortalidade (falta de batimento cardíaco e embriões coagulados) e o sucesso da eclosão foram verificados a cada 24 horas durante a duração do teste. Malformações morfológicas dos embriões e larvas, como não desprendimento da cauda, ausência de formação de somitos e presença de edema, também foram acompanhadas. As porcentagens de mortalidade, eclosão e desenvolvimento anormal foram calculadas ao final do teste (96 horas).

2.4.3 Mosquito *Chironomus riparius*

O teste agudo de imobilização em *Chironomus riparius* foi realizado seguindo a diretriz OCDE 235 (OECD, 2011). As culturas foram mantidas a 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 16:8 horas claro/escuro, caixa de acrílico, com as larvas em recipientes plásticos com 1–2 cm de areia fina inorgânica (queimada a 500 °C durante 4 horas) e meio de American Society for Testing and Materials (ASTM) na proporção de 1:4. O meio foi aerado, trocados a cada semana e os organismos foram alimentados três vezes por semana com Tetramin® macerado (TetraWerk, Melle, Alemanha). Os ovos de *Chironomus riparius* foram separados para acompanhar garantir a idade correta das larvas. Para o teste cinco larvas do primeiro instar com <24 horas foram adicionadas por concentração/repetição. A mortalidade foi registrada em 24 e 48 horas, considerados mortos quando, agitando suavemente o frasco de teste, nenhum movimento de natação for visível.

2.4.4 Neomatódeo *Caenorhabditis elegans*

A cepa N2 (Tipo selvagem) de *C. elegans* mantida em placas contendo o meio NGM (*nematode growth média*) enriquecido com sais e bactérias *E. coli* OP50, a 20°C foram utilizadas para a sincronização dos nematóides, aonde estes foram lisados com uma solução de lise (NaOCl 1%, 0,25 M NaOH) para a obtenção dos ovos. Os ovos foram lavados e em seguida foram incubados em placas contendo o tampão M9 (0,02 M KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 0,04M, NaCl 0,08M e MgSO_4 0,001M) sem bactéria por 14 horas, até a eclosão das larvas em estágio L1. Os vermes em estágio L1 foram expostos de maneira crônica às concentrações de 0,15, 0,3, 0,9, 1,5 e 3mg/mL das formulações por 48 horas em meio NGM com *E. Coli* OP50. Após 48 horas da exposição foi avaliada a taxa de sobrevivência dos animais tratados em relação ao grupo controle. A população de vermes foi estimada através da contagem de uma área delimitada por quadrantes, utilizando o estereomicroscópio. Os resultados da contagem de animais sobreviventes foram normalizados pelo total de vermes do controle para determinar a taxa de sobrevivência. O número de animais vivos por tratamento foi normalizado pela porcentagem de controle e esses valores foram usados em uma regressão linear-sigmoidal dose-resposta para construir uma curva de sobrevivência. Todos os experimentos foram realizados três experimentos independentes em duplicatas.

Os vermes tratados que atingirem o estágio L4 foram coletados e lavados para retirar o excesso de bactéria e em seguida foram colocados em lâminas de microscópio e

resfriados a -20 °C para paralisá-los. A área corporal dos vermes foi medida com o auxílio do software ImageJ (Madison, WI, EUA). Os valores obtidos foram normalizados para porcentagem em relação ao grupo controle e utilizados na análise estatística. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes.

2.5 Atividade biológica

2.5.1 Atividade larvicida em larvas de *Aedes aegypti*

Os testes de atividade larvicida foram realizados seguindo o protocolo das Diretrizes para testes de laboratório e de campo de larvicidas de mosquitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Estes ensaios foram realizados em câmaras com ambiente controlado, mantendo os padrões de temperatura de 28 ± 1 °C, com umidade de $80 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro. Os experimentos ocorreram no Laboratório de Genômica Funcional & Microbiologia de Vetores (Vectomics) localizados na UNESP de Botucatu em colaboração com o grupo do Dr. Jayme Souza Neto (Unesp/Botucatu).

Em cada réplica dos experimentos, foram utilizadas 25 larvas de *Aedes aegypti* de 3º Ínstar tardio em copos plásticos contendo 100 mL de água deionizada e os produtos testados. A mortalidade larval foi avaliada em 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos produtos. As concentrações dos produtos avaliadas foram de 500, 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000 mg/L em 4 réplicas. O grupo controle negativo, contendo apenas as larvas e a água, também foi incluso.

Durante os experimentos, algumas larvas foram coletadas e colocadas em lâminas de microscópio para registrar Imagens. As lâminas foram fotografadas usando o estereomicroscópio óptico SteREO Discovery.V12 (Zeiss, Alemanha) contendo uma câmera acoplada AxioCam 503 color com o auxílio do software ZEN 2 lite. Para as fotografias de fluorescência foi utilizado o equipamento Light Source LQ-HXP 120 - Leistungselektronik Jena GmbH com o auxílio de um filtro para captar o fluoróforo ds-RED, as nanocápsulas foram sintetizadas com marcação fluorescente, realizada como descrito no item 2.2.1, sendo que adicionado o fluoróforo rodamina-PE (0,1% m/m relativo ao polímero) ao óleo de nem e posteriormente adicionado na solução de lignina.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 6, utilizando ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas de lignina

Suspensões aquosas de nanopartículas poliméricas apresentam boa eficácia para entrega controlada de fármacos, e podem ser formuladas a partir do processo de evaporação do solvente (WURM; WEISS, 2014), desse modo, com as adaptações na metodologia de preparo é possível formular nanocápsulas de parede polimérica (utilizando o biopolímero lignina) contendo um núcleo de óleo (óleo de neem).

Os parâmetros físico-químicos foram analisados ao longo de 120 dias (0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). A média dos diâmetros médios (nm) destas formulações de NPNL encapsuladas com óleo de neem 3% nos respectivos períodos foram: 173 ± 3 nm; 169 ± 3 nm; 171 ± 2 nm; 174 ± 2 nm, 183 ± 3 nm, 171 ± 2 nm, e 164 ± 1 nm (Figura 1B). Analisando-se os dados apresentados as variações observadas não foram significativas e tais resultados corroboram com os dados apresentados por Andeme Ela et al. (2020), que obteve estabilidade de 8 meses em suas formulações, com diâmetro médio de 242 ± 33 nm, tais formulações apresentam características de preparo similares e contém lignina kraft como polímero para nanocápsulas contendo o fungicida propiconazol.

Da mesma maneira o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (PZ) foram analisados. Os valores de PDI foram, respectivamente, $0,119 \pm 0,03$; $0,143 \pm 0,01$; $0,136 \pm 0,01$; $0,143 \pm 0,03$; $0,134 \pm 0,01$; $0,136 \pm 0,01$ e $0,118 \pm 0,02$ (Figura 1C). Foi possível observar os valores baixos de PDI (inferior a 0,2) indicando a homogeneidade das formulações. Os valores de potencial zeta (PZ mV) foram respectivamente, $-43,1 \pm 2,3$ mV, $-47,7 \pm 5,4$ mV, $-43,8 \pm 4,13$ mV, $-48,3 \pm 2,61$ mV, $-46,3 \pm 3,35$ mV, $-50,3 \pm 3,45$ mV e $-44,4 \pm 3,33$ mV, destaca-se que não ocorreu alterações significativas nesses valores em função do tempo (Figura 1D).

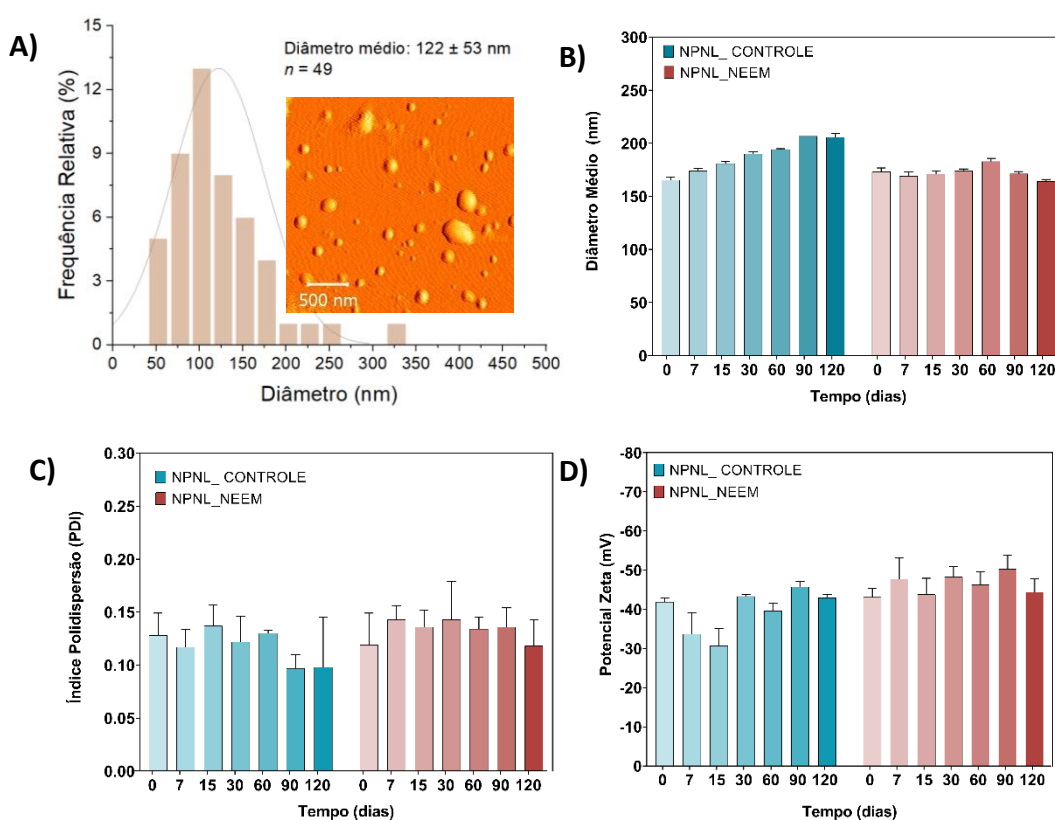
A carga negativa observada no potencial zeta ocorre provavelmente devido à adsorção de íons hidroxila na superfície das nanocápsulas quando a superfície hidrofóbica das nanocápsulas de lignina está em contato com a água. O alto potencial zeta negativo, induz repulsão elétrica entre as partículas, impedindo agregação e estabilizando a formulação, sendo que valores em torno de -40 mV foram relatados anteriormente em alguns tipos de nanopartículas de lignina (LIEVONEN et al., 2016).

O pH também foi um dos parâmetros analisados, sendo que o valor médio do período de 120 dias para a formulação com combinação de ativos foi de $7,9 \pm 0,09$, sendo assim não foram observadas alterações significativas em função do tempo.

A emulsão desenvolvida nesse trabalho foi caracterizada inicialmente com diâmetro médio de 210 ± 2 nm, índice de polidispersão $0,383 \pm 0,05$ e potencial zeta -

39,2±0,5 mV. Porém ao passar 15 dias mostrou-se instável, com sinais de separação de fase e o resultado das análises mudou para diâmetro médio de 1828 ± 480 nm, índice de polidispersão 1 ± 0,01 e potencial zeta -16,3 ± 4 mV. Embora emulsão também seja um sistema carreador promissor, nesse trabalho não mostrou boa estabilidade e desempenho.

Figura 1: Análise físico-química das formulações ao longo de 120 dias (0, 7, 15, 30, 60 e 120 dias) através de métodos Microscopia de Força Atômica (A) Dynamic Light Scattering (DLS) (B e C) e Microeletroforese (D). Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico sem ativos (NPNL_CONTROL) e contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM).



A morfologia das nanocápsulas foi analisada por Microscopia de Força Atômica (AFM), Easy Scan 2 Basic BT02217-Nanosurf. Através desta análise foi possível observar a morfologia esférica dos NPNLs (Figura 1A), os nanocarreadores de lignina preparados por Mattinen et al. (2018) também apresentaram o mesmo perfil em análise de AFM, obtendo alterações na superfície das nanopartículas conforme aplicação de revestimentos. A morfologia também corrobora com os dados de Li et al. (2016), que analisou nanopartículas de lignina pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia de força

atômica (AFM), descrevendo a morfologia oca das partículas que possibilita o encapsulamento de ativos.

Através do software Gwyddion foi determinado o tamanho da NPNL com óleo de neem, foi obtido o diâmetro médio de 122 ± 53 nm em uma análise de 49 partículas, indicado na Figura 1A. Neste caso, o tamanho foi menor quando comparamos com medidas de DLS (figura 1B) devido as condições da amostra, pois a análise de AFM é feita na amostra seca sobre uma superfície de silício.

A eficiência de encapsulamento foi calculada inicialmente pela subtração do valor de background da lignina e pela diferença entre a quantidade de óleo inicialmente adicionada e a quantidade obtida no filtrado. A eficiência de encapsulação (EE) foi avaliada ao longo de 0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias, sendo os valores de EE (%) do óleo de neem foi de $99 \pm 0,21\%$; $98,3 \pm 0,08\%$; $98,2 \pm 0,49\%$; $97,9 \pm 0,3\%$; $97,7 \pm 0,15\%$ e $96,9 \pm 0,15\%$ respectivamente (Tabela 1S).

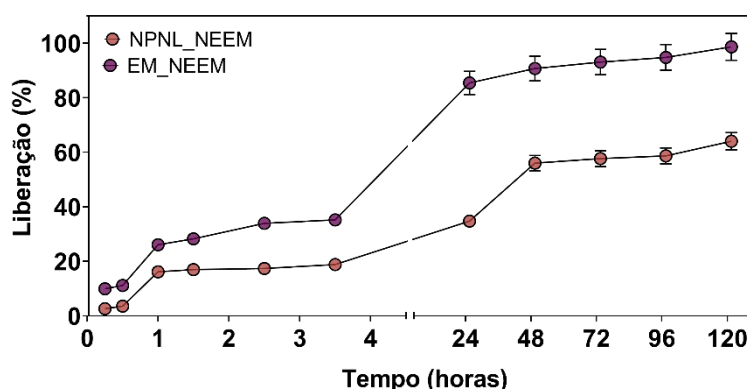
O perfil da eficiência de encapsulação reduzindo em função do tempo demonstra a liberação dos óleos das nanocápsulas para o meio, ainda assim é possível prever boa estabilidade de prateleira para o período estudado. Pascoli et al. (2020) encapsulou óleo de neem em nanopartículas de zeína com eficiência de encapsulação e $86 \pm 0,5 \%$ com uma diminuição gradativa para $64 \pm 0,6 \%$ após 90 dias, indicando a liberação do óleo ao longo do tempo.

3.2 Cinética de liberação *in vitro*

A caracterizadas em relação ao perfil de liberação dos larvicidas, realizados de acordo com Lai et al. (2006), com modificações. A quantidade de larvicida liberado foi quantificada através de espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian), sendo os resultados expressos em porcentagem. Os ensaios foram realizados à 25°C (Figura 2) em triplicata. O ensaio de liberação teve duração de 5 dia, alcançando 120 horas, visando assim estipular o comportamento das nanocápsulas em contato com a água e em função do tempo.

É visível que o encapsulamento dos ativos auxiliou na redução da liberação em relação as emulsões, de modo que a formulação emulsão de neem alcançou 100% da liberação enquanto as nanocápsulas atingiram 64 % de liberação.

Figura 2: Ensaio de liberação das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM) e emulsão de neem 3% (EM_NEEM). Ensaio realizado à 25°C.



Para avaliar o perfil de dissolução/liberação foram utilizadas modelagens baseadas em diferentes modelos matemáticos de Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Com base nos valores de coeficiente linear (r^2) apresentados, o modelo designado por Higuchi foi o que melhor descreveu a liberação das nanocápsulas com óleo de neem. Por outro lado, emulsão de óleo de neem foi mais bem descrita por Korsmeyer-Peppas, conforme visto na tabela 2S do material suplementar.

O modelo Higuchi descreve que a liberação ocorre por difusão, seguindo a lei de Fick, o modelo Korsmeyer-Peppas, que melhor se adaptou a liberação do óleo de neem em emulsão, apresenta o valor do expoente de liberação (n) indicando transporte supercaso II, pois $n > 1$ (COSTA; SOUSA LOBO, 2001). O modelo Higuchi também descreveu a liberação em água de azadiractina encapsulada em grânulos de alginato, no estudo de Flores-Céspedes et al. (2015).

3.3 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

3.3.1 Viabilidade celular de acordo com a atividade mitocondrial

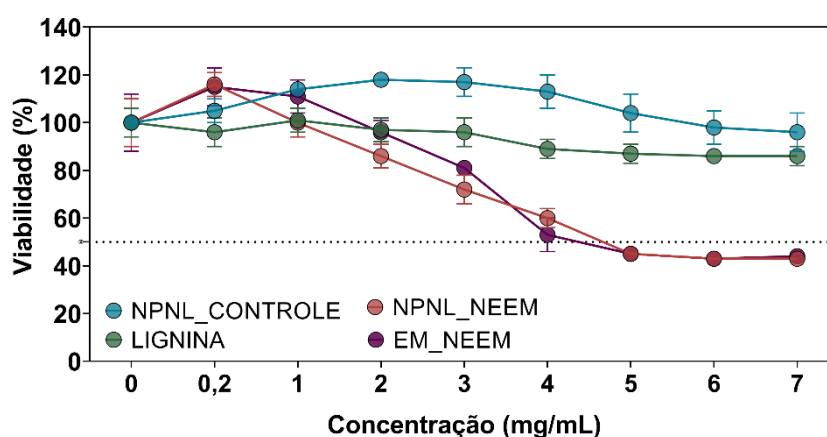
Ensaios de citotoxicidade são essenciais para detectar possíveis efeitos a estrutura, propriedades, proliferação e sobrevivência celular (ÁVALOS-SOTO et al., 2014). Desse modo ao estudar interação das nanocápsulas contendo óleo de neem em células HaCaT (queratinócitos humanos), pode-se estimar a reação celular a uma exposição ao composto.

A viabilidade das células expostas à lignina e nanocápsulas controle (sem óleo) não demonstraram toxicidade significativa com o aumento da concentração, sendo que a lignina apresentou 86 ± 4 % da viabilidade celular na maior concentração testada, enquanto nanocápsulas controle foi 96 ± 8 %, esse resultado era esperado visto que a

lignina é amplamente estudada para produtos farmacêuticos e assim demonstra ter seu uso seguro para humanos (SCHNEIDER; DILLON; CAMASSOLA, 2021).

Com o aumento da concentração ocorreu a diminuição da viabilidade das células expostas as formulações com neem sendo $43 \pm 3\%$ para nanocápsulas de neem e $44 \pm 3\%$ para emulsão neem na última concentração testada, conforme é visto na figura 3.

Figura 3: A porcentagem de viabilidade celular da linhagem celular HaCaT determinada pelo ensaio MTT após sua exposição a lignina, nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico sem ativos (NPNL_CONTROL), nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM), emulsão de neem 3% (EM_NEEM).



Um dos fatores que podem ter influenciado na baixa viabilidade celular demonstrada nas formulações com óleo de neem é que este possui outros fitoconstituintes além da azadiractina, sendo assim o resultado pode ter sido obtido pela interação entre os demais componentes do óleo (ISLAS et al., 2020; THAKUR; KUMAR; KUMAR, 2019).

Resultado semelhante é descrito por Pasquoto-Stigliane et al. (2017) em nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) carregadas com óleo de neem apresentaram viabilidade celular inferior a 50% em células HaCaT conforme concentração superior a 4mg/mL. O estudo de Manca et al., (2021) com formulações contendo 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de óleo de neem demonstrou maior viabilidade de queratinócitos e fibroblastos quando carregadas hialurosomos de argan, dispersão, lipossomas e lipossomas de argan também foram testado apresentando viabilidade superior a 70 %.

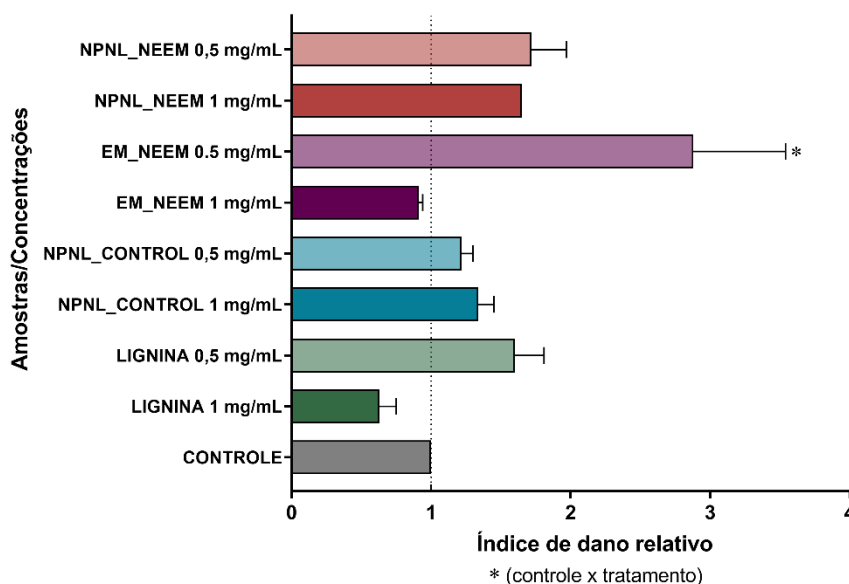
Por outro lado, é conhecida as limitações dessa técnica, de forma que diversos fatores podem interferir nos resultados, desse modo é crucial avaliar por outras técnicas em *in vitro* e em *in vivo* (GANAPATHY-KANNIAPPAN et al., 2010; GHASEMI et al., 2021; JOHNO; TAKAHASHI; KITAMURA, 2010).

3.3.2 Genotoxicidade usando ensaio cometa

A genotoxicidade pode ser determinada pelo ensaio cometa baseando-se na análise da migração do DNA fragmentado, pois este migra mais rapidamente sob eletroforese através de uma matriz de agarose, quando comparado ao DNA que não sofreu danos. Por ser uma análise individual das células, pode-se observar as características adquiridas após exposição (CORDELLI; BIGNAMI; PACCHIEROTTI, 2021).

A Figura 4 representa os resultados obtidos em ensaio cometa com células HaCaT. A exposição das formulações gerou diferença significativa, comparada ao controle, apenas na formulação emulsão com óleo de neem a 0,5 mg/mL, conforme nível de significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA). As demais formulações apresentaram índice de dano relativo superior ao demonstrado pelo controle, mas sem diferença significativa.

Figura 4: Índice de dano celular em células HaCaT determinadas pelo ensaio cometa após sua exposição Lignina, nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico sem ativos (NPNL_CONTROL), nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM), emulsão de neem 3 % (EM_NEEM). Nível de significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA) onde a diferença significativa em relação ao controle é representada por *.



Ao avaliar os efeitos de nanoemulsão preparada com óleo de neem e Tween 20, em linfócitos humanos, Jerobin et al., (2015) observou um aumento da genotoxicidade em concentrações superiores a 2 mg/mL, enquanto concentrações inferiores não

indicaram toxicidade.

No trabalho de Gastelbondo-Pastrana et al. (2019), foi realizado ensaio cometa afim de avaliar os danos ao DNA em células do intestino e ovário de *Ceraeochrysa claveri* (inseto utilizado como indicador de genotoxicidade) após exposição Azamax™, produto comercial a base de óleo de neem. Os resultados indicaram que as células foram sensíveis a exposição ao Azamax™ com um aumento significativo de dano ao DNA.

Embora tenha divergências quanto a segurança de produtos à base de neem, é reportado seus benefícios a saúde humana (ISLAS et al., 2020). Estudos demonstram potencial anticarcinogênico (KASHIF; KIM; KIM, 2018; MOGA et al., 2018), uso em formulação tópica para atividade anti-inflamatória e cicatrizante (BANERJEE et al., 2021), propriedades antimicrobiana e antifúngica (ALI et al., 2021).

Estudos indicam boa compatibilidade e segurança em scaffolds contendo óleo de neem desenvolvidos para engenharia de tecidos (JAGANATHAN et al., 2020), não apresentando toxicidade em células vermelhas do sangue (RBC), células de fibroblastos humanos (HDF) e em ensaios hemolíticos (JAGANATHAN et al., 2018).

Portanto caracterizações complementares são essenciais para a determinação da concentração de toxicidade dos produtos à base de óleo de neem, de modo que seja esclarecido a composição e concentração das substâncias presentes no óleo, assim como avaliar o métodos de extração e preparo do óleo, para que se tenha uma padronização dos produtos desenvolvidos com óleo de neem (CESA et al., 2019).

3.3.3 Ensaio de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*

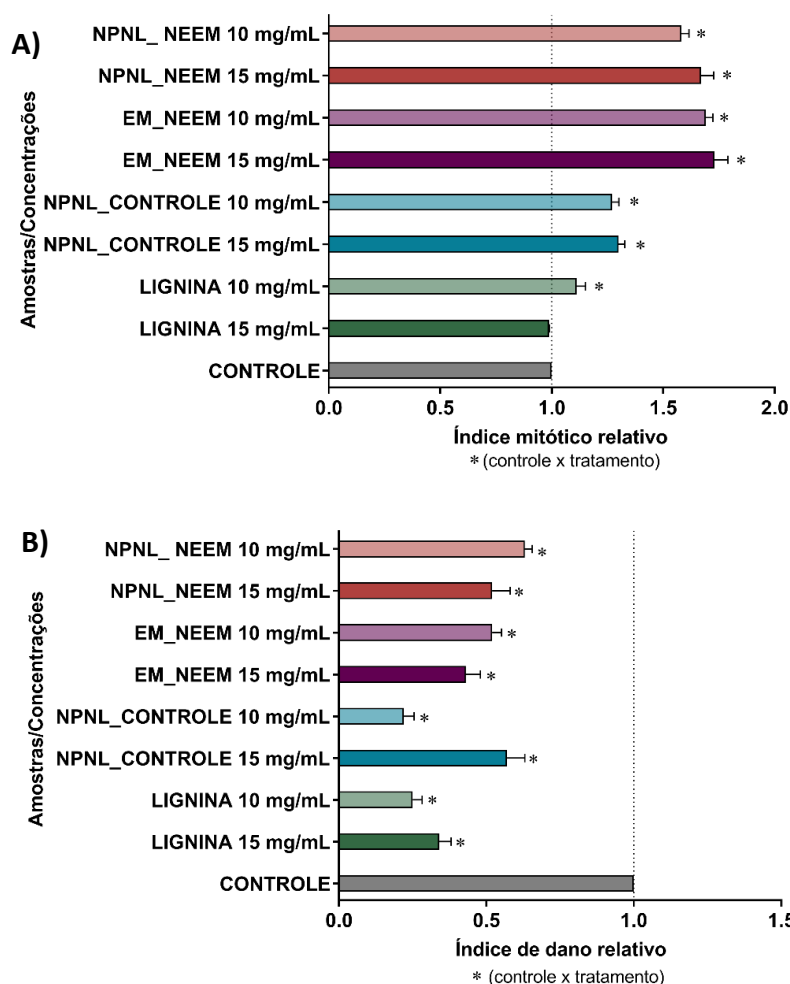
Plantas possui um nível complexidade relativamente alto possibilitando estudos de citotoxicidade em genotoxicidade com dados mais abrangentes sobre danos ao DNA em organismo multicelular, fornecendo informações sobre mutações genômicas e morfologia dos cromossomos. Com destaque para *Allium cepa*, que por possuir cromossomos grandes facilita a sua observação (BONCIU et al., 2018).

Os ensaios com *A. cepa* mostraram diferença significativa entre as formulações testadas e o controle, de modo que as formulações apresentaram maior índice mitótico relativo, quando comparadas ao controle. O aumento foi mais significativo nas formulações com óleo de neem, resultado diferente do encontrado por Pascoli et al., (2019) e Pasquoto-Stigliani et al., (2017) que ao realizar estudos com nanopartículas carregadas com óleo de neem, observaram uma tendência do óleo de neem em interferir na mitose celular gerando diminuição do índice mitótico nas raízes de *Allium cepa*.

O índice de dano relativo diminuiu na presença das formulações em teste, quando

comparado ao controle, sendo as formulações de lignina e nanocápsula controle que demonstraram menor impacto em *A. cepa*, as formulações contendo óleo de neem, nanocápsula carregada com óleo de neem e emulsão com óleo de neem apresentaram uma redução no índice de dano de 52% e 43% respectivamente, na concentração 15 mg/mL (Figura 5).

Figura 5: Resultados do ensaio de aberração *Allium cepa*: A) Valores relativos do índice mitótico para os diferentes tratamentos; B) Índice de dano relativo de raízes submetidas a tratamentos Lignina, nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico sem ativos (NPNL_CONTROL), nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM), emulsão de neem 3% (EM_NEEM). Nível de significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA) onde a diferença significativa em relação ao controle é representada por *.



Goetten de Lima et al., (2022) realizou testes com nanossílica à base de óleo de neem em *A. cepa* e não observou efeitos cito e genotóxicos, os autores relacionam esse

resultado a concentração e composição do óleo de neem utilizado.

O neem é composto por mais de 200 aleloquímicos, que encontram-se em variáveis concentrações em diferentes partes da planta, o que promove a diversidade de propriedades (CHAUDHARY et al., 2017). Desse modo é esperado que a variação de concentração proporcione diferentes atividades, como é visto no estudo de Micheli et al., (2018) em que a adição de óleo de neem em baixa concentração teve significativo efeito na regeneração de plantas in vitro.

Com tudo é provável que as raízes de *A. cepa* durante esse estudo, tenham sido expostas a uma concentração de óleo de neem capaz de estimular a divisão celular, visto que as nanocápsulas possuem uma lenta liberação, conforme visto no item 3.2.

3.4 Avaliação da toxicidade em organismos não-alvo

Os ensaios foram realizados conforme as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OECD 202, 236 e 235, correspondente aos ensaios com os organismos *Daphnia magna*, *Danio rerio* e *Chironomus riparius*, respectivamente.

Testes iniciais demonstraram, o baixo teor tóxico das formulações em teste pois foram testadas concentrações entre 10 mg/L e 3000 mg/L, para assim definir a melhor janela de concentrações, sendo 150 mg/L, 350 mg/L, 550 mg/L, 750 mg/L e 950 mg/L para *Daphnia magna*, 45 mg/L, 90 mg/L, 180 mg/L, 360 mg/L e 720 mg/L para *Chironomus riparius* e 40 mg/L, 80 mg/L, 120 mg/L, 160 mg/L e 200 mg/L para *Danio rerio*. A coloração das formulações também foi uma das condições para a definição das concentrações, visto que ao aumentar a concentração se intensifica a coloração das formulações derivadas de lignina e dificulta a visualização da movimentação dos organismos durante o ensaio.

No decorrer dos testes para determinação das concentrações de estudo foi visível a baixa toxicidade das nanocápsulas, desse modo, utilizou concentrações superiores aos 100 mg/L descrito na diretriz como o limite do teste, então seguiu-se as recomendações utilizando concentrações até o limite de solubilidade do meio testes (OECD, 2004). A determinação da concentração letal para 50% de organismos em teste (CL₅₀) foi determinada a partir do programa Minitab, onde foi considerado a concentração testada, o número de organismos em teste e o número de organismos sobreviventes.

Conforme é visto na Tabela 1, os ensaios apresentaram baixa taxa de mortalidade para os organismos estudados. No ensaio com *Daphnia magna*, a formulação contendo nanocápsulas de neem apresentou CL₅₀ 865 ± 57 mg/L, enquanto as demais amostras

tiveram a estimativa de CL₅₀ acima da concentração máxima em teste.

Chironomus riparius, O teste foi realizado em larvas do primeiro instar, avaliando o potencial larvicida das formulações, visando conhecer a especificidade das formulações visto que este organismo possui semelhança com o organismo alvo das formulações *Aedes aegypti*. Embora larvas do primeiro instar sejam mais sensíveis aos demais estágios do desenvolvimento, as larvas do *Chironomus riparius* mostrou-se resistente, apresentando CL 50 acima da última concentração testada para todas as formulações (D et al., 2019; XIE et al., 2019).

Entre os organismos estudados o *Danio rerio* se mostrou o mais sensível, apresentando os maiores índices de mortalidade, este resultado pode estar relacionado ao tamanho da nanocápsula utilizada. Rizeq et al. (2019), observou a influência do tamanho de nanopartículas de quitosana no desenvolvimento do zebrafish, as nanopartículas que apresentaram tamanho inferior a 100 nm não demonstraram efeitos significativos no desenvolvimento do embrião, por outro lado, as nanopartículas com o diâmetro médio superior a 200 nm mostraram diminuição significativa na taxa de eclosão, e acima de 250 nm foi notável o aumento da mortalidade e toxicidade neurocomportamental, corroborando os resultados obtidos nesse estudo, pois as nanocápsulas apresentam tamanho médio de aproximadamente 250 nm.

Ainda que o mecanismo de interação com o córion (envelope celular que reveste o embrião) não esteja bem definido, é provável que os poros, presentes no córion e que atuam permitindo a entrada de substâncias ao embrião, sofram alterações quando expostos a nanomateriais, sendo o tamanho e propriedades físico-químicas responsáveis por essa interação (JIA et al., 2019).

Tabela 1: Comparativo da concentração letal 50% (CL₅₀) entre os organismos testados *Daphnia magna*, *Danio rerio* e *Chironomus riparius* para as formulações: Lignina, Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico sem ativos (NPNL_CONTROL) e Emulsão contendo óleo de neem 3% (EM_NEEM), Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM).

	CL ₅₀ (mg/L)		
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Chironomus riparius</i>
LIGNIN	>950	>200	>720
NPNL_CONTROL	>950	120.3 ± 4.98	>720
EM_NEEM	>950	102.7 ± 4.98	>720
NPNL_NEEM	865 ± 57	80 ± 4.26	>720

É essencial avaliar o ambiente aquático pois este é o principal ponto de entrada e dispersão dos nanomateriais para outros recursos ambientais. É estimado que em condições ambientais a concentração de nanopartículas na água de superfície se encontre em uma faixa inferior a ng/L à µ/L de acordo com o tipo de partícula (TURAN et al., 2019). Desse modo, os valores encontrados para CL₅₀ das formulações testadas apresentam altas concentrações de nanocápsulas, que dificilmente estariam disponíveis no ambiente.

O banco de dados de ecotoxicidade de pesticidas (OPP- Pesticide Ecotoxicity Database) apresenta o CL₅₀ de 9,3 mg/L para *Azadirachta indica* (Neem) em estudo com *Daphnia magna*. Outros estudos indicam que produtos comerciais que contém *Azadirachta indica* possuem menor toxicidade quando comparado a produtos sintéticos, como por exemplo no caso do produto BioneemTM que foi testado para toxicidade aguda contra *D. magna* e *D. rerio*, por 48 e 96 horas de exposição, respectivamente. A concentração efetiva para imobilidade em *Daphnia* foi de 0,17 mL/L enquanto para *Danio rerio* foi 0,22 mg/L (BRAGA et al., 2021). Outro estudo em *Daphnia magna* avaliou a toxicidade de NeemarkTM e TafgorTM apresentaram CL₅₀ de 522,8 mg/L e 439,4 mg/L respectivamente (KAKKA; HERLEKAR; AWALE, 2021).

É notável que o mesmo piretróide (classe de pesticidas sintéticos altamente eficazes para controle de vetores como insetos e amplamente utilizados) tem toxicidade diferente para diferentes organismos aquáticos, e diferentes tipos de piretróides têm toxicidade diferente para o mesmo organismo aquático, estudos em *Danio rerio* apresentaram CL₅₀ de 5,20 µg/L e 78,20 µg/L, para Permetrina e Tetrametrina, respectivamente; *Daphnia magna* CL₅₀ 4,70 µg/L e 0,36 µg/L para Metoflutrina e λ-cialotrina, respectivamente e Metoflutrina apresentou CL₅₀ de 2,40 µg/L em estudos com *Chironomus riparius* (ZHU et al., 2020). Desse modo, as nanocápsulas desenvolvidas nesse projeto assim como as emulsões indicam ser menos tóxicas aos organismos aquáticos.

Apesar dos resultados obtidos apresentarem baixa toxicidade nos organismos é importante avaliar os fatores que os determinaram. As características dos nanomateriais podem ser influenciadas pelo tipo de água, componentes orgânicos, salinidade, pH e compostos formadores coloidais, gerando agregação do material ou modificando seu perfil de liberação (SALEH, 2020). A avaliação por microeletroforese, demonstrou que ocorreu uma diminuição de 50% no valor do potencial zeta no período dos testes, quando as nanocápsulas ficaram em contato com água do sistema dos peixes ou ASTM, sendo assim, é previsto que ocorreu agregação de partículas durante os ensaios.

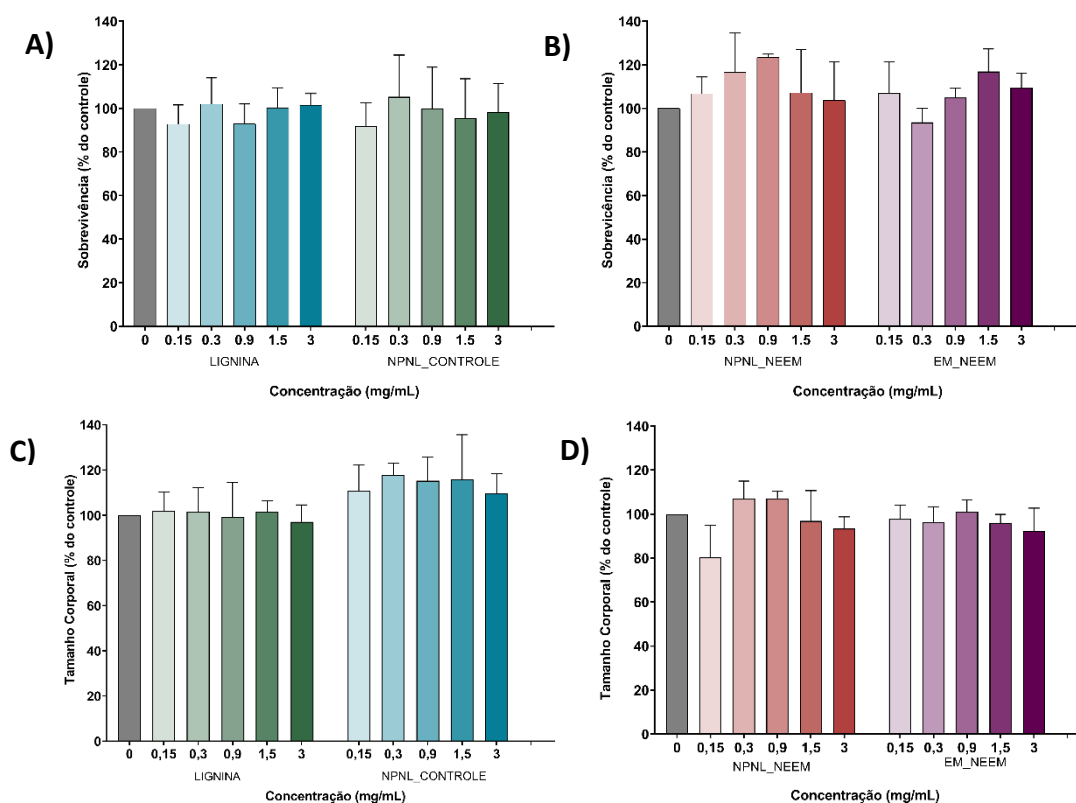
Algumas possibilidades são observadas ao avaliar toxicidade de nanomateriais em organismos, tais como danificação dos citoesqueleto, perturbando o transporte intracelular e divisão celular, perturbações na transcrição e danificação de DNA, acelerando mutagênese, perfuração ou obstrução de poros e membranas, alteração no transporte de substâncias, interferência na degradação de macromoléculas e desencadeamento de apoptose (SUKHANOVA et al., 2018). Além desses fatores, é observado que nanopartículas possuem uma tendência maior a gerar quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio, sendo esse um fator preocupante pois o forte potencial de oxidação pode gerar danos causando apoptose ou mesmo mutagênese (YU et al., 2020a). Para compreender o processo de interação entre as NPNL e os organismos aquáticos estudos complementares devem ser avaliados.

Ressaltando que desenvolver nanocápsulas utilizando polímeros naturais, como é o caso da lignina, torna-se uma estratégia interessante pois a biocompatibilidade e biodegradabilidade auxilia que esse material apresente menor toxicidade e diminuição dos riscos de persistência no meio ambiente. Estudos apontam que a toxicidade de nanopartículas poliméricas em ensaios com zebrafish dependem em grande parte das propriedades físico- química, com o destaque para a carga superficial, em especial nanopartículas catiônicas (JIA et al., 2019).

A avaliação de organismos de vida livre (encontrados em ambientes aquáticos e terrestres), permite um maior entendimento dos efeitos tóxicos de compostos no ecossistema. Sendo assim, o nematoide *Caenorhabditis elegans* torna-se uma excelente ferramenta de pesquisa como organismo não-alvo, por possuir facilidade de manejo devido ao seu pequeno tamanho, vida curta, alta taxa de reprodução e genoma completamente sequenciado, que contém homólogos para cerca de 60-80% dos genes humanos (MUDD; LICEAGA, 2022).

O resultado dos ensaios realizados em *C. elegans* são apresentados na figura 6. Podemos observar que as formulações testadas não apresentaram mortalidade significativa aos organismos (Figura 6 A e B), da mesma forma não houve alteração no desenvolvimento dos organismos, conforme visto na Figura 6 C e D, pois as formulações não alteraram a área corporal dos organismos testados.

Figura 6: Ensaio de toxicidade usando *C. elegans* exposto por 48 h a 0,15; 0,3; 0,9; 1,5 e 3 mg/mL de Lignina, Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico sem ativos (NPNL_CONTROL) e Emulsão contendo óleo de neem 3% (EM_NEEM), Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM). Taxa de sobrevivência (A e B). Comprimento do corpo (C e D). Nível de significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA) onde a diferença significativa em relação ao controle é representada por *.



Resultados semelhantes são descritos por Pascoli et al. (2019), em ensaios feitos com nanopartículas de zeína contendo óleo de neem em *C.elegans*, sendo que também não ocorreram alterações significativas na sobrevivência, reprodução e comprimento do organismo, no entanto ocorreu diminuição do bombeamento faríngeo, que pode gerar restrição alimentar e causar danos futuros.

Os ensaios agudos realizados nesse trabalho apresentam dados sobre a mortalidade dos organismos não-alvo, sendo esse um parâmetro bruto de resposta dos organismos, porém é conhecido que a toxicidade crônica pode ocorrer mesmo em baixas concentrações, mas em um período maior de exposição e assim os organismos podem sofrer uma ampla variedade de efeitos subletais. (PALMEIRA; OLIVEIRA; DORTA, 2021).

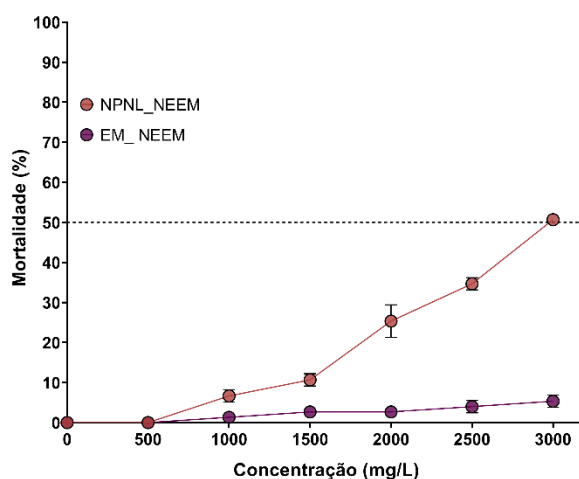
Além de informações sobre toxicidade crônica, é importante avaliar as

características comportamentais de organismo alvo e não-alvo. Assim como informações sobre estabilidade, degradação e comportamento das nanocápsulas no ambiente. Sendo assim testes complementares trariam maior realidade ecológica a esse trabalho (BENELLI et al., 2018).

3.5 Atividade biológica

As larvas do primeiro instar de *Aedes aegypti* apresentaram mortalidade a partir da concentração 1000 mg/L das nanocápsulas contendo neem. Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram 3001 ± 153 mg/L e 4688 ± 382 mg/L, respectivamente. Emulsão contendo óleo de neem apresentou apenas $5,3 \pm 1,5\%$ da mortalidade das larvas na maior concentração testada, 3000 mg/L, essa baixa mortalidade impediu calcular CL₅₀ com margem de confiabilidade (Figura 7). Também foram realizados testes com lignina e nanocápsulas poliméricas sem ativos, porém não apresentaram nenhuma mortalidade e por isso não estão descritas na figura abaixo.

Figura 7: Ensaio de atividade larvicida usando *Aedes aegypti* exposto por 72 horas a 0; 500; 1000; 1500; 2000; 2500 e 3000 mg/L de Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM) e Emulsão contendo óleo de neem 3% (EM_NEEM).



Os resultados diferem do estudo de revisão de Piplani et al., (2019), que indicou atividade larvicida para derivados de neem em submicrogramas/mL. Essa diferença nas concentrações letais pode ser devido à diferença nos metabólitos secundários presentes nos materiais vegetais (YAZHINIPRABHA; VASEEHARAN, 2019).

A atividade inseticida do óleo de neem é predominantemente atribuída a azadiractina, composto encontrado em folhas, cascas, madeira, raízes e principalmente

nas sementes da árvore *Azadirachta indica* (ZANUNCIO et al., 2016). É conhecido alterações nas concentrações de azadiractina e nos demais compostos presente em *A. indica*, o desenvolvimento da árvore é influenciado por área geográfica, clima e variabilidade genética (FERNANDES et al., 2019).

No presente trabalho foi utilizado uma formulação comercial de óleo de neem em concentração de 12 g/mL de azadiractina, sendo assim, na maior concentração de formulação usada no ensaio de atividade larvicida, 3000 mg/L, apenas 1,08 mg/L é de fato o composto ativo azadiractina, visto que a atividade responde à concentração, esse pode ser um dos fatores envolvidos no resultado obtido. Além disso, o tempo de exposição e taxa de liberação do ativo das nanocápsulas pode ter influenciado, assim como a interação entre os componentes do óleo e formulação (BENELLI et al., 2017).

Entra-se na literatura ensaios larvicidas com *A. indica* que apresentaram atividade larvicida em menores concentrações do que a obtida nesse trabalho. Tais resultados podem estar relacionados ao preparo das formulações utilizadas, processo de extração e solventes usados (CHAUDHARY et al., 2017).

O estudo de Chandramohan et al., (2016) desenvolveu nanopartículas de prata (AgNP) utilizando torta de neem, subproduto obtido na extração do óleo das sementes de *A. indica*. Os valores do CL50 alcançados pelo extrato de torta de neem variaram de 106,53 (larva I) a 235,36 ppm (pupa), enquanto AgNP CL 50 variou de 3,969 (larva I) a 8,308 ppm (pupa), indicando que o uso da nanotecnologia pode auxiliar na redução da concentração.

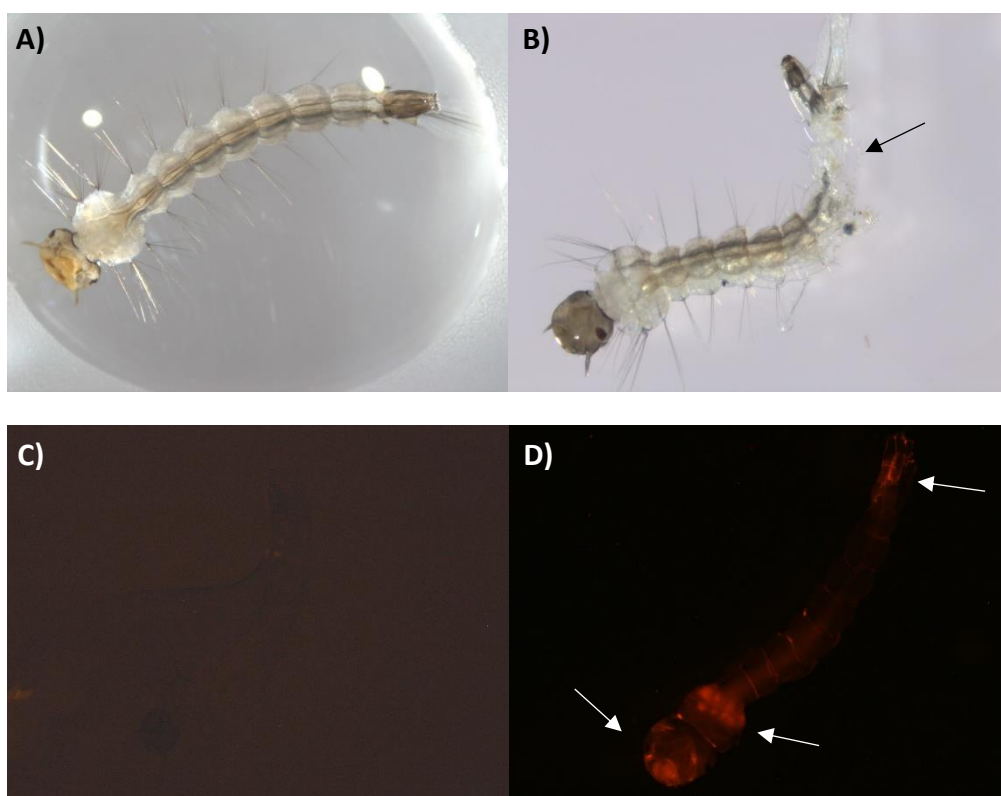
Tal resultado também é visto no presente trabalho, emulsão e nanocápsulas de lignina apresentam a mesma porcentagem de ativo, mas apenas as nanocápsulas apresentaram atividade larvicida significativa. Supõe-se que materiais em nanoescala possam penetrar através do exoesqueleto de artrópodes, podendo ligar-se ao enxofre das proteínas ou fósforo do DNA, diminuindo permeabilidade da membrana e ocasionando perda de função e morte celular (BENELLI, 2018).

Em larvas de *Aedes aegypti* estudos histológicos sugerem atividade larvicida de nanopartículas de selênio à base de extrato de baga de *M. koenigii* por dano tecidual, devido à deposição das nanopartículas na região da cabeça, tórax, intestino médio, abdômen e sifão, ressaltando que a deposição na região do sifão leva à asfixia (YAZHINIPRABHA; VASEEHARAN, 2019).

A observação estereomicroscópica de larvas mortas após exposição às nanocapsulas de neem 3000 mg/L por 72 horas, indica um rompimento na membrana (figura 8-B), as imagens de larvas expostas à nanocápsula de neem contendo sonda

fluorescente e sob filtro fluorescente aparenta presença de nanocápsulas na região da cabeça, sifão e intestino (Figura 8-D), corroborando com outros estudos (DEY et al., 2020; YAZHINIPRABHA; VASEEHARAN, 2019). Porém estudos histológicos complementares são necessários para confirmar essas hipóteses.

Figura 8: Observação estereomicroscópica de larvas. Sendo Controle (A e C), Larva após 72 horas de exposição à nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem à 3000 mg/L (B), Larva após exposição à nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem e sonda fluorescente (D).



O mecanismo de ação das nanocápsulas de lignina contendo óleo de neem não está definido. É conhecido a azadiractina apresenta maior toxicidade por ingestão do que por contato, desse modo a inibição alimentar ocasionada pelo óleo de neem pode retardar o desenvolvimento e crescimento, assim como interferir na fecundidade e fertilidade em ovos, larvas e insetos adultos (ZANUNCIO et al., 2016).

Essa característica do óleo de neem foi observada por Ayinde et al. (2020) pois os autores ressaltam que a mortalidade aumentou progressivamente com o tempo de teste devido à ação do óleo de neem, as larvas que não morreram sofreram inibição na formação de pupas e redução do movimento corporal, além disso os efeitos larvicidas de óleo de neem emulsificado em larvas do terceiro e quarto instar de *Anopheles gambiae*,

em ensaio de 120 horas de exposição, determinou o CL₅₀ e CL₉₀ em 723 e 1971 mg/L, respectivamente.

É conhecido a eficácia do óleo de neem como larvicida e pesticida (BENELLI et al., 2017; CAMPOS et al., 2016; FERNANDES et al., 2019) assim como a sua baixa toxicidade em organismos não-alvo (BRAGA et al., 2021). Além disso o óleo de neem apresenta chances de resistência dos insetos reduzida, pois apresenta uma variedade de constituintes e assim modo múltiplo de ação (BENELLI et al., 2017).

Contudo, adequações à formulação desenvolvida nesse projeto, assim como análises complementares são necessários. Estudos histológicos, crônicos e de campo podem auxiliar as nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem em um potencial larvicida.

4. CONCLUSÃO

A partir do trabalho realizado é possível concluir que a escolha da lignina como polímero para preparo de nanopartículas contendo óleo de neem é promissora. Os dados de caracterização e de estabilidade físico-química, bem como os ensaios de liberação demonstram que as nanopartículas podem modificar o perfil de liberação do neem. As nanocápsulas poliméricas a base de lignina de núcleo lipídico desenvolvidas e caracterizadas nesse trabalho, apresentam um potencial sistema carreador para óleos, visto que lignina e nanocápsulas sem ativos não apresentaram toxicidade significativa nos organismos (*Daphnia magna*, *Danio rerio* e *Chironomus riparius*). Os resultados obtidos com as nanocápsulas contendo óleo de neem abrem perspectivas para seu uso como possível larvicida com menos impactos ao ambiente, visto que os dados de citotoxicidade e ecotoxicidade em organismos não-alvo sugerem baixa toxicidade, ensaios crônicos e de campos são necessários para maior realidade ecológica. Embora emulsão e nanocápsula contendo óleo de neem tenham apresentado resultados semelhantes quanto a toxicidade é importante ressaltar que apenas as nanocápsulas apresentaram maior atividade larvicida, além disso, a emulsão não apresenta o mesmo perfil de estabilidade, sofrendo alterações físico-química significativas em função do tempo, sendo necessário alterações na formulação para adequar a estabilidade das emulsões. A atividade biológica em larvas de *Aedes aegypti* deve mais aprofundada a fim de se obter mais informações sobre os mecanismos de ação em larvas a fim de se desenvolver larvicidas mais eficazes para controles de vetores.

MATERIAL SUPLEMENTAR

NANOLARVICIDAS A BASE DE LIGNINA CONTENDO ÓLEO DE NEEM COMO UMA ALTERNATIVA DE BAIXA TOXICIDADE PARA CONTROLE DE PROPAGAÇÃO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Tabela 1S: Eficiência de encapsulação ao longo de 120 dias (0,7, 15, 30, 90 e 120 dias) através do método espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian). Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico sem ativos contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM).

	0 DIAS	7 DIAS	15 DIAS	30 DIAS	90 DIAS	120 DIAS
NPLC_NEEM (%)	99± 0,21	98,3±0,08	98,2±0,49	97,9±0,03	97,7±0,15	96,9±0,15

Tabela 2S: Coeficientes obtidos como os modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer -Peppas nas formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de neem 3% (NPNL_NEEM) e emulsão de neem 3% (EM_NEEM).

	Modelos Matemáticos								
	Ordem-Zero		Primeira-Ordem		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	k (h ⁻¹)	r^2	K (h ⁻¹)	r^2	k (h ^{-1/2})	r^2	K (h ⁻¹)	N	r^2
NPNL_NEEM	0,4924	0,8491	0,002437	0,5535	0,4360	0,9503	2,162	2,184	0,8782
EM- NEEM	0,7224	0,7470	0,001812	0,5931	0,9795	0,8974	3,018	2,707	0,9426

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CARREADAS COM ÓLEO DE RÍCINO E COM A COMBINAÇÃO DE ÓLEO DE RÍCINO E ÓLEO DE NEEM

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é conhecido como vetor de arbovírus como dengue, zika, chikungunya e febra amarela, que causam milhares de infecções anualmente e torna seu controle uma questão de saúde pública mundial. É conhecido a atividade larvívora dos óleos de neem (*Azadirachta indica*), assim como do óleo de rícino (*Ricinus communis*). Visamos nesse trabalho inovar na combinação de dois diferentes compostos botânicos, extraídos de diferentes espécies e com propriedades potencialmente sinérgicas. Neste cenário foi proposto uma formulação larvívora, preparamos e caracterizamos nanocápsulas de lignina contendo óleo de rícino e também nanocápsulas carregadas com a combinação de óleo de rícino e óleo de neem. A média das análises demonstraram boa estabilidade para o período de 120 dias, obtendo os resultados para as nanocápsulas carregadas com óleo de rícino e com a combinação dos óleos, respectivamente: distribuição de tamanho de 258 ± 13 nm e 245 ± 8 , índice de polidispersão $0,140 \pm 0,01$ e $0,124 \pm 0,01$, potencial zeta -46 ± 2 mV e -47 ± 3 . Foi realizado estudos de citotoxicidade e genotoxicidade (células HaCaT e *Allium Cepa*), assim como de ecotoxicidade em organismos não-alvo (*Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Chironomus riparius* e *Caenorhabditis elegans*), nanocápsulas carregadas com a combinação dos óleos foi a formulação que apresentou maior toxicidade nos ensaios. As formulações não apresentaram atividade larvívora nas concentrações estudadas, visto que não foi observado mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* durante o ensaio. Ensaios complementares e modificações na composição das formulações são necessários, pois assim pode se diminuir a toxicidade e aumentar a atividade biológica.

Keywords: *Ricinus communis*; *Azadirachta indica*; *Aedes aegypti*.

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é conhecido como vetor de arbovírus como dengue, zika, chikungunya e febra amarela, que causam milhares de infecções anualmente e torna seu controle uma questão de saúde pública mundial (MARTÍNEZ RODRÍGUEZ et al., 2022). A abordagem comumente utilizada para controle do mosquito inclui adulticidas e larvicidas químicos, porém o uso excessivo de produtos químicos tem gerado resistência em *Aedes aegypti*, assim como efeitos adversos ao meio ambiente. Estudos recentes buscam alternativas entre os controles biológico, genético e químico (VONTAS et al., 2012; WILDER-SMITH et al., 2017a).

É conhecido a atividade larvicida dos óleos de neem (*Azadirachta indica*) (BENELLI et al., 2017), assim como do óleo de rícino (*Ricinus communis*) (KUMAR, 2017), a utilização de compostos naturais torna-se uma alternativa promissora por indicar menos toxicidade ao meio ambiente, aliado a isso compostos que apresentam diversos componentes ativos possibilitam diferentes modos de ação, diminuindo as chances de resistência do vetor (DA SILVA SÁ et al., 2022).

Destaca-se a formulação com a combinação dos ativos, pois é esperado que a mistura de compostos ativos possa aumentar o espectro de controle, reduzindo as possibilidades de surgimento de insetos resistentes. A utilização de princípios químicos que atuam através de mecanismos de ação distintos, pode aumentar a efetividade no controle do inseto (LIU et al., 2021).

Aliado a isso, o uso de nanotecnologia apresenta características promissoras para controle de pragas, sendo pois com a liberação modificada é possível reduzir a quantidade de ativo, diminuindo os riscos de gerar toxicidade a organismos não-alvo e resistência do vetor (CAMPOS et al., 2020). Sistemas baseados em compostos biodegradáveis é uma opção ambientalmente interessante, desse modo, utilizar no preparo de nanocarreadores, biopolímeros como a lignina, que são muitas vezes produtos ou subprodutos de resíduos do processo de produção do segmento agroindustrial, agrega valor a bioeconomia e fornece produtos mais sustentáveis (SCHNEIDER; DILLON; CAMASSOLA, 2021).

Apesar de encontrarmos já algumas patentes e artigos que demonstram a atividade desses óleos contra *Aedes aegypti* (DAMIANI et al., 2019; FOO-HURWITZ et al., 2020), bem como, sistemas baseados em nanotecnologia para aplicações contra arboviroses (BERNARDES et al., 2017; NOVAK et al., 2019). Visamos nesse projeto inovar na combinação de dois diferentes compostos botânicos, extraídos de diferentes espécies e com propriedades potencialmente sinérgicas. Resultados obtidos com nanoencapsulação apenas do óleo de neem são descritas no capítulo 2.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Lignina foi adquirida da Sigma-Aldrich. O óleo de neem (Azamax) contendo 12 g/mL de azadiractina foi adquirido da UPL Brasil. Óleo de rícino foi adquirido pela Gran Oils Brasil. Clorofórmio foi obtida Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil). Myritol líquido foi adquirido da BASF. A linhagem celular HaCaT (queratinócitos humanos) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Duque de Caxias, Brasil). As sementes de *Allium cepa* foram adquiridas da Isla sementes (empresa brasileira). Cordas de ovos de *Chironomus riparius*, ovos de *Danio rerio* e *Daphnia magna* foram coletadas de culturas de laboratório estabelecidas na Universidade de Aveiro, Portugal. As cepas *Caenorhabditis elegans* foram adquiridas do Caenorhabitis Genetics Center, Minnesota, EUA. Larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller e colonizados no Laboratório de Genômica funcional & Microbiologia de Vetores/LACEM.

2.4 Preparo e caracterização das nanocápsulas

2.4.1 Preparo das nanocápsulas de lignina

As nanocápsulas de lignina foram preparadas em temperatura ambiente e com adaptações conforme o método de extração de solvente descrito por (SCHNEIDER; DILLON; CAMASSOLA, 2021). Sendo assim, o método utilizado consistiu em preparar inicialmente a fase orgânica, constituída por 1% do lipídio myritol e 3% de óleo de rícino e/ou neem diluídos em clorofórmio. Na sequência esta fase orgânica foi misturada mecanicamente através de turrax (14.000 rpm) com a fase aquosa, constituída por 5mg/mL de lignina dissolvida em água. As formulações foram rotaevaporadas ao volume final de 25 mL, sendo a concentração final de óleo de neem 3% (m/v).

2.4.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas

A distribuição do tamanho médio e o índice de polidispersidade das nanocápsulas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). O potencial zeta foi definido pelo método de microeletroforese. análises foram realizadas usando um sistema ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) em um ângulo fixo de 90° e 25°C, após diluição das amostras em água deionizada (Milli-Q). Todas as medidas foram realizadas em triplicata em um intervalo de 0,7,15,30,60,90 e 120 dias.

2.4.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do óleo de rícino e/ou neem nas nanocápsulas de lignina foi quantificada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, com análise em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian). As amostras foram centrifugadas usando ultrafiltro de celulose regenerada Microcon 10 kDa (Millipore), que permitiram apenas a passagem do óleo não encapsulado.

2.4.4 Cinética de liberação *in vitro*

A cinética de liberação *in vitro* foi avaliada empregando sistemas de dois compartimentos, os quais foram separados por uma membrana de acetato de celulose com poro de exclusão de 1 kDa (Millipore®). Um mL das diferentes formulações foi adicionado no compartimento doador enquanto o compartimento receptor foi preenchido com água em condição de diluição *sink*. Em tempos pré-determinados alíquotas foram retiradas e a concentração dos ativos liberado foi quantificado por análise em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian). O mecanismo de liberação dos ativos a partir das nanopartículas foi avaliado a partir dos modelos matemáticos de ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (COSTA; LOBO, 2001).

2.5 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados com sistemas contendo nanocápsulas com óleo de rícino e/ou neem, para realizar uma comparação com o óleo de rícino e/ou neem, devido à sua baixa solubilidade, foi preparada uma emulsão. No entanto, cabe ressaltar que uma emulsão também é um sistema carreador, no entanto esta é a única opção de comparação a ser realizada. Desta forma, os resultados a serem encontrados com a emulsão de rícino/neem, não necessariamente são o reflexo apenas do óleo e sim do sistema como um todo. Tal estratégia já foi publicada previamente em outros estudos (PŁACZEK et al., 2019; ROGERIO et al., 2022).

2.3.1 Viabilidade celular de acordo com a atividade mitocondrial (teste MTT)

Os ensaios foram realizados com linhagem celulares de queratinócitos (HaCaT). Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços numa densidade de 1×10^4 células, e incubadas a 37 °C, a 5% CO₂ por 24 horas. Após este período o meio foi removido e substituído por meio fresco (200 µL) contendo MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazólio) (20 µL, 5mg.mL⁻¹) e a placa foi incubada por 4

horas (37°C, 5% CO₂). Imediatamente após a incubação, o sobrenadante foi removido, os cristais de formazan foram dissolvidos com 0,1M HCl em isopropanol e a absorbância foi medida usando leitor de placa (SpectraMax M5) a 570 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (\text{Equação 1}).$$

onde Abs_{amostra} e Abs_{controle} representam a absorbância da cultura celular na presença e na ausência de tratamento, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.1 Genotoxicidade usando ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Singh et al. (1988). Após exposição de 1 hora, as células foram homogeneizadas com agarose de baixo ponto de fusão a 0,8% e aplicadas em lâminas recobertas com agarose comum a 1,5%, as quais foram cobertas com lamínulas e refrigeradas por 10 minutos, após a solidificação as lâminas passaram por solução de lise por 1 hora, e corrida de eletroforese por 20 minutos (22V, 10W e 300mA), seguidas de coloração com prata por 35 minutos. As lâminas foram preparadas em triplicatas. A análise das lâminas foi realizada por “*scoring visual*” classificando-se os danos em categorias de 0 a 4. Foram analisadas aleatoriamente cerca de 100 células por lâmina em microscópio ótico (aumento 40x). O índice de danos (ID) foi obtido conforme pela Equação 2.

$$\text{Índice de Danos} = \text{Total de dano observado} / \text{Total de células analisadas} \quad (\text{Equação 2})$$

2.3.3 Ensaio de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*

Inicialmente, sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar e ao atingirem dois centímetros, as raízes foram expostas por 24 horas. Após esse período, as raízes foram fixadas com Carnoy - álcool etílico e ácido acético (3:1 v:v) e mantidas em geladeira por 24 horas. Em seguida, foram submetidas à hidrólise com ácido clorídrico (1M) em banho-maria a 60 °C por 9 minutos e coradas com reativo de Schiff, por 2 horas, na ausência de luz. As lâminas foram preparadas cortando-se a região meristemática das raízes, corando com Carmum acético 2% e esmagando sob a lamínula. Para as análises foram realizadas contagem de cerca de 1000 células por raiz, considerando as fases da divisão celular e as alterações cromossômicas presentes nessas fases. Para a obtenção dos Índices Mitótico (IM) (Equação 3) e Índice de Alterações (IA) (Equação 4) e ambos os parâmetros relativos ao controle negativo (Equações 5 e 6).

$$\text{IM} = \text{Total de células em divisão} / \text{Total de células contadas} \quad (\text{Equação 3})$$

$IA = \text{Total de alterações encontradas} / \text{Total de células em divisão}$ (Equação 4)

$IM_{rel} = IM \text{ do tratamento} / IM \text{ do controle negativo}$ (Equação 5)

$IA_{rel} = IA \text{ do tratamento} / IA \text{ do controle negativo}$ (Equação 6)

3.4 Avaliação da toxicidade em organismos não-alvo

2.4.1 Crustáceo *Daphnia magna*

Um teste de imobilização aguda foi realizado de acordo com a diretriz da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD 202 (OECD, 2004). Em cada repetição, cinco neonatos foram expostos em tubos de ensaio de 10 mL, em um total de cinco repetições por concentração/tratamento de controle, em uma faixa de concentrações de larvicidas durante 48 horas sem alimentos e sob condições de cultura. Um controle negativo apenas com American Society for Testing and Materials (ASTM) também foi configurado. A mortalidade foi registrada em 24 e 48 horas, considerados mortos quando, agitando suavemente o frasco de teste, nenhum movimento de natação for visível.

3.4.1 Embriões Peixe-zebra *Danio rerio*

O teste de toxicidade aguda de embriões de peixes (FET) foi realizado seguindo a diretriz OECD 236 (OECD, 2013) e a metodologia descrita por Lammer et al., (2009), com adaptação. Os ovos foram coletados dentro de 30 minutos após o acasalamento natural de peixes adultos, lavados em Fish System Water (FSW) e selecionados usando um estereomicroscópio (Stereoscopic Zoom Microscope-SMZ 1500, Nikon Corporation) para excluir ovos não fertilizados, embriões feridos, embriões com irregularidades durante a clivagem ou ovos opacos. O teste foi realizado em placas de Petri com 50 mm de diâmetro por 96 horas em condições de cultura, contendo ≈ 15 mL de cada concentração dos larvicidas; com 10 ovos por repetição em um total de três réplicas, 30 ovos por tratamento. Um controle negativo apenas com FSW também foi configurado. A mortalidade (falta de batimento cardíaco e embriões coagulados) e o sucesso da eclosão foram verificados a cada 24 horas durante a duração do teste. Malformações morfológicas dos embriões e larvas, como não desprendimento da cauda, ausência de formação de somitos e presença de edema, também foram acompanhadas. As porcentagens de mortalidade, eclosão e desenvolvimento anormal foram calculadas ao final do teste (96 horas).

3.4.2 Mosquito *Chironomus riparius*

O teste agudo de imobilização em *Chironomus riparius* foi realizado seguindo a diretriz OCDE 235 (OECD, 2011). As culturas foram mantidas a 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 16:8 horas claro/escuro, caixa de acrílico, com as larvas em recipientes plásticos com 1–2 cm de areia fina inorgânica (queimada a 500 °C durante 4 horas) e meio de American Society for Testing and Materials (ASTM) na proporção de 1:4. O meio foi aerado, trocados a cada semana e os organismos foram alimentados três vezes por semana com Tetramin® macerado (TetraWerk, Melle, Alemanha). Os ovos de *Chironomus riparius* foram separados para acompanhar garantir a idade correta das larvas. Para o teste cinco larvas do primeiro instar com <24 horas foram adicionadas por concentração/repetição. A mortalidade foi registrada em 24 e 48 horas, considerados mortos quando, agitando suavemente o frasco de teste, nenhum movimento de natação for visível.

3.4.3 Neomatódeo *Caenorhabditis elegans*

A cepa N2 (Tipo selvagem) de *C. elegans* mantida em placas contendo o meio NGM (*nematode growth média*) enriquecido com sais e bactérias *E. coli* OP50, a 20°C foram utilizadas para a sincronização dos nematóides, aonde estes foram lisados com uma solução de lise (NaOCl 1%, 0,25 M NaOH) para a obtenção dos ovos. Os ovos foram lavados e em seguida foram incubados em placas contendo o tampão M9 (0,02 M KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 0,04M, NaCl 0,08M e MgSO_4 0,001M) sem bactéria por 14 horas, até a eclosão das larvas em estágio L1. Os vermes em estágio L1 foram expostos de maneira crônica às concentrações de 0,15, 0,3, 0,9, 1,5 e 3mg/mL das formulações por 48 horas em meio NGM com *E. Coli* OP50. Após 48 horas da exposição foi avaliada a taxa de sobrevivência dos animais tratados em relação ao grupo controle. A população de vermes foi estimada através da contagem de uma área delimitada por quadrantes, utilizando o estereomicroscópio. Os resultados da contagem de animais sobreviventes foram normalizados pelo total de vermes do controle para determinar a taxa de sobrevivência. O número de animais vivos por tratamento foi normalizado pela porcentagem de controle e esses valores foram usados em uma regressão linear-sigmoidal dose-resposta para construir uma curva de sobrevivência. Todos os experimentos foram realizados três experimentos independentes em duplicatas.

Os vermes tratados que atingirem o estágio L4 foram coletados e lavados para retirar o excesso de bactéria e em seguida foram colocados em lâminas de microscópio e

resfriados a -20 °C para paralisá-los. A área corporal dos vermes foi medida com o auxílio do software ImageJ (Madison, WI, EUA). Os valores obtidos foram normalizados para porcentagem em relação ao grupo controle e utilizados na análise estatística. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes.

3.5 Atividade biológica

2.5.1 Atividade larvívica em larvas de *Aedes aegypti*

Os testes de atividade larvívica foram realizados seguindo o protocolo das Diretrizes para testes de laboratório e de campo de larvívicas de mosquitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Estes ensaios foram realizados em câmaras com ambiente controlado, mantendo os padrões de temperatura de 28 ± 1 °C, com umidade de $80 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro. Os experimentos ocorreram no Laboratório de Genômica Funcional & Microbiologia de Vetores (Vectomics) localizados na UNESP de Botucatu em colaboração com o grupo do Dr. Jayme Souza Neto (Unesp/Botucatu).

Em cada réplica dos experimentos, foram utilizadas 25 larvas de *Aedes aegypti* de 3º Ínstar tardio em copos plásticos contendo 100 mL de água deionizada e os produtos testados. A mortalidade larval foi avaliada em 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos produtos. As concentrações dos produtos avaliadas foram de 500, 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000 mg/L em 4 réplicas. O grupo controle negativo, contendo apenas as larvas e a água, também foi incluso.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 6, utilizando ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Tukey, com nível de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

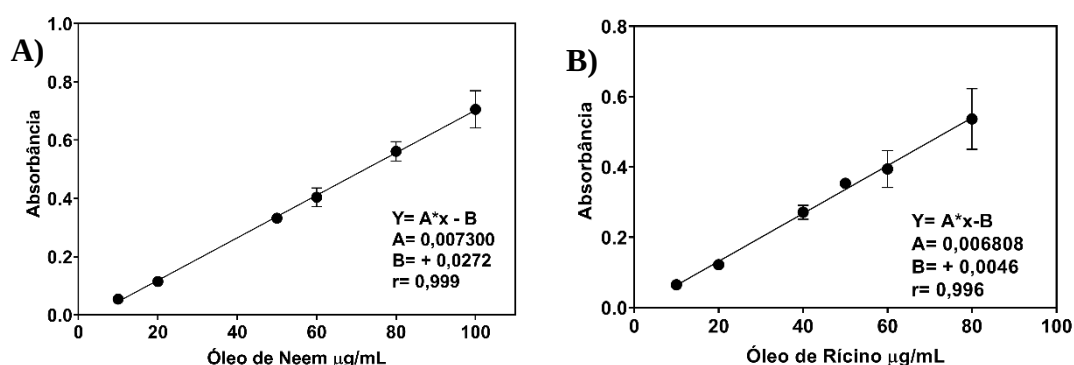
3.1 Desenvolvimento de Nanocápsulas Poliméricas de Núcleo Lipídico (NPNL) e sua caracterização

Visando uma formulação alternativa para uso larvívica contra *Aedes aegypti* se desenvolveu nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (NPNL), pelo método de emulsificação - evaporação do solvente, desse modo, com as adaptações na metodologia de preparo foi possível formular nanocápsulas de parede polimérica

(utilizando o biopolímero lignina) contendo um núcleo de óleo (óleo de rícino e óleo de neem) (SCHNEIDER; DILLON; CAMASSOLA, 2021).

A eficiência de encapsulação do óleo de neem nas nanocápsulas de lignina foi quantificada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, com análise em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian). A faixa de concentração da curva analítica foi de 10 a 100 µg/mL, após uma varredura entre 200 e 800 nm detecção empregou um comprimento de onda de 226 nm, valor próximo ao descrito por Pascoli et al. (2020), de 225 nm. Após a varredura entre 200 e 800 nm do óleo de rícino, foi realizada uma curva analítica foi de 10 a 100 µg/mL em 206 nm, sendo aqui quantificado a presença do óleo, que por ser um produto comercial e com outros componentes, interferiu no comprimento de onda característico do ácido rícinoico.

Figura 1: Curva Analítica dos óleos de neem e rícino com concentrações variando entre 10 µg/mL e 100 µg/mL, os valores correspondem a média e desvio padrão (n=3) de 3 curvas diferentes. A) Curva do óleo de neem realizada em solução hidroalcolica 70%, leitura em 226 nm. B) Curva do óleo de rícino realizada em solução hidroalcolica 90%, leitura em 206 nm.



Os parâmetros físico-químicos foram analisados ao longo de 120 dias (0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Desse modo, o diâmetro médio e o Índice de Polidispersão (PDI) foram avaliados pelo método de Dinamic Light Scattering (DLS) e o Potencial Zeta (PZ) foi avaliado por microeletroforese.

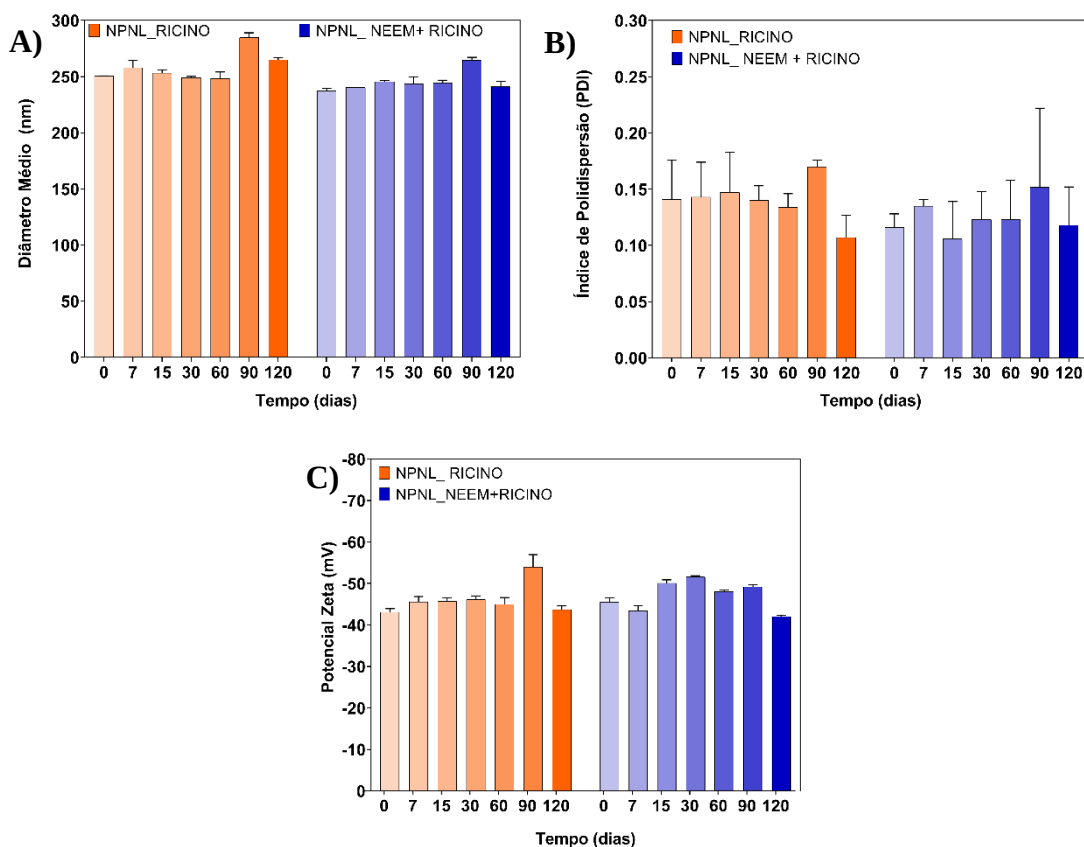
A média dos diâmetros médios (nm) destas formulações de NP NL encapsuladas com óleo de neem 3% mais óleo de rícino 3% nos respectivos períodos foram: 237 ± 2 nm; $240 \pm 0,1$ nm; 245 ± 1 nm; 243 ± 6 nm, 244 ± 2 nm, 264 ± 2 nm, e 241 ± 5 (Figura 2A). Da mesma maneira o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (PZ) foram analisados. A média das análises obtidas no período apresentaram polidispersão 0,125

$\pm 0,01$ e potencial zeta $-47,1 \pm 3,5$, indicando boa estabilidade e homogeneidade das formulações contendo a combinação dos óleos.

Os resultados corroboram com as informações descritas na literatura a respeito de nanopartículas de ligninas, conforme visto no estudo de Zikeli et al., (2020), que realizou o encapsulamento dos óleos essenciais em nanopartículas de lignina, sendo os óleos de casca de canela, tomilho comum e tomilho selvagem, seus diâmetros médio foram 346 ± 5 nm, 244 ± 3 nm e 369 ± 3 nm, respectivamente. O índice de polidispersão dessas formulações também se apresentaram inferior a 0,2.

Yaqoob et al., (2021) avaliou o potencial zeta de nanopartículas de lignina a partir de óleo de palma, de modo que manteve-se o perfil de carga negativa da lignina, devido aos seus grupos funcionais, mas apresentou variação na estabilidade conforme a diferença na velocidade do homogeneizador no preparo, sendo mais estáveis as que tiveram potencial zeta igual ou superior a 30 mV.

Figura 2: Análise das formulações ao longo de 120 dias (0,7, 15, 30, 60 e 120 dias) através de métodos Dynamic Light Scattering (DLS) (A e B), e Microeletroforese (C). Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico carregada com óleo de rícino 3% (NPNL_RICINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPNL_NEEM+RICINO).

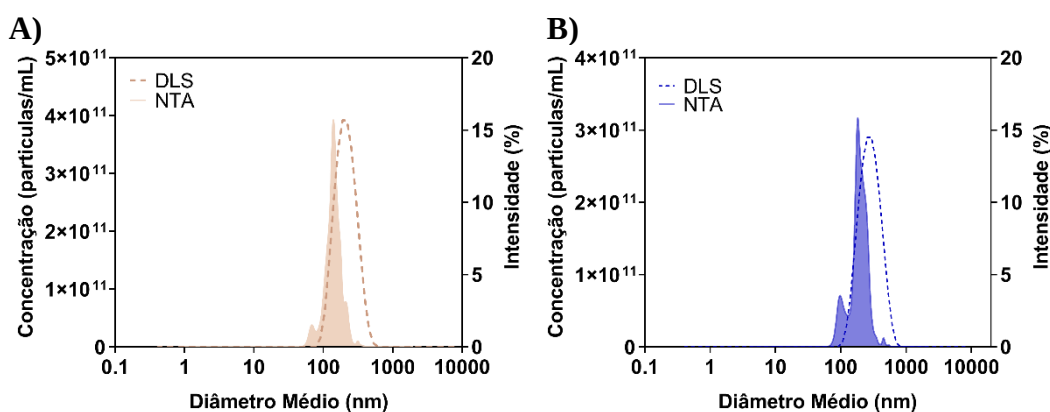


Além disso, foi feita uma análise comparando todos os parâmetros citados acima entre os NPNLs com a combinação dos ativos óleo de neem + rícino e sem ativo (Tabela 1). A distribuição de tamanho foi avaliada tanto em relação a concentração de nanocápsulas (partículas/mL) através do Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) quanto a intensidade (%) por Dynamic Light Scattering DLS (Figura 3). O diâmetro médio dos NPNLs com a combinação dos ativos neem+rícino apresentou-se maior comparados aos NPNLs sem ativos, indicando a presença dos óleos no interior das nanocápsulas. No geral, todos os parâmetros foram parecidos e ambas as partículas se mostraram estáveis quando avaliadas durante 60 dias.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos dos nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (NPNLs) com combinação ativos (Neem 3% + Rícino 3%) e sem ativos. As análises foram feitas por Dinamic Light Scattering (DLS), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) e microeletroforese.

NPNLs	Diâmetro Médio (nm)	PDI	PZ (mV)	Concentração (partículas/mL)
Sem ativos	194 ± 1	0,130±0,003	-39,6 ± 1,9	2,65x10 ¹³ ±7,41x10 ¹¹
Com ativos	240 ± 5	0,149±0,02	-49,1±1,0	3,45x10 ¹³ ±3,56x10 ¹²

Figura 3: Distribuição do diâmetro médio das nanocápsulas em relação a concentração Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) e em relação a intensidade Dinamic Light Scattering (DLS). A) Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (NPNLs) sem ativos; B) Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (NPNLs) com a combinação dos ativos óleo neem 3%+ óleo de rícino 3%.



A eficiência de encapsulamento foi calculada inicialmente pela subtração do valor de background da lignina e pela diferença entre a quantidade de óleo inicialmente adicionada e a quantidade obtida no filtrado. A eficiência de encapsulação (EE) dos óleos neem e rícino foi avaliada ao longo de 0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias, sendo os valores de EE (%) do óleo de neem na formulação com a combinação dos óleos foram de $99,7 \pm 0,06\%$; $99,2 \pm 0,40\%$; $98,7 \pm 0,12\%$; $98,6 \pm 0,22\%$; $98,0 \pm 0,19$ e $89,4 \pm 0,38$ respectivamente. Já para o óleo de rícino os valores de EE (%) foram de $95,9 \pm 0,89\%$; $94,8 \pm 0,04\%$; $94,4 \pm 0,83\%$; $93,8 \pm 0,29\%$; $93,0 \pm 0,04\%$ e $84,59 \pm 1,67\%$, respectivamente para cada tempo (Tabela 2).

Derivados de *Ricinus communis* são amplamente estudados como percussores de nanopartículas metálicas (SHOBHA et al., 2019; SINGH et al., 2012; SONI; DHIMAN, 2017), outros estudos reportam o encapsulamento do ácido rícinoléico provenientes da extração do óleo de rícino com alta eficiência de encapsulação alcançando 90% com boa estabilidade (AZEEM; NADA, 2015; NADA et al., 2016).

Tabela 2: Eficiência de encapsulação (%) ao longo de 120 dias (0,7, 15, 30, 90 e 120 dias) através do método espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian). Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico sem ativos contendo óleo de rícino 3% (NPLC_RÍCINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPLC_NEEM+ RÍCINO).

	0 DIAS	7 DIAS	15 DIAS	30 DIAS	90 DIAS	120 DIAS
NPLC_RÍCINO (%)	$96,4 \pm 0,09$	$95,3 \pm 0,49$	$92,4 \pm 3,12$	$90,7 \pm 0,87$	$89,0 \pm 1,0$	$88,3 \pm 0,47$
NPLC_NEEM + RÍCINO (%)	$99,7 \pm 0,06$	$99,2 \pm 0,40$	$98,7 \pm 0,12$	$98,6 \pm 0,22$	$98,0 \pm 0,19$	$89,4 \pm 0,38$
	$95,9 \pm 0,89$	$94,8 \pm 0,04$	$94,4 \pm 0,83$	$93,8 \pm 0,29$	$93,0 \pm 0,04$	$84,59 \pm 1,67$

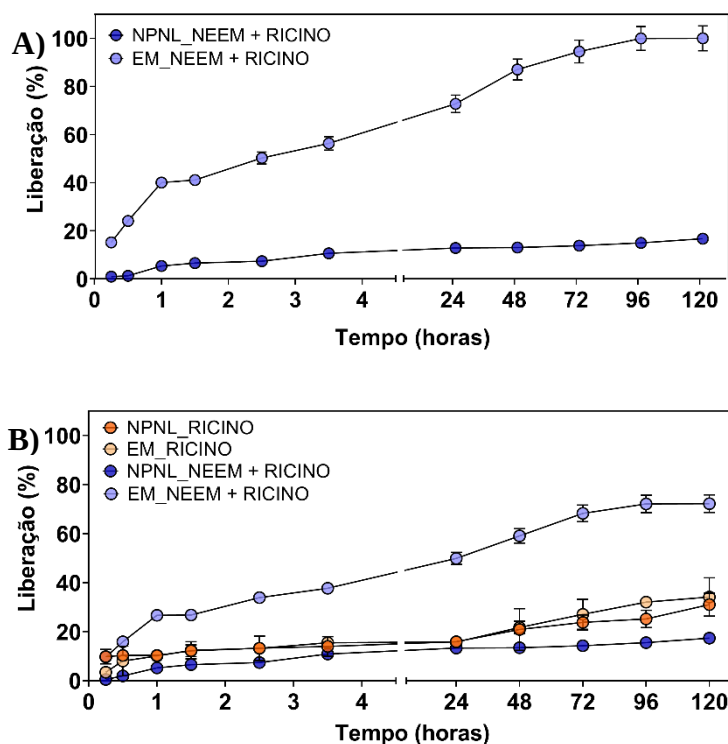
3.2 Cinética de liberação *in vitro*

As formulações foram também caracterizadas em relação ao perfil de liberação dos larvicidas, realizados de acordo com Lai et al. (2006), com modificações. A quantidade de larvicida liberado foi quantificada através de espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian), sendo os resultados expressos em porcentagem. O ensaio foi realizado a 25 °C e em triplicata. O ensaio de liberação teve duração de 5 dias, alcançando 120 horas, visando assim estipular o comportamento das nanocápsulas em contato com a água e em função do tempo. A formulação com a combinação dos ativos

foi a que manteve a liberação mais estável, mantendo-se abaixo de 20 % até o final do ensaio, Figura 4.

É notável que a liberação dos óleos separados apresentou perfis diferentes, o óleo de rícino apresentou valores de liberação parecidos para as formulações emulsão e nanocápsulas preparadas apenas com óleo de rícino, sendo $34,1 \pm 7,8 \%$ e $31,0 \pm 4,7\%$. Por outro lado, a combinação com o óleo de neem alterou esse perfil, a emulsão com a combinação dos ativos proporcionou a liberação de $72,1 \pm 3,6 \%$ do óleo de rícino no período total do ensaio, enquanto as nanocápsulas com a combinação dos óleos apresentou uma redução para $17,3 \pm 0,86 \%$, indicando que potencialmente as nanocápsulas poliméricas com núcleo lipídico pode proporcionar uma retenção dos óleos em seu núcleo, no entanto cabe destacar que tal hipótese precisa ser melhor investigada.

Figura 4: Ensaio de liberação das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de rícino 3% (NPNL_RÍCINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPNL_NEEM+ RÍCINO), emulsão de rícino 3 % (EM_RÍCINO) e emulsão óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (EM_NEEM+ RÍCINO). Sendo A) quantificação pela curva analítica do óleo de neem e B) quantificação pela curva analítica do óleo de rícino.



Para avaliar o perfil de dissolução/liberação foram utilizadas modelagens baseadas em diferentes modelos matemáticos de Ordem Zero, Primeira Ordem Higuchi e

Korsmeyer-Peppas. Com base nos valores de coeficiente linear (r^2) apresentados, o modelo designado por Higuchi foi o que melhor descreveu a liberação das formulações estudadas, com exceção das formulações contendo emulsão de óleo de neem, pois esta foi mais bem descrita por Korsmeyer-Peppas, conforme visto na tabela 3. O modelo Higuchi descreve que a liberação ocorre por difusão, seguindo a lei de Fick (COSTA; SOUSA LOBO, 2001).

Tabela 3: Coeficientes obtidos como os modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer -Peppas nas formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de rícino 3% (NPNL_RÍCINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPNL_NEEM+ RÍCINO), emulsão de rícino 3 % (EM_RÍCINO) e emulsão óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (EM_NEEM+ RÍCINO).

	Modelos Matemáticos								
	Ordem-Zero		Primeira-Ordem		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	k	r^2	K	r^2	k	r^2	K	N	r^2
	(h^{-1})		(h^{-1})		($h^{-1/2}$)		(h^{-1})		
NPNL-NEEM+RÍCINO	0,1017	0,6752	0,002522	0,3930	0,2017	0,8016	1,219	2,650	0,7570
EM- NEEM+RÍCINO	0,6162	0,7795	0,001332	0,5730	0,7953	0,9030	3,477	3,842	0,9091
NPNL-RÍCINO	0,1602	0,9638	0,0004065	0,9066	0,1086	0,9669	2,421	5,792	0,9395
EM-RÍCINO	0,2163	0,9097	0,001312	0,6501	0,2150	0,9329	2,154	3,604	0,8719
NPNL- NEEM+RÍCINO	0,1071	0,6888	0,002898	0,3580	0,2034	0,8144	1,139	2,434	0,7192
EM-NEEM+RÍCINO	0,4650	0,8139	0,001375	0,5962	0,5175	0,9247	3,058	3,600	0,9184

3.3 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados. O ensaio de viabilidade celular utilizando a técnica de redução do sal de tetrazolium (MTT) foi feito com células HaCaT (queratinócitos humanos), assim como o estudo de genotoxicidade pelo ensaio cometa. Para complementar a avaliação da toxicidade à nível multicelular também foi trabalhado com *Allium cepa*.

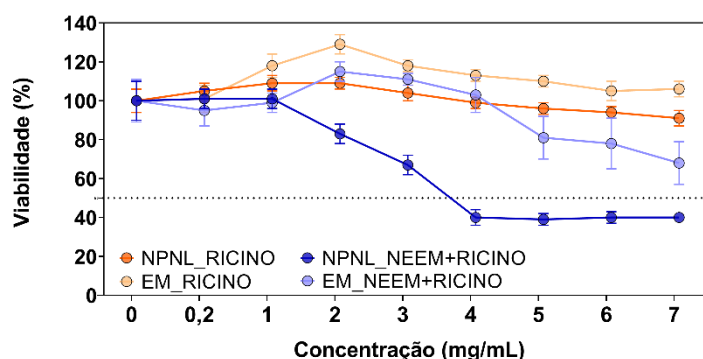
3.3.1 Viabilidade celular de acordo com a atividade mitocondrial

As formulações contendo apenas óleo de rícino, nanocápsulas e emulsão, não apresentaram redução da viabilidade celular em nenhuma das concentrações usadas no ensaio. Por outro lado, as formulações com a combinação dos óleos (neem e rícino), apresentaram diminuição na viabilidade celular conforme aumento da concentração, com destaque para as nanocápsulas que apresentaram apenas 40% da viabilidade celular na concentração 7 mg/mL, figura 5.

Tais resultados podem estar relacionados ao aumento na concentração de óleo, visto que a formulação com combinação de ativos apresenta o dobro de óleo, pois contém 3% de cada óleo, totalizando 6%. Os resultados obtidos no ensaio de liberação descrevem uma baixa liberação do óleo de rícino quando sozinho, o que pode ter colaborado para que não apresentasse alteração significativa na viabilidade celular.

Ensaio de viabilidade celular com nanoemulsões as nanoemulsões do óleo de *Ricinus communis* L. indicaram possível ação antioxidante e redução significativa da apoptose, assim como distinção entre a linhagem celular cancerosa, desse modo ocorreu redução da viabilidade celular para 4,25% após exposição a 125 ug/mL em células cancerígenas HepG2 e 55,85% após exposição a 125 ug/mL em células normais L929 (JAVANSHIR et al., 2020).

Figura 5: A porcentagem de viabilidade celular da linhagem celular HaCaT determinada pelo ensaio MTT após sua exposição as nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de rícino 3% (NPNL_RÍCINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPNL_NEEM+ RÍCINO), emulsão de rícino 3 % (EM_RÍCINO) e emulsão óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (EM_NEEM+ RÍCINO).

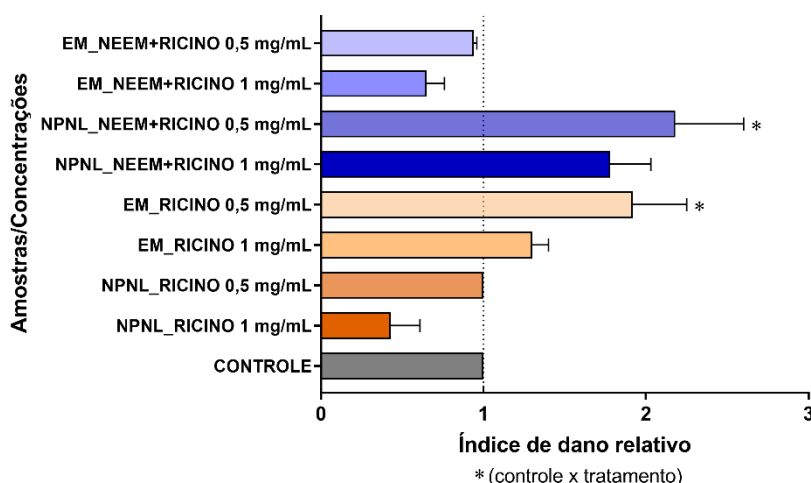


3.3.2 Genotoxicidade usando ensaio cometa

No ensaio cometa as formulações de nanocápsulas contendo óleo de neem e rícino

0,5 mg/mL e emulsão óleo de rícino 0,5 mg/mL geraram diferença significativa, comparada ao controle, conforme nível de significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA). As demais formulações apresentaram índice de dano relativo superior ao demonstrado pelo controle, mas sem diferença significativa.

Figura 6: Índice de dano celular em células HaCaT determinadas pelo ensaio cometa após sua exposição as nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de rícino 3% (NPNL_RÍCINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPNL_NEEM+ RÍCINO), emulsão de rícino 3 % (EM_RÍCINO) e emulsão óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (EM_NEEM+ RÍCINO). Nível de significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA) onde a diferença significativa em relação ao controle é representada por *.



O óleo de rícino é considerado biodegradável e não tóxico, por isso é utilizado em setores como agricultura, alimentos, têxtil, papel plástico, borracha, cosméticos, perfumarias, eletrônicos, tintas, tintas, aditivos, lubrificantes, biocombustíveis e farmacêuticos (MUBOFU, 2016).

Desse modo, não é esperado que apresente efeitos tóxicos significativos, estudos avaliam o uso de óleo de rícino em dispositivos biomédicos, os ensaios realizados por Uscátegui; Díaz; Valero, (2019) observaram que os materiais não tiveram efeito tóxico e promoveram a proliferação celular nas células de fibroblasto de camundongo L929, fibroblasto humano MRC-5 e células de fibroblasto dérmico humano adulto (HDFa), além disso, a resposta biológica avaliada após implantação em ratos Wistar indicou que não houve interferência no processo de cicatrização de feridas nem causaram efeitos adversos ou lesões graves no tecido ou órgãos.

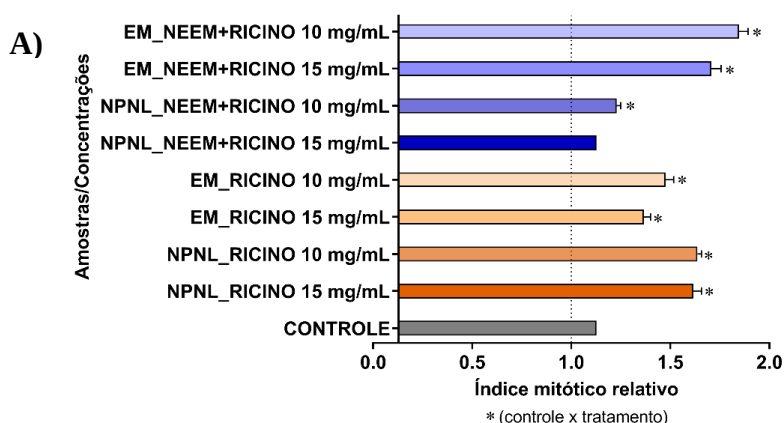
3.3.3 Ensaio de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*

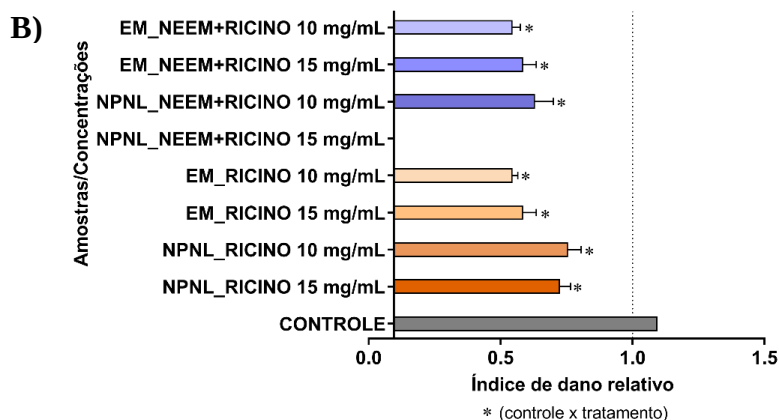
Os ensaios com *A.ceph* mostraram diferença significativa entre as formulações testadas e o controle, de modo que as formulações apresentaram maior índice mitótico relativo, quando comparadas ao controle. O índice de dano relativo diminuiu na presença das formulações em teste, quando comparado ao controle, sendo as formulações de lignina e nanocápsula controle (sem ativos) que demonstraram menor impacto em *A.ceph* (figura 7 B).

É possível que as formulações utilizadas nesse ensaio tenham atuado estimulando a divisão celular, os óleos possuem diversos fotoquímicos em sua composição e estes podem ter gerado tal resultado (YEBOAH et al., 2020)

Estudos também sugerem a presença de óleo de rícino em pesticidas, pois são seguros para as plantas em uso agrícola. Poliuretanos à base de água e óleo de rícino serviram como cápsulas para o azadiractina e formaram um sistema promissor para deposição de pulverização e retenção de pesticidas nas superfícies das plantas, exibindo resistência à chuva e proteção (ZHANG et al., 2020).

Figura 7: Resultados do ensaio de aberração *Allium cepa*: A) Valores relativos do índice mitótico para os diferentes tratamentos; B) Índice de dano relativo de raízes submetidas a tratamentos: nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de rícino 3% (NPNL_RÍCINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPNL_NEEM+RÍCINO), emulsão de rícino 3 % (EM_RÍCINO) e emulsão óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (EM_NEEM+ RÍCINO). Nível de significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA) onde a diferença significativa em relação ao controle é representada por *.





3.4 Avaliação da toxicidade em organismos não-alvo

Desse modo, é essencial avaliar os potenciais impactos que cada formulação pode causar ao ambiente, sendo assim o uso de espécies-chaves pode fornecer dados para compreender o mecanismo de interação das formulações larvicidas com organismo não-alvo no ambiente (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010).

Os ensaios foram realizados conforme as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OECD 202, 236 e 235, correspondente aos ensaios com os organismos *Daphnia magna*, *Danio rerio* e *Chironomus riparius*, respectivamente.

A determinação da concentração letal para 50% de organismos em teste (CL₅₀) foi obtida a partir do programa Minitab, onde foi considerado a concentração testada, o número de organismos em teste e o número de organismos sobreviventes.

O teste de imobilização aguda em *Daphnia magna* foi realizado conforme a diretriz de número 202 publicada no ano de 2004 pela Organização para a Cooperação do Desenvolvimento Econômico (OCDE). As formulações não apresentaram mortalidade significativa nas concentrações estudadas, sendo assim estimado que o CL₅₀ seja superior a 950 mg/mL maior concentração em teste, com exceção da formulação de nanocápsula contendo a combinação dos óleos neem + rícino que apresentou CL₅₀ de 233 ± 21 mg/L, sendo considerável a quantidade de óleo em combinação nessa nanocápsula, um dos fatores para este resultado.

O teste de toxicidade embrionária de peixes (FET) usando zebrafish (*Danio rerio*) seguiram a diretriz OECD 236, a mortalidade (falta de batimento cardíaco e embriões coagulados) e o sucesso da eclosão foram verificados a cada 24 horas durante a duração do teste (96 horas). Malformações morfológicas dos embriões e larvas, como não desprendimento da cauda, ausência de formação de somitos e presença de edema, também foram acompanhadas (OECD, 2013).

Os testes apresentaram apenas taxa de mortalidade, não houve alterações significativas no desenvolvimento ou morfologia do embrião. É estimado que o CL₅₀ da emulsão rícino seja superior a maior concentração testada, 200 mg/L, visto que durante o ensaio não foi obtido dados suficientes para a determinação da concentração letal.

Entre os organismos estudados o *Danio rerio* se mostrou o mais sensível, apresentando os menores valores de CL₅₀ sendo 104 ± 6,7 mg/mL para NPNL rícino, 197 ± 33 mg/mL para emulsão neem+ rícino e 14 ± 17 mg/mL para NPNL neem + rícino, conforme tabela 4. É visto que o tamanho de nanomateriais podem interferir no desenvolvimento de mortalidade de *Danio rerio*, sendo esses efeitos mais intensos em nanomateriais acima de 200 nm (RIZEQ et al., 2019), corroborando com os dados obtidos nesse estudo.

Estima-se que a interação dos nanomateriais com córion esteja relacionado com os efeitos tóxicos, pois os poros presentes no córion podem sofrer alterações e consequentemente modificando a entrada de substâncias ao embrião (JIA et al., 2019).

O teste de imobilização agudo (OECD, 2011) foi realizado em larvas do primeiro instar do mosquito *Chironomus riparius*, sendo essa avaliação da atividade larvívora um comparativo como organismo alvo, *Aedes aegypti*.

É esperado que larvas do primeiro instar sejam mais sensíveis aos demais estágios do desenvolvimento, porém nesse estudo, as larvas do *Chironomus riparius* mostrou-se o organismo mais resistente entre os ensaios realizados, visto que não apresentou mortalidade significativa entre as concentrações estudadas, de modo que é estimado que o CL₅₀ seja superior a maior concentração estudada, 720 mg/L.

Tabela 4: Comparativo da concentração letal 50% (CL₅₀) entre os organismos testados *Daphnia magna*, *Danio rerio* e *Chironomus riparius* para as formulações: nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de rícino 3% (NPNL_RÍCINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPNL_NEEM+ RÍCINO), emulsão de rícino 3 % (EM_RÍCINO) e emulsão óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (EM_NEEM+ RÍCINO).

	CL ₅₀ (mg/L)		
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Chironomus riparius</i>
Emulsão Rícino	>950	>200	>720
NPNL Rícino	>950	104±6,76	>720
Emulsão Neem+ Rícino	>950	197±33	>720
NPNL Neem + Rícino	233±21	14±17	>720

Os resultados obtidos apresentam CL₅₀ em altas concentrações, que dificilmente estariam disponível em condições ambientais (TURAN et al., 2019). É provável que o tempo de exposição tenha sido um fator importante para esses resultados, visto que os valores de CL₅₀ para *Danio rerio* foram menores que para os demais organismos, de modo que, também foi o teste mais longo, com 96 horas de avaliação.

É conhecido aumento da atividade larvívora de extratos de *Ricinus communis* com aumento do tempo de exposição e consequentemente aumento da concentração (WAFA et al., 2014). A toxicidade aguda de três biodiesel à base de plantas foi investigada usando *Daphnia magna* durante um período de 96 horas. Durante o estudo verificou-se que óleo de rícino teve a toxicidade crescente em fator do tempo, com CL₅₀ de 189 µg/mL em 48 h e 509 µg/mL em 96 h (BAMGBOSE; ANDERSON, 2018).

Por outro lado, é observado que nanopartículas possuem uma tendência maior a gerar quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio, que consequentemente podem gerar danos causando apoptose ou mesmo mutagênese (YU et al., 2020b). Para confirmar as hipóteses do mecanismo de toxicidade e compreender o processo de interação entre as NPNL e os organismos aquáticos estudos complementares devem ser avaliados.

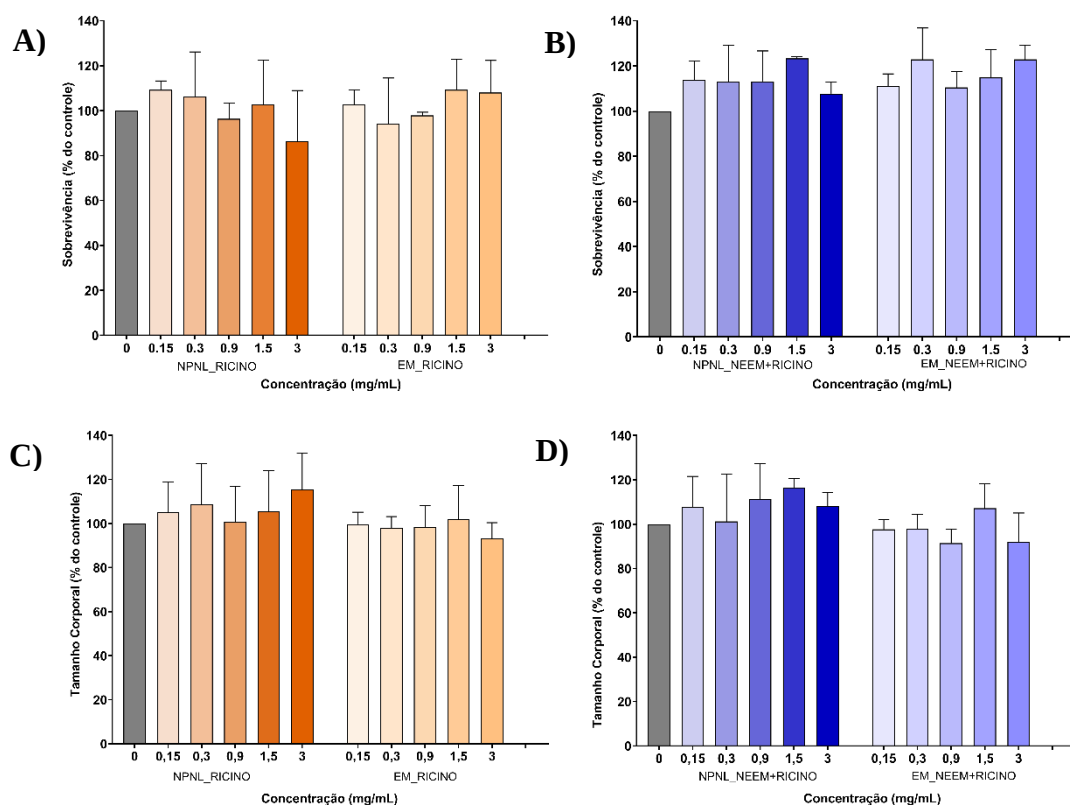
O nematoide *Caenorhabditis elegans* também foi estudado como organismo não-alvo, o resultado dos ensaios realizados em *C. elegans* são apresentados na figura 8. Podemos observar que as formulações testadas não apresentaram mortalidade significativa aos organismos (figura 8 A e B), da mesma forma não houve alteração no desenvolvimento dos organismos, conforme visto na figura 8 C e D, pois as formulações não alteraram a área corporal dos organismos testados.

Tais resultados abordam apenas os parâmetros agudos das respostas dos organismos, sendo necessário avaliar a toxicidade crônica, assim como estabilidade, degradação e comportamento das nanocápsulas no ambiente, para então obter maior compreensão sobre os sistemas desenvolvidos (BENELLI et al., 2018).

Estudos sugerem que compostos naturais sejam menos tóxicos para organismos não-alvo. O cinamaldeído, principal componente da canela *Cinnamomum cassia* Presl, indicou mortalidade de *C. elegans* dependente da concentração, sendo necessário 800 mg/L por 4 horas para alcançar 100% de mortalidade (LU et al., 2020).

Ensaios com o óleo volátil de ginseng inseridos à dieta de *C. elegans* do tipo selvagem N2, indicaram potencial capacidade antioxidante, prolongando a vida útil e a saúde dos nematoides (WANG et al., 2022)

Figura 8: Ensaio de toxicidade usando *C. elegans* exposto por 48 h a 0,15; 0,3; 0,9; 1,5 e 3 mg/mL de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de rícino 3% (NPNL_RÍCINO) e combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (NPNL_NEEM+RÍCINO), emulsão de rícino 3 % (EM_RÍCINO) e emulsão óleo de neem 3% + óleo de rícino 3% (EM_NEEM+ RÍCINO). Taxa de sobrevivência (A e B). Tamanho corporal (C e D). Nível de significância de $P < 0,05$ (two-way ANOVA) onde a diferença significativa em relação ao controle é representada por *.



3.5 Atividade biológica

Testes de atividade larvicida foram realizados seguindo o protocolo das Diretrizes para testes de laboratório e de campo de larvicidas de mosquitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Os ensaios foram realizados em colaboração com o grupo do Dr. Jayme Souza Neto (Unesp/Botucatu).

As formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de rícino 3% e contendo combinação óleo de neem 3% + óleo de rícino 3%, emulsão de rícino 3 % e emulsão óleo de neem 3% + óleo de rícino 3%, não apresentaram atividade larvicida nas concentrações estudadas, visto que não foi observado mortalidade das larvas durante o ensaio.

Não foi viável aumento da concentração para a realização de novos testes, visto que ao aumentar a concentração se intensifica a coloração das formulações derivadas de lignina e dificulta a visualização da movimentação dos organismos durante o ensaio.

A literatura descreve o uso de derivados de *Ricinus communis* em concentrações inferiores as que foram utilizadas nesse estudo. Sogan et al., (2018) avaliou *Ricinus communis* como larvicida para larvas do mosquito vetor da malária *Anopheles culicifacies*, foram avaliadas a nanoemulsão de óleo de rícino e emulsão de rícino a granel, obtendo CL₅₀ de 3,4 e 52,31 ppm, respectivamente. Wamaket et al., (2018) realizou ensaios com larvas *Aedes aegypti*, determinando CL₅₀ de 51,38 ppm para ensaios com óleo de rícino. O estudo de Waris et al., (2020) com larvas de *Aedes aegypti* (2º e 3º instar), determinou CL₅₀ 106,24 ppm para extratos foliares de *Ricinus communis* e CL₅₀ de 46,22 ppm para nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato.

A diferença entre os dados da literatura e os obtidos nesse estudo pode estar relacionado ao perfil de liberação dos ativos das nanopartículas, assim como a porcentagem dos constituintes ativos do óleo, de modo que as formulações foram desenvolvidas a partir de um produto comercial e não foi possível determinar sua exata composição, ensaios complementares são necessários, visto que a composição do óleo de mamona é influenciada pela área de produção e método de extração adotado (YEBOAH et al., 2020). Wafa et al., (2014) realizou ensaio estudo fitoquímico de cinco populações tunisianas de *Ricinus communis* L. Análises de GC-MS indicou variação na porcentagem de ácido ricinoleico presente na composição entre os óleos obtidos pelas cinco populações. Quanto ao extrato de sementes, a população Aouled Amer foi a mais efetiva contra larvas de *C. pipiens* L., apresentando CL₅₀ de 570 mg/L. É esperado que ajustes na concentração de óleo utilizado no preparo das formulações possam melhorar seu desempenho como larvicida, porém ensaios complementares são necessários para conhecer o mecanismo de ação desses produtos e assim elaborar as modificações.

4. CONCLUSÃO

Embora as nanocápsulas carregadas com óleo de rícino, assim como as nanocápsulas contendo a combinação do óleo de rícino e óleo de neem, não tenham atendido a expectativa de atividade larvicida em larvas de *Aedes aegypti*, o sistema carreador desenvolvido a partir da lignina mostra-se promissor para transporte de óleos, por apresentar boa estabilidade e alta eficiência de encapsulação. Ensaios complementares e modificações na composição das formulações são necessários, pois assim pode se diminuir a toxicidade e aumentar a atividade biológica.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os mosquitos estão entre as espécies de vetores mais comuns e podem transmitir diversas doenças. O mosquito *Aedes aegypti* é conhecido como vetor de arbovírus como dengue, zika, chikungunya e febra amarela. A dengue é a doença viral mais prevalente, com aumento contínuo no número de casos anuais, a Organização Mundial de Saúde indica uma estimativa de 390 milhões de infecções pelo vírus da dengue por ano, embora a maioria dos casos de dengue seja assintomática ou apresente sintomas leves, ela pode se manifestar como uma doença grave.

Desse modo, é imprescindível o controle do vetor para uma diminuição nos casos de arboviroses, sendo essa uma questão crítica de saúde pública em países tropicais. Os métodos mais utilizados e eficazes no controle de mosquito são realizados com compostos sintéticos, o uso generalizado desses compostos resultou na persistência e acúmulo de produtos químicos não biodegradáveis no ecossistema, desenvolvimento de resistência a inseticidas em vetores e efeitos tóxicos em organismos não-alvo, com isso surge uma necessidade urgente de desenvolver métodos de controle de mosquitos novos e aprimorados.

Conforme abordado no capítulo 1, o uso da nanotecnologia é interessante por proporcionar melhora na biodisponibilidade de diversos ativos com baixa ou nenhuma solubilidade em água, melhorando a eficácia do ativo, sua especificidade, estabilidade, proteção do ativo, por funcionar como reservatórios de ativos permite liberação lenta, reduzindo a quantidade de aplicações e possivelmente a sua toxicidade.

Aliado a isso, o uso de materiais biodegradáveis e de origem botânica são alvo de estudos por proporcionarem menor toxicidade ambiental e características pertinentes a um larvicida ideal: eficaz, sustentável, economicamente viável, com baixa toxicidade em mamíferos e sem alterar as características da água.

Nos capítulos 2 e 3 desse trabalho, são apresentados o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de neem (*Azadirachta indica*), óleo de rícino (*Ricinus communis*) assim como a combinação desses ativos, de modo geral, todas as nanocápsulas desenvolvidas apresentaram ótima estabilidade no período de 120 dias, indicando esse sistema como um bom carreador de óleos, a constância nos resultados do índice de polidispersão abaixo de 0,2 e o alto potencial zeta colaboram para a homogeneidade das formulações, que não apresentaram divisão de fase em nenhum momento do estudo, conforme observado na figura 1. Por outro lado, as emulsões desenvolvidas para realizar uma comparação nos ensaios, mostrou-se instável ao decorrer de 15 dias, as emulsões também são um sistema carreador, mas nesse estudo

apresentaram baixo desempenho em comparação as nanocápsulas, que apresentaram estabilidade mesmo em temperatura ambiente.

O uso de larvicidas é feito em águas estagnadas, com isso existem riscos ao meio ambiente, animais e humanos ao introduzir compostos em corpos d'água, sendo necessário uma avaliação da ecotoxicidade dos larvicidas.

Para isso, as formulações desenvolvidas nesse trabalho foram avaliadas conforme os testes agudos presentes nas diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, para os organismos aquáticos *Daphnia magna*, *Danio rerio* e *Chironomus riparius*, dentre esses o *Danio rerio*, popularmente conhecido como zebrafish, foi o organismo mais sensível à exposição das nanocápsulas, sendo que nanocápsulas carregadas com a combinação dos óleos foi a formulação que apresentou maior toxicidade nos ensaios. Ensaios com o organismo de solo *Caenorhabditis elegans* não apresentaram toxicidade significativa para as concentrações avaliadas.

Figura 1: Resumo dos resultados e representação esquemáticas das nanopartículas desenvolvidas.

Capítulo 2	Capítulo 3	Capítulo 3
 Nanocápsula Polimérica de Núcleo Lípido contendo Óleo de Neem ●	 Nanocápsula Polimérica de Núcleo Lípido contendo Óleo de Rícino ●	 Nanocápsula Polimérica de Núcleo Lípido contendo Óleo de Neem ● e Óleo de Rícino ●
Estabilidade físico-química: 120 dias Diâmetro médio: 172 ± 5 nm Índice de polidispersão: $0,132 \pm 0,01$ Potencial Zeta: -46 ± 2 mV Eficiência de encapsulação: $97 \pm 0,7\%$	Estabilidade físico-química: 120 dias Diâmetro médio: 258 ± 13 nm Índice de polidispersão: $0,140 \pm 0,01$ Potencial Zeta: -46 ± 3 mV Eficiência de encapsulação: $92 \pm 3\%$	Estabilidade físico-química: 120 dias Diâmetro médio: 245 ± 8 nm Índice de polidispersão: $0,124 \pm 0,01$ Potencial Zeta: -47 ± 3 mV Eficiência de encapsulação: ● $92 \pm 4\%$ ● $97 \pm 3\%$
Toxicidade em organismos não-alvo CL 50 mg/L <i>Daphnia magna</i>: 865 ± 57 <i>Danio rerio</i>: 80 ± 4 <i>Chironomus riparius</i>: > 720 <i>Caenorhabditis elegans</i>: não significativo	Toxicidade em organismos não-alvo CL 50 mg/L <i>Daphnia magna</i>: > 950 <i>Danio rerio</i>: 104 ± 6 <i>Chironomus riparius</i>: > 720 <i>Caenorhabditis elegans</i>: não significativo	Toxicidade em organismos não-alvo CL 50 mg/L <i>Daphnia magna</i>: 233 ± 21 <i>Danio rerio</i>: 14 ± 17 <i>Chironomus riparius</i>: > 720 <i>Caenorhabditis elegans</i>: não significativo
Atividade larvicida em larvas de <i>Aedes aegypti</i>  CL 50 : 3000 mg/L	Atividade larvicida em larvas de <i>Aedes aegypti</i>  CL 50 : > 3000 mg/L	Atividade larvicida em larvas de <i>Aedes aegypti</i>  CL 50 : > 3000 mg/L

Perfil de toxicidade em ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade (células HaCaT e *Allium Cepa*) também foram estudados, observando que os resultados mais significativos foi das nanocápsulas carregadas com a combinação dos óleos, que apresentou diminuição de 60% na viabilidade celular, assim como das nanocápsulas carregadas apenas com óleo de neem com diminuição de 56% na viabilidade celular, indicando que a presença do óleo de neem pode alterar a viabilidade celular, porém estudos demonstram que a técnica de MTT possui limitações sem seu método e por isso a comparação com demais técnicas torna-se essencial. Sendo assim, observando os demais ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade realizados nesse estudo, assim como os ensaios em organismos não- alvo, é visível que as nanocápsulas possuem um perfil de baixa toxicidade.

Os ensaios de atividade larvicida realizados com larvas de *Aedes aegypti*, demonstraram necessidade de alterações nas formulações, visto que apenas a formulação nanocápsulas contendo óleo de neem apresentaram atividade larvicida e ainda assim em uma alta concentração CL₅₀ 3000 mg/L.

Com tudo, as formulações desenvolvidas nesse trabalho abrem perspectivas para um larvicida sustentável, ambientalmente interessante e potencialmente seguro, visto que as nanocápsulas possuem diâmetro médio em uma faixa de tamanho seguro, que dificulta permeabilidade por membranas, foram desenvolvidas a partir de materiais biodegradáveis, o que evita prováveis acumulações no ambiente e reaproveitando biomassa, sendo uma proposta em benefício do meio ambiente e valorização de subprodutos. Ensaio crônicos em organismos não-alvo são necessários para uma maior realidade ecológica, assim como ensaios histológicos e de interação larva-nanocápsula são indispensáveis para compreender o mecanismo de ação desses sistemas em seu organismo alvo. Por tanto, ensaios complementares e modificações nas formulações são fundamentais para que as nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico desenvolvidas nesse trabalho possam atender aos requisitos de larvicida ideal.

REFERÊNCIAS

- ABE, F. R. et al. Toxicity of Diflubenzuron and Temephos on Freshwater Fishes: Ecotoxicological Assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. **Water, Air, and Soil Pollution**, 2019.
- ADITYA, G. et al. Predatory efficiency of the water bug *Sphaerodema annulatum* on mosquito larvae (*Culex quinquefasciatus*) and its effect on the adult emergence. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 169–172, 2004.
- ALI, J. et al. Antimicrobial effect of ZnO nanoparticles synthesized by different methods against food borne pathogens and phytopathogens. **Materials Today: Proceedings, National Conference on Advanced Functional Materials**. v. 36, p. 609–615, 2021.
- AL-MEKHLAFI, F. A. et al. Target and non-target effects of *Foeniculum vulgare* and *Matricaria chamomilla* combined extract on *Culex pipiens* mosquitoes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 10, p. 5773–5780, 2021.
- ALTUNTAS, I.; DELIBAS, N. The Effects of Fenthion on Lipid Peroxidation and Some Liver Enzymes: The Possible Protective Role of Vitamins E and C. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 32, n. 4, p. 293–297, 2002.
- AMELIA-YAP, Z. H. et al. Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 332, 2018.
- AMORIM, L. B.; HELVECIO, E.; AYRES, J. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. **Pest Management Science**, v. 69, p. 1307–1314, 2013.
- ANAND, M. et al. Synthesis of chitosan nanoparticles by TPP and their potential mosquito larvicidal application. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 2, n. 2, p. 72–78, 2018.
- ANDEME ELA, R. C. et al. Double-Shell Lignin Nanocapsules Are a Stable Vehicle for Fungicide Encapsulation and Release. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 46, p. 17299–17306, 2020.
- ANJALI, C. et al. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion-a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. **Pest Management Science**, v. 68, n. 2, p. 158–163, 2012.
- ARAGÃO, C. F. et al. Circulation of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 186, p. 1–4, 2018.

- ARASU, M. V. et al. One step green synthesis of larvicidal, and azo dye degrading antibacterial nanoparticles by response surface methodology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 190, p. 154–162, 2019.
- ARAÚJO, I. F. et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* and molecular docking studies of compounds extracted from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. isolated from *Bertholletia excelsa* Humn. & Bonpl. **Biotechnology Letters**, v. 44, p. 439–459, 2022.
- ARTSOB, H.; LINDSAY, R. Arboviruses. **International Encyclopedia of Public Health**, p. 219–226, 2008.
- ÁVALOS-SOTO, J. et al. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. **Revista mexicana de ciencias farmacéuticas**, v. 45, n. 3, p. 39–44, 2014.
- AVELINO-SILVA, V. L.; RAMOS, J. F. Arboviroses e políticas públicas no Brasil. **Ciências em Saúde**, v. 7, n. 3, p. 1–2, 2017.
- AYINDE, A. A.; MORAKINYO, O. M.; SRIDHAR, M. K. C. Repellency and larvicidal activities of *Azadirachta indica* seed oil on *Anopheles gambiae* in Nigeria. **Heliyon**, v. 6, n. 5, p. e03920, 2020.
- BACCI, L. et al. A review of Spinosyns, a derivative of biological acting substances as a class of insecticides with a broad range of action against many insect pests. **Journal of Entomological and Acarological Research**, v. 48, n. 1, p. 40–52, 2016.
- BAKAS, I. et al. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled to high performance liquid chromatography (HPLC-UV) for simple and rapid analysis of fenthion in olive oil. **Talanta**, v. 125, p. 313–318, 1 jul. 2014.
- BALDACCHINO, F. et al. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: A review. **Pest Management Science**, v. 71, n. 11, p. 1471–1485, 2015.
- BAN, P. H. et al. Mosquito larvicidal activity on *aedes albopictus* and constituents of essential oils from *manglietia dandyi* (Gagnep.) dandy. **Records of Natural Products**, v. 14, n. 3, p. 201–206, 2020.
- BANERJEE, K. et al. *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) oil topical formulation with liquid crystals ensconcing depot water for anti-inflammatory, wound healing and anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activities. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 64, p. 102563, 2021.
- BELLES, X. Molecular mechanisms regulating hormone production and action. In: **Insect Metamorphosis**. Academic Press, 2020. p. 131–176.

- BENELLI, G. et al. Larvicidal and repellent activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) fruits against the filariasis vector *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 1155–1161, 2013.
- BENELLI, G. et al. Mosquito control with green nanopesticides: towards the One Health approach? A review of non-target effects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10184–10206, 2018.
- BENELLI, G. et al. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? **Natural Product Research**, v. 31, n. 4, p. 369–386, 2017.
- BENELLI, G. et al. Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: Larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 186–195, 2017.
- BENELLI, G. Mode of action of nanoparticles against insects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 13, p. 12329–12341, 2018.
- BENELLI, G. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 114, p. 3201–3212, 2015.
- BENELLI, G.; CASELLI, A.; CANALE, A. Nanoparticles for mosquito control: Challenges and constraints. **Journal of King Saud University - Science**, v. 29, n. 4, p. 424–435, 2017.
- BHAN, S.; MOHAN, L.; SRIVASTAVA, C. N. Relative larvicidal potentiality of nano-encapsulated Temephos and Imidacloprid against *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 4, p. 787–791, 2014.
- BISSET, J. A. et al. Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, p. 233–239, 2011.
- BONCIU, E. et al. An evaluation for the standardization of the **Allium cepa** test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191–209, 2018.
- BORRÁS, E. et al. Atmospheric degradation of the organothiophosphate insecticide – Pirimiphos-methyl. **Science of The Total Environment**, v. 579, p. 1–9, 2017.
- BRAGA, T. M. et al. *Azadirachta indica* A. Juss. In Vivo Toxicity—An Updated Review. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 252, 2021.
- BRUN, E. M. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion. Influence of hapten structure. **Journal of Immunological Methods**, v. 295, n. 1–2, p. 21–35, 2004.
- CAMPOS, E. V. R. et al. Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future.

- Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.
- CAMPOS, E. V. R. et al. Recent Developments in Nanotechnology for Detection and Control of *Aedes aegypti*-Borne Diseases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.
- CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Larval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 523–530, 2003.
- CARVALHO, D. O. et al. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2015.
- CATCHOT, B. et al. Novaluron prevents oogenesis and oviposition by inducing ultrastructural changes in ovarian tissue of young adult *Lygus lineolaris*. **Pest Management Science**, v. 76, p. 4057–4063, 2020.
- CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541–544, 2004.
- CESA, S. et al. Phytochemical analyses and pharmacological screening of Neem oil. South African Journal of Botany, **Special Issue on Enzyme Inhibitors of natural origin**. v. 120, p. 331–337, 2019.
- CHANDRA, G. et al. Biocontrol of larval mosquitoes by *Acilius sulcatus* (Coleoptera: Dytiscidae). **BMC Infectious Diseases**, v. 8, p. 138, 2008b.
- CHANDRA, G. et al. Mosquito control by larvivorous fish. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, n. 1, p. 13–27, 2008a.
- CHANDRAMOHAN, B. et al. Characterization and mosquitocidal potential of neem cake-synthesized silver nanoparticles: genotoxicity and impact on predation efficiency of mosquito natural enemies. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 1015–1025, 2016.
- CHAUDHARY, S. et al. Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- CHELLAPPANDIAN, M. et al. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. **Environment International**, v. 113, p. 214–230, 2018.
- CHENG, S. S. et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 99–102, 2003.
- CHENG, S. S. et al. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils

- from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 452–456, 2009.
- COHEN, E. Chitin Biochemistry: Synthesis, Hydrolysis and Inhibition. **Advances in Insect Physiology**, v. 38, n. C, p. 5–74, 2010.
- COHEN, S. et al. Cyt1Aa Toxin: Crystal Structure Reveals Implications for Its Membrane-Perforating Function. **Journal of Molecular Biology**, v. 413, n. 4, p. 804–814, 2011.
- COLOVI, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315–335, 2013.
- CORDELLI, E.; BIGNAMI, M.; PACCHIEROTTI, F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. **Toxicology Research**, v. 10, n. 1, p. 68–78, 2021.
- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. European **Journal of Pharmaceutical Sciences**: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.
- D, C. et al. Two-generational effects of Benzophenone-3 on the aquatic midge *Chironomus riparius*. **The Science of the total environment**, v. 669, 2019.
- DA BOTAS, G. S. et al. Baccharis reticularia DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Control. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–14, 2017.
- DA SILVA SÁ, G. C. et al. Arbovirus vectors insects: are botanical insecticides an alternative for its management? **Journal of Pest Science**, 2022.
- DA SILVA, M. R. M.; RICCI-JÚNIOR, E. An approach to natural insect repellent formulations: from basic research to technological development. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105419, 2020.
- DA SILVA, N. A. et al. Biodegradation of the Organophosphate Pesticide Profenofos by Marine Fungi. **Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches**, p. 1–32, 2013.
- DAHMANA, H.; MEDIANNIKOV, O. Mosquito-Borne Diseases Emergence/Resurgence and How to Effectively Control It Biologically. **Pathogens**, v. 9, p. 310–336, 2020.
- DAMBACH, P. The use of aquatic predators for larval control of mosquito disease vectors: Opportunities and limitations. **Biological Control**, v. 150, p. 104357, 2020.
- DE OLIVEIRA, J. G. et al. Polymer-based nanostructures loaded with piperine as a

- platform to improve the larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, v. 230, n. March, p. 1–7, 2022.
- DEY, P. et al. Evaluation of larvicidal activity of *Piper longum* leaf against the dengue vector, *Aedes aegypti*, malarial vector, *Anopheles stephensi* and filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*. **South African Journal of Botany**, v. 132, p. 482–490, 2020.
- DHADIALLA, T. S.; RETNAKARAN, A.; SMAGGHE, G. **Insect Growth- and Development-Disrupting Insecticides**. Elsevier, 2005.
- DHANG, C. C. et al. Biochemical detection of temephos resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) from dengue-endemic areas of Selangor State, Malaysia. **Proceedings of the 3rd ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology: A Hidden Threat to Global Health**, v. 3, p. 6–20, 2008.
- DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology Research**, v. 113, p. 565–592, 2014.
- DIAZ, J. H. Chemical and Plant-Based Insect Repellents: Efficacy, Safety, and Toxicity. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 27, n. 1, p. 153–163, 2016.
- DONG, M. et al. Dissipation rates and residue levels of diflubenzuron and difenoconazole on peaches and dietary risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 108, p. 104447, 2019.
- DORIGATTI, I. et al. Using Wolbachia for Dengue Control: Insights from Modelling. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 102–113, 2018.
- DURANT, S. E.; HOPKINS, W. A. Amphibian predation on larval mosquitoes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 86, n. 10, p. 1159–1164, 2008.
- FARNESI, L. C. et al. Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: Effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.
- FERNANDES, S. R. et al. Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State-of-the-art. **Fitoterapia**, v. 134, p. 141–150, 2019.
- FIAZ, M. et al. Behavioral and ultrastructural effects of novaluron on *Aedes aegypti* larvae. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, p. 104974, 2021.
- FIROOZIYAN, S. et al. Preparation of nanoemulsion of *Cinnamomum zeylanicum* oil and evaluation of its larvicidal activity against a main malaria vector *Anopheles stephensi*. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 19, n. 1, p. 1025–1034, 2021.

- FLORES-CÉSPEDES, F. et al. Preparation and Characterization of Azadirachtin Alginate-Biosorbent Based Formulations: Water Release Kinetics and Photodegradation Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 38, p. 8391–8398, 2015.
- FOCKS, D. A. Toxorhynchites as biocontrol agents. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2, p. 118–127, 2007.
- FOLDBJERG, R. et al. Silver nanoparticles-wolves in sheep's clothing? **Toxicology Research**, v. 4, p. 563, 2015.
- FOTAKIS, E. A. et al. Identification and detection of a novel point mutation in the Chitin Synthase gene of *Culex pipiens* associated with diflubenzuron resistance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. e0008284, 2020.
- FRANCES, S. P.; DEBBOUN, M. The role of arthropod repellents in the control of vector-borne diseases. **Advances in Arthropod Repellents**, p. 323–336, 2022.
- GALVÃO, J. G. et al. Lippia gracilis essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 452–459, 2019.
- GASTELBONDO-PASTRANA, B. I. et al. The comet assay in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae): A suitable approach for detecting somatic and germ cell genotoxicity induced by agrochemicals. **Chemosphere**, v. 235, p. 70–75, 2019.
- GBOLADE, A. A.; LOCKWOOD, G. B. Toxicity of *Ocimum sanctum* L. essential oil to *Aedes aegypti* larvae and its chemical composition. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, p. 148–153, 2007.
- GEORGE, L. et al. Community-Effectiveness of Temephos for Dengue Vector Control: A Systematic Literature Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004006, 2015.
- GERIS, R. et al. Bioactive Natural Products as Potential Candidates to Control *Aedes aegypti*, the Vector of Dengue. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 37, p. 277–376, 2012.
- GIATROPOULOS, A. et al. Essential oil composition, adult repellency and larvicidal activity of eight Cupressaceae species from Greece against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1113–1123, 2013.
- GIRARD, M. et al. Arboviruses: A global public health threat. **Vaccine**, v. 38, n. 24, p. 3989–3994, 2020.
- GOETTEN DE LIMA, G. et al. A biocide delivery system composed of nanosilica loaded

- with neem oil is effective in reducing plant toxicity of this biocide. **Environmental Pollution**, v. 294, p. 118660, 2022.
- GONZÁLEZ, J. O. W. et al. Polymer nanoparticles containing essential oils: new options for mosquito control. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17006–17015, 2017.
- GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1–13, 2017.
- GOVINDARAJAN, M. et al. High efficacy of (Z)- γ -bisabolene from the essential oil of *Galinsoga parviflora* (Asteraceae) as larvicide and oviposition deterrent against six mosquito vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10555–10566, 2018.
- GRANADOS-ECHEGOYEN, C. A. et al. *Argemone mexicana* (Papaverales: Papavaraceae) as an Alternative for Mosquito Control: First Report of Larvicidal Activity of Flower Extract. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 1, p. 261–267, 2019.
- GRIGORAKI, L. et al. Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, p. 61–67, 2016.
- GRIGORAKI, L. et al. Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. **Scientific Reports**, v. 7, p. 11699, 2017.
- HAJRA, A.; DUTTA, S.; MONDAL, N. K. Mosquito larvicidal activity of cadmium nanoparticles synthesized from petal extracts of marigold (*Tagetes* sp.) and rose (*Rosa* sp.) flower. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 4, p. 1519–1527, 2016.
- HARI, I.; MATHEW, N. Larvicidal activity of selected plant extracts and their combination against the mosquito vectors *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 9176–9185, 2018.
- HARRIS, A. F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman Angela. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 277–284, 2010.
- HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 653–665, 2004.
- HITES, R. A. The Rise and Fall of Chlorpyrifos in the United States. **Environmental science & technology**, v. 55, p. 1354–1358, 2021.
- HOWARD, A. F.; ZHOU, G.; OMLIN, F. X. Malaria mosquito control using edible fish

- in western Kenya: preliminary findings of a controlled study. **BMC Public Health**, v. 7, p. 199, 2007.
- HUANG, Y.-J.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–14, 2019.
- INTIRACH, J. et al. Biochemical effects of *Petroselinum crispum* (Umbellifereae) essential oil on the pyrethroid resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Insects**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2019.
- ISLAM, J. et al. Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. **Acta Tropica**, v. 167, p. 216–230, 2017.
- ISLAS, J. F. et al. An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. **Journal of Functional Foods**, v. 74, p. 104171, 2020.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45–66, 2006.
- JÁCOME, R. et al. A yellow flag on the horizon: The looming threat of yellow fever to North America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 87, p. 143–150, 2019.
- JAGANATHAN, S. K. et al. Fabricação e caracterização de novos andaimes de poliuretano fibroso eletrofiado sob medida, decorados com própolis e óleo de nim para aplicações de engenharia de tecidos. **Journal of Industrial Textiles**, v. 49, n. 9, p. 1178–1197, 2020.
- JAGANATHAN, S. K. et al. Fabrication and characterisation of nanofibrous polyurethane scaffold incorporated with corn and neem oil using single stage electrospinning technique for bone tissue engineering applications. **Journal of Polymer Research**, v. 25, n. 7, p. 146, 2018.
- JANKOWSKA, M. et al. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review. **Molecules**, v. 23, n. 1, 2018.
- JAVANSHIR, A. et al. The antioxidant and anticancer potential of *Ricinus communis* L. essential oil nanoemulsions. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 3, p. 1356–1365, 1 jun. 2020.
- JEROBIN, J. et al. Antibacterial activity of neem nanoemulsion and its toxicity assessment on human lymphocytes in vitro. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. Suppl 1, p. 77–86, 2015.
- JIA, H.-R. et al. Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery

- applications. **Journal of Controlled Release**, v. 311–312, p. 301–318, 2019.
- JINDRA, M.; BITTOVA, L. The juvenile hormone receptor as a target of juvenoid “insect growth regulators”. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 3, p. 1–7, 2020.
- JOHN, E. M.; MANAKULAMSHAIKE, J. Chlorpyrifos: pollution and remediation. **Environmental Chemistry Letters**, v. 13, p. 269–291, 2015.
- JOSHUA ASHAOLU, T. Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 3381–3395, 2021.
- KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H.-C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology, Potential Hazard of Nanoparticles: From Properties to Biological & Environmental Effects**, v. 269, n. 2, p. 105–119, 2010.
- KAKKA, A. I.; HERLEKAR, M. D.; AWALE, S. Comparative Toxicity Study of Chemical Pesticide and Biopesticide by *Daphnia* Bioassay. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 20, n. 2, 2021.
- KALA, S. et al. Impregnation of pectin-cedarwood essential oil nanocapsules onto mini cotton bag improves larvicidal performances. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.
- KALA, S. et al. Neem oil water dispersible tablet as effective larvicide, ovicide and oviposition deterrent against *Anopheles culicifacies*. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 387–392, 2019.
- KASAI, S. et al. Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1–18, 2014.
- KASAI, S.; SCOTT, J. G. Overexpression of Cytochrome P450 CYP6D1 Is Associated with Monooxygenase-Mediated Pyrethroid Resistance in House Flies from Georgia. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 68, n. 1, p. 34–41, 2000.
- KASHIF, M.; KIM, D.; KIM, G. In vitro antiproliferative and apoptosis inducing effect of a methanolic extract of *Azadirachta indica* oil on selected cancerous and noncancerous cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 11, n. 10, p. 555, 2018.
- KAWADA, H. et al. Co-occurrence of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Myanmar. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e3032–e3040, 2014.
- KIM, S. IL; AHN, Y. J. Larvicidal activity of lignans and alkaloid identified in *Zanthoxylum piperitum* bark toward insecticide-susceptible and wild *Culex*

- pipiens pallens and Aedes aegypti. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.
- KOMALAMISRA, N. et al. Screening for larvicidal activity in some thais plants against four mosquito vectros species. **Shoutheast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 6, 2005.
- KONAPPA, N. et al. Nanofertilizers and nanopesticides: Recent trends, future prospects in agriculture. **Advances in Nano-Fertilizers and Nano-Pesticides in Agriculture**, p. 281–330, 2021.
- KOVENDAN, K. et al. Ovicidal, repellent, adulticidal and field evaluations of plant extract against dengue, malaria and filarial vectors. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1205–1219, 2013.
- KUMAR, K. R. et al. Synthesis of eco-friendly silver nanoparticles from Morinda tinctoria leaf extract and its larvicidal activity against Culex quinquefasciatus. **Parasitology Research**, v. 114, p. 411–417, 2015.
- KUMAR, M. A Review on Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Ricinus communis* L. Plant. International **Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 9, n. 4, 2017.
- KUMAR, S. et al. Evaluation of the larvicidal efficiency of stem, roots and leaves of the weed, *Parthenium hysterophorus* (Family: Asteraceae) against *Aedes aegypti* L. Asian Pacific **Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 5, p. 395–400, 2012.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.
- LAI, F. et al. *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: Preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, p. E10, 2006.
- LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 149, n. 2, p. 196–209, 2009.
- LAWLER, S. P. Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 335–343, 2017.
- LI, C. X. et al. Relationship between insecticide resistance and kdr mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China. **Parasites and Vectors**, v. 8, n.

- 1, p. 1–9, 2015.
- LI, H. et al. Preparation of Nanocapsules via the Self-Assembly of Kraft Lignin: A Totally Green Process with Renewable Resources. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 4, p. 1946–1953, 2016.
- LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes and Infections**, v. 4, p. e18, 2015.
- LIEVONEN, M. et al. A simple process for lignin nanoparticle preparation. **Green Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1416–1422, 2016.
- LIU, X. C. et al. Identification of Insecticidal Constituents of the Essential Oil of *Acorus calamus* Rhizomes against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. **Molecules**, v. 18, p. 5684–5696, 2013.
- LIU, X. et al. Nanoparticle-loaded gels for topical delivery of nitrofurazone: Effect of particle size on skin permeation and retention. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, p. 367–372, 2018.
- LOUIS, M. R. L. M. et al. Mosquito larvicidal activity of Avocado (*Persea americana* Mill.) unripe fruit peel methanolic extract against *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi*. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 1–4, 2020.
- LU, L. et al. Insecticidal activity and mechanism of cinnamaldehyde in *C. elegans*. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104687, 2020.
- MACORIS, M. D. L. G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703–708, 2003.
- MAHESWARAN, R.; IGNACIMUTHU, S. A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1801–1813, 2012.
- MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: A review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**, v. 10, p. 1–15, 2011.
- MAITRA, A. et al. Exploring deeper genetic structures: *Aedes aegypti* in Brazil. **Acta Tropica**, v. 195, p. 68–77, 2019.
- MANCA, M. L. et al. Nanotechnology for Natural Medicine: Formulation of Neem Oil Loaded Phospholipid Vesicles Modified with Argan Oil as a Strategy to Protect the Skin from Oxidative Stress and Promote Wound Healing. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 670, 2021.

- MANDAL, S. et al. Antibacterial activity of honey against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 3, n. 12, p. 961–964, 2010.
- MANH, H. D.; TUYET, O. T. Larvicidal and Repellent Activity of *Mentha arvensis* L. Essential Oil against *Aedes aegypti*. *Insects*, v. 11, p. 198–207, 2020.
- MAOZ, D. et al. Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, p. e0005651, 2017.
- MARCOMBE, S. et al. Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *aedes aegypti* in laos and implication for vector control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 12, p. 1–22, 2019.
- MARCOMBE, S. et al. Field Efficacy of New Larvicide Products for Control of Multi-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Martinique (French West Indies). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 84, n. 1, p. 118–126, 2011.
- MARINA, C. F. et al. Efficacy and non-target impact of spinosad, Bti and temephos larvicides for control of *Anopheles* spp. in an endemic malaria region of southern Mexico. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.
- MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, E. J. et al. Larvicidal Activity of Carbon Black against the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. *Insects*, v. 13, n. 3, p. 307, 2022.
- MATTINEN, M.-L. et al. Enzymatically and chemically oxidized lignin nanoparticles for biomaterial applications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 111, p. 48–56, 2018.
- MELO, S. J. et al. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*, v. 77, p. 1444–1451, 2021.
- MERZENDORFER, H. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Science*, v. 20, p. 121–138, 2013.
- MICHELI, M. et al. Neem Oil Used as a “Complex Mixture” to Improve In Vitro Shoot Proliferation in Olive. *HortScience*, v. 53, n. 4, p. 531–534, 2018.
- MOE, S. J. et al. Effects of an aquaculture pesticide (diflubenzuron) on non-target shrimp populations: Extrapolation from laboratory experiments to the risk of population decline. *Ecological Modelling*, v. 413, p. 108833, 2019.
- MOGA, M. A. et al. An Overview on the Anticancer Activity of *Azadirachta indica* (Neem) in Gynecological Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 12, p. 3898, 2018.

- MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 2015.
- MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major Aedes vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.
- MUBOFU, E. B. Castor oil as a potential renewable resource for the production of functional materials. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, n. 1, p. 11, 2016.
- MUDD, N.; LICEAGA, A. M. *Caenorhabditis elegans* as an in vivo model for food bioactives: A review. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 845–856, 2022.
- MURUGAN, K. et al. Predation by Asian bullfrog tadpoles, *Hoplobatrachus tigerinus*, against the dengue vector, *Aedes aegypti*, in an aquatic environment treated with mosquitocidal nanoparticles. **Parasitology Research**, v. 114, p. 3601–3610, 2015.
- MURUGAN, K. et al. Use of plant products and copepods for control of the dengue vector, *Aedes aegypti*. **Hydrobiologia**, v. 666, n. 1, p. 331, 2011.
- NDIAYE, E. H. et al. Arboviruses isolated from the Barkedji mosquito-based surveillance system, 2012-2013. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2018.
- OECD. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. Paris: **Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2004.
- OECD. Test No. 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test. Paris: **Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2011.
- OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Paris: **Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2013.
- OHBA, S. Y.; TAKAGI, M. Predatory ability of adult diving beetles on the Japanese encephalitis vector *Culex tritaeniorhynchus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 1, p. 32–36, 2010.
- OSANLOO, M. et al. Nanoemulsion and nanogel containing *Artemisia dracunculus* essential oil ; larvicidal effect and antibacterial activity. **BMC Research Notes**, v. 15, p. 276, 2022.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Technical document for the implementation of interventions based on generic operational scenarios for Aedes aegypti control**. Washington D.C. 2019.
- PARK, J. et al. Classification and Morphological Analysis of Vector Mosquitoes using

- Deep Convolutional Neural Networks. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1012, 2020.
- PARTHIBAN, E. et al. Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00297, 2019.
- PASCOLI, M. et al. Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective. **Science of The Total Environment**, v. 677, p. 57–67, 2019.
- PASCOLI, M. et al. The potential of nanobiopesticide based on zein nanoparticles and neem oil for enhanced control of agricultural pests. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 2, p. 793–806, 2020.
- PASQUOTO-STIGLIANI, T. et al. Nanocapsules Containing Neem (*Azadirachta Indica*) Oil: Development, Characterization, And Toxicity Evaluation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5929, 2017.
- PATAKIOUTAS, G.; ALBANIS, T. A. Adsorption-desorption studies of alachlor, metolachlor, EPTC, chlorothalonil and pirimiphos-methyl in contrasting soils. **Pest Management Science**, v. 58, p. 352–362, 2002.
- PAVELA, R. et al. Encapsulation of *Carlina acaulis* essential oil and carlina oxide to develop long-lasting mosquito larvicides: microemulsions versus nanoemulsions. **Journal of Pest Science**, v. 94, p. 899–915, 2021.
- PAVELA, R. et al. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. **Acta Tropica**, v. 193, p. 236–271, 2019.
- PEREIRA, A. DO E. S. et al. Lignin nanoparticles: New insights for a sustainable agriculture. **Journal of Cleaner Production**, v. 345, p. 131145, 2022.
- PERUMALSAMY, H.; KIM, N.-J.; AHN, Y.-J. Larvicidal Activity of Compounds Isolated From *Asarum heterotropoides* Against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 6, p. 1420–1423, 2009.
- PEZZI, M. et al. Evaluation of larvicidal activity of esters of 4-mercapto-2-butenic acid against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Saudi **Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1112–1116, 2019.
- PINTO, E. J. S. et al. Larvicidal activity, aquatic and in vivo toxicity of anacardic acid loaded-zein nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, 2021.
- PIPLANI, M. et al. Plant-based larvicidal agents: An overview from 2000 to 2018.

- Experimental Parasitology**, v. 199, p. 92–103, 2019.
- PLACZEK, M. et al. Comparison of the in vitro cytotoxicity among phospholipid-based parenteral drug delivery systems: Emulsions, liposomes and aqueous lecithin dispersions (WLDs). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 92–101, 2019.
- POLSON, K. A. et al. Characterization of DDT and pyrethroid resistance in Trinidad and Tobago populations of *Aedes aegypti*. **Cambridge University Press**, v. 101, n. 4, p. 435–441, 2011.
- POUPARDIN, R. et al. Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, p. 1–11, 2014.
- PRAKASH, S.; SONI, N. Synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Aspergillus niger* and its efficacy against mosquito larvae. **Reports in Parasitology**, v. 2, p. 1–7, 2012.
- PRATA-BARBOSA, A. et al. Effects of Zika infection on growth. **Jornal de Pediatria**, v. 95, p. 30–41, 2019.
- PRATHIBHA, K. P.; RAGHAVENDRA, B. S.; VIJAYAN, V. A. Larvicidal, ovicidal, and oviposition-deterrent activities of four plant extracts against three mosquito species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 6736–6743, 2014.
- PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Dengue infection in the nervous system: lessons learned for Zika and Chikungunya. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, p. 123–126, 2017.
- RAHOLA, N. et al. Assessment of expertise in morphological identification of mosquito species (Diptera, Culicidae) using photomicrographs. **Parasite**, v. 29, p. 45, 2022.
- RAHUMAN, A. A.; VENKATESAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. **Parasitology Research**, v. 103, n. 6, p. 1383–1390, 2008.
- RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411–3424, 2011.
- REZENDE-TEIXEIRA, P. et al. What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. **Environmental Pollution**, v. 300, p. 118983, 2022.
- RIZEQ, B. R. et al. Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-

- Based Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5776, 2019.
- ROGERIO, C. B. et al. Cellulose Hydrogels Containing Geraniol and Icaridin Encapsulated in Zein Nanoparticles for Arbovirus Control. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 3, p. 1273–1283, 2022.
- RONI, M. et al. Characterization and biotoxicity of Hypnea musciformis-synthesized silver nanoparticles as potential eco-friendly control tool against Aedes aegypti and Plutella xylostella. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 121, p. 31–38, 2015.
- RUBBO, M. J. et al. The Influence of Amphibians on Mosquitoes in Seasonal Pools: Can Wetlands Protection Help to Minimize Disease Risk? **Wetlands**, v. 31, p. 799–804, 2011.
- SÁ, G. C. DA S. et al. Arbovirus vectors insects: are botanical insecticides an alternative for its management? **Journal of Pest Science**, v. 1, p. 1–20, 2022.
- SABOURAULT, C. et al. Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdaE7) gene in resistant house flies. **Insect Molecular Biology**, v. 10, n. 6, p. 609–618, 2001.
- SAELIM, V. et al. Bottle and biochemical assays on temephos resistance in Aedes aegypti in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 2, p. 417–425, 2005.
- SALEH, T. A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. **Environmental Technology & Innovation**, v. 20, p. 101067, 2020.
- SALINAS, A. S. et al. Tadpoles of the bromeliad-dwelling frog Phyllodytes luteolus are able to prey on mosquito larvae. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 30, n. 6, p. 485–496, 2018.
- SANEI-DEHKORDI, A.; VATANDOOST, H.; ABAEI, M. R. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Bunium persicum Essential Oil Against Two Important Mosquitoes Vectors. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 5026, p. 349–357, 2016.
- SANTOS, S. R. L. et al. of Phenylpropanoids , Terpenes , and Related Compounds. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1049–1054, 2010.
- SANTOS, V. S. V.; LIMONGI, J. E.; PEREIRA, B. B. Association of low concentrations of pyriproxyfen and spinosad as an environment-friendly strategy to rationalize Aedes aegypti control programs. **Chemosphere**, v. 247, p. 125795, 2020.
- SATOH, T. Global Epidemiology of Organophosphate and Carbamate Poisonings.

- Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds**, p. 89–100, 2006.
- SCHNEIDER, W. D. H.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Lignin nanoparticles enter the scene: A promising versatile green tool for multiple applications. **Biotechnology Advances**, v. 47, p. 107685, 2021.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, **Informe-Arboviroses**, v. 51, p. 1-11. 2020.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, **Informe-Arboviroses**, v. 37, p. 1- 11. 2022.
- SHAALAN, E. A.-S. et al. A mosquito predator survey in Townsville, Australia, and an assessment of *Diplonychus* sp. and *Anisops* sp. predatorial capacity against *Culex annulirostris* mosquito immatures. **Journal of Vector Ecology**, v. 32, n. 1, p. 16–21, 2007.
- SHARMA, P.; MOHAN, L.; SRIVASTAVA, C. N. Anti-juvenile activity of *Azadirachta indica* extract on the development and morphometry of filaria vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Say. **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1193–1203, 2009.
- SHOPE, R. E.; MEEGAN, J. M. Arboviruses. In: **Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control**. 4. ed. New York. p. 1091.
- SILBERHORN, E. M. Methoprene. **Encyclopedia of Toxicology**, p. 59–61, 1 jan. 2005.
- SILVA, L. L. DE S. et al. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, p. 109583, 2019.
- SILVA, R. L. et al. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Industrial Crops and Products**, v. 178, p. 114568, 2022.
- SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. Bacterial toxins active against mosquitoes: Mode of action and resistance. **Toxins**, v. 13, n. 8, 2021.
- SINGH, K. D. et al. Main plant volatiles as stored grain pest management approach: A review. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 4, p. 100127, 2021.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.
- SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 1–12, 2016.

- SOGAN, N. et al. Larvicidal activity of castor oil nanoemulsion against malaria vector *Anopheles culicifacies*. **International Journal of Mosquito Research**, v. 5, n. 3, Part A, p. 1–6, 2018.
- SOGAN, N. et al. Larvicidal activity of *Ricinus communis* extract against mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 4, p. 282, 2018.
- SONI, K. S.; DESALE, S. S.; BRONICH, T. K. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 109–126, 2016.
- SOUZA, T. M. et al. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1380–1384, 2012.
- STRODE, C. et al. Expression Profile of Genes during Resistance Reversal in a Temephos Selected Strain of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e39439-ee39447, 2012.
- SUDHAKAR, C. et al. Facile synthesis of iron oxide nanoparticles using *Cassia auriculata* flower extract and accessing their photocatalytic degradation and larvicidal effect. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 33, p. 11434–11445, 2022.
- SUKHANOVA, A. et al. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, n. 1, p. 44, 2018.
- SUMAN, T. Y. et al. GC-MS analysis of bioactive components and biosynthesis of silver nanoparticles using *Hybanthus enneaspermus* at room temperature evaluation of their stability and its larvicidal activity. **Environ Sci Pollut Res**, v. 23, p. 2705–2714, 2016.
- SUNDARARAJAN, B. et al. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 475–485, 2018.
- SUSITRA MANJARI, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of plant extracts from *Clausena dentata* (Willd) (Rutaceae) against dengue, malaria, and filariasis vectors. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2475–2481, 2014.
- TANGENA, J. A. A. et al. Bionomics and insecticide resistance of the arboviral vector *Aedes albopictus* in northern Lao PDR. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–14, 2018.
- TANGSONGCHAROEN, C. et al. *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 128, p. 57–63, 2015.

- TAVARES, M. et al. Trends in insect repellent formulations: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n. 1–2, p. 190–209, 2018.
- THAKUR, B. K.; KUMAR, A.; KUMAR, D. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 223–227, 2019.
- THI GIANG AN, N. et al. Mosquito Larvicidal Activity, Antimicrobial Activity, and Chemical Compositions of Essential Oils from Four Species of Myrtaceae from Central Vietnam. **Plants**, v. 9, p. 544, 2020.
- THOMPSON, G. D.; SPARKS, T. C. Spinosad: A Green Natural Product for Insect Control. **ACS Symposium Series**, v. 823, p. 61–73, 2002.
- TURAN, N. B. et al. Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity—A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 130, p. 238–249, 2019.
- USCÁTEGUI, Y. L.; DÍAZ, L. E.; VALERO, M. F. In vitro and in vivo biocompatibility of polyurethanes synthesized with castor oil polyols for biomedical devices. **Journal of Materials Research**, v. 34, n. 4, p. 519–531, 2019.
- USHIJIMA, Y. et al. Re-emergence of dengue, chikungunya, and Zika viruses in 2021 after a 10-year gap in Gabon. **IJID Regions**, v. 5, p. 68–71, 2022.
- VALLE, D. et al. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.
- VANI, J. M. et al. Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 148, p. 22–27, 2018.
- VONTAS, J. et al. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Special Issue: Molecular Approaches to Pest Control, Toxicology and Resistance. v. 104, n. 2, p. 126–131, 2012.
- WACHIRA, S. W. et al. Toxicity of six plant extracts and two pyridone alkaloids from *Ricinus communis* against the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 312, 2014.
- WAFI, G. et al. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 56, p. 43–51, 2014.
- WAMAKET, N. et al. Larvicidal and adulticidal activities of castor oil against the dengue

- vector, *Aedes aegypti*. **Tropical Biomedicine**, v. 35, n. 3, p. 610–618, 2018.
- WANG, L. et al. Ginseng volatile oil prolongs the lifespan and healthspan of *Caenorhabditis elegans*. **Biogerontology**, v. 23, n. 4, p. 485–497, 2022.
- WARIS, M. et al. Evaluation of larvicidal efficacy of *Ricinus communis* (Castor) and synthesized green silver nanoparticles against *Aedes aegypti* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 9, p. 2403–2409, 2020.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, 2010.
- WHO. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides** World Health Organization. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf>f?ua=1>.
- WIJAYARATNE, L. K. W.; ARTHUR, F. H.; WHYARD, S. Methoprene and control of stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 76, p. 161–169, 2018.
- WILDER-SMITH, A. et al. Deliberations of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization on the use of CYD-TDV dengue vaccine. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. e31–e38, 2019.
- WILDER-SMITH, A. et al. Dengue. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 2019.
- WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e101–e106, 2017.
- WILKE, A. B. B. et al. Community Composition and Year-round Abundance of Vector species of Mosquitoes make Miami-Dade County, Florida a Receptive Gateway for Arbovirus entry to the United states. **Scientific Reports**, v. 9, p. 8732, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Spinosad DT in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers**. Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/spinosadbg.pdf>.
- WURM, F. R.; WEISS, C. K. Nanoparticles from renewable polymers. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, 2014.
- XIE, Z. et al. Bioconcentration and ecotoxicity of sulfadiazine in the aquatic midge *Chironomus riparius*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 66, p. 69–74, 2019.
- XU, Q. Y. et al. Novaluron ingestion causes larval lethality and inhibits chitin content in *Leptinotarsa decemlineata* fourth-instar larvae. **Pesticide Biochemistry and**

- Physiology**, v. 143, p. 173–180, 2017.
- YAQOOB, A. A. et al. Thermal degradation and kinetics stability studies of oil palm (*Elaeis Guineensis*) biomass-derived lignin nanoparticle and its application as an emulsifying agent. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 103182, 2021.
- YAZHINIPRABHA, M.; VASEEHARAN, B. In vitro and in vivo toxicity assessment of selenium nanoparticles with significant larvicidal and bacteriostatic properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109763, 2019.
- YEBOAH, A. et al. Castor oil (*Ricinus communis*): a review on the chemical composition and physicochemical properties. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 399–413, 2020.
- YU, Z. et al. Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. **Nanoscale Research Letters**, v. 15, n. 1, p. 115, 2020.
- YUNTA, C. et al. Pyriproxyfen is metabolized by P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 78, p. 50–57, 2016.
- ZANUNCIO, J. C. et al. Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30261, 2016.
- ZARA, A. L. DE S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol. Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.
- ZARENEZHAD, E. et al. Promising larvicidal effects of chitosan nanoparticles containing *Laurus nobilis* and *Trachyspermum ammi* essential oils against *Anopheles stephensi*. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, n. 1, p. 895–904, 2022.
- ZHANG, Y. et al. Eco-Friendly Castor Oil-Based Delivery System with Sustained Pesticide Release and Enhanced Retention. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 33, p. 37607–37618, 2020.
- ZHOU, G. et al. Long-lasting microbial larvicides for controlling insecticide resistant and outdoor transmitting vectors: a cost-effective supplement for malaria interventions. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2020.
- ZHU, J.; NORIEGA, F. G. The Role of Juvenile Hormone in Mosquito Development and Reproduction. **Advances in Insect Physiology**, v. 51, p. 93–113, 2016.
- ZHU, Q. et al. Synthesis, insecticidal activity, resistance, photodegradation and toxicity of pyrethroids (A review). **Chemosphere**, v. 254, p. 126779, 2020.
- ZIELÍ NSKA, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization,

Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, p. 3731, 2020.

ZIKELI, F. et al. Preparation of Lignin Nanoparticles with Entrapped Essential Oil as a Bio-Based Biocide Delivery System. ACS Omega, v. 5, n. 1, p. 358–368, 14 jan. 2020.