



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DAS NANOPARTÍCULAS DE
PRATA ESTABILIZADAS EM NORBIXINA PARA CONTROLE DO VETOR**

***Aedes aegypti* L.**

FERNANDA RAYANNE FONSECA MENDES

TERESINA

2023

FERNANDA RAYANNE FONSECA MENDES

**ESTUDO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DAS NANOPARTÍCULAS DE
PRATA ESTABILIZADAS EM NORBIXINA PARA CONTROLE DO VETOR
Aedes aegypti L.**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí; Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Processamento e Simulação de Processos de Materiais

Especialização/ Sub-área: Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana.

Coorientadora: Prof. Dra. Deuzuita dos Santos Freitas Viana.

TERESINA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Mendes, Fernanda Rayanne Fonseca

M537e Estudo do potencial toxicológico das nanopartículas de prata estabilizadas em norbixina para controle do vetor *Aedes aegypti* L. / Fernanda Rayanne Fonseca Mendes. - 2023.
62 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Teresina Central, 2023.
Orientador : Prof Dr. Vicente Galber Freitas Viana.

1. Norbixina. 2. Nanopartículas de prata. 3. *Aedes aegypti*. I.Título.

CDD - 620.1

Elaborado por Tanize Maria Sales CRB 3/1024

FERNANDA RAYANNE FONSECA MENDES

ESTUDO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO DAS NANOPARTÍCULAS DE
PRATA ESTABILIZADAS EM NORBIXINA PARA CONTROLE DO VETOR
Aedes aegypti L.

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Engenharia de
Materiais; Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Piauí; Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Materiais.

Aprovada em: 05/10/2023

BANCA EXAMINADORA

assinatura no original

Prof. Dr Vicente Galber Freitas Viana

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI

Orientador

assinatura no original

Profa. Dra. Deuzuita dos Santos Freitas Viana

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Coorientadora

assinatura no original

Prof. Dr. Haroldo Reis Alves de Macedo

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI

Avaliador Interno

assinatura no original

Prof. Dra. Laice Fernanda Gomes de Lima

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado até aqui e aberto todos os caminhos para que isso fosse possível.

Agradeço a todos os professores e servidores do PPGEM do Campus Teresina Central, pois sem a dedicação nada disso seria possível.

Aos meus orientadores e coorientadores que me acompanharam nesse caminho mostrando o caminho da pesquisa científica em laboratório.

Agradeço especialmente aos meus colegas de laboratório, cuja as conversas e debates sobre as mais diversas pesquisas foram sempre muito elucidativos, das quais colhi bons frutos.

Agradeço aos meus pais, que sempre torceram por mim, pelo imenso apoio que tornou essa pesquisa viável.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de transmissão dos vírus causadores da Dengue, da febre Chicungunha e da febre Zika. Devido a alta taxa reprodutiva desse mosquito junto e sua capacidade de desenvolver resistência aos larvicidas e pesticidas, o controle populacional de *Aedes aegypti* continua a ser uma questão de suma importância na saúde. O trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial da norbixina e sua união com nanopartículas de prata ao serem usadas como agente larvicida no combate ao *Aedes aegypti*. Os materiais sozinhos e em conjunto foram caracterizados por FT-IR, DRX e UV-Vis. O teste toxicológico preliminar feito em *Artemia salina*, indicou a CL₅₀ na concentração de 100 µg/mL e a CL₉₀ na concentração de 150 µg/mL, para a solução de norbixina. Já nas larvas de *Aedes aegypti* foi utilizado $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L de norbixina para ter uma ação larvicida, onde observou-se que a solução de norbixina é mais efetiva a longo prazo e sem a presença de nanopartículas de prata.

Palavras-chave: norbixina; nanopartículas de prata; *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

The insect called *Aedes aegypti* is the main transmission vector of the Dengue, Chikungunya and Zika virus. Due to the high reproductive rate of this mosquito and its ability to develop resistance to larvicides and pesticides, population control of the *Aedes aegypti* continues to be a matter of importance in health issues (Brasil, 2021). This research aims to evaluate the potential of norbixin and together with silver nanoparticles to be used as a larvicidal agent in the fight against this mosquito. The materials, alone and together, were characterized by FT-IR, XRD and UV-Vis. The preliminary toxicological test carried out on *Artemia salina*, an aquatic microcrustacean, indicated the LC₅₀ at a concentration of 100 µg/mL and the LC₉₀ at a concentration of 150 µg/mL, for the norbixin solution, nanoparticles testing was impracticable. Using the *Aedes aegypti* larvae there is a 2.5×10⁻⁴ mol/L concentration of norbixin used to have a larvicidal action, where showed it was that the solution is more effective in the long term action and without the presence of silver nanoparticles.

Keywords: silver nanoparticles; norbixin; *Aedes aegypti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fêmea de <i>Aedes aegypti</i>	13
Figura 2 – Molécula de norbixina	17
Figura 3 – Conversão da bixina em norbixina	19
Figura 4 – Mecanismos de toxicidade das AgNPs no corpo das larvas do mosquito	23
Figura 5 – Fluxograma de extração da norbixina	25
Figura 6 – Processo de síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)	27
Figura 7 – Ovitrapa em campo	30
Figura 8 – Processo de Triagem de mosquitos	31
Figura 9 – Soluções fabricadas.	33
Gráfico 1 – Difratoograma de Raios-X das Amostras	34
Gráfico 2 – Infravermelho das amostras.....	35
Gráfico 3 – Espectro UV-Vis da norbixina.....	38
Gráfico 4 – Espectro UV-Vis das nanopartículas de prata.....	39
Gráfico 5 – Norbixina + AgNPs.....;	40
Figura 10 – Variação da concentração de norbixina	41
Gráfico 6 – Concentração Letal (CL) da norbixina	41
Figura 11 – Degradação das nanopartículas de prata em água salina durante o contato	42
Figura 12 – Ensaio larvicida com as soluções Nbx1 e Nbx2.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira De Normas Técnicas
Abs	Absorbância
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartícula de Prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C	Carbono
C-C	Ligação simples entre carbonos
C=C	Ligação dupla entre Carbonos
CEE	Comunidade Econômica Europeia
CHIKV	Nome do vírus causador da febre Chikungunya
CL	Concentração Letal
cm	Centímetro
CONASS	Conselho Nacional de Secretários de Saúde
CONASEMS	Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde
Denv-1	Variante 1 do vírus causador da febre dengue
Denv-2	Variante 2 do vírus causador da febre dengue
Denv-3	Variante 3 do vírus causador da febre dengue
Denv- 4	Variante 4 do vírus causador da febre dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração De Raios-X
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
FAO	Food And Agriculture Organization Of The United States
FT-IR	Infravermelho Por Transformada de Furrier
H	Hidrogênio
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 ou Aides
KBr	Brometo de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
Labem	Laboratório de Entomologia Médica
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
mL	Mili-Litro
mg	Miligrama
Mol	Quantidade de matéria

NaBH ₄	Boro-Hidreto De Sódio
NBR	Norma Brasileira
NbxAgnp	Norbixina com Nanopartícula de Prata
NCBI	National Center For Biotechnology Information
Nm	Nanometro
O	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PAHO	Pan American Health Organization
PH	Potencial Hidrogenionico
UV-Vis	Ultravioleta Visível
μL	Micro Litro
μg	Micro gramas
NaNO ₂	Nitrato De Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
WHO	World Health Organization
ZIKA	Nome do vírus causador da febre Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVOS GERAL.....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DO <i>Aedes aegypti</i>	12
3.2	MOLÉCULA DE NORBIXINA.....	15
3.2.1	Aplicações e Regulamentações	15
3.2.2	Propriedades Químicas	17
3.2.3	Estudos toxicológicos	18
3.3	NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs).....	20
3.3.1	História do uso	20
3.3.2	Nanopartículas de prata como agente larvicida	22
4	MATERIAL	25
4.1	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NORBIXINA	25
4.2	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)	26
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICOQUÍMICA	27
4.3.1	Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	27
4.3.2	Caracterização por Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-visível (UV-Vis)	28
4.3.3	Caracterização por Difração de Raios-X (DRX)	28
4.4	Ensaio de Ecotoxicologia aquática em <i>Artemia salina</i>	28

4.5	COLETA, CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE <i>Aedes aegypti</i>	29
4.5.1	Localização e Caracterização Geográfica	29
4.5.2	Preparação das ovitrampas para coleta dos ovos	30
4.5.3	Triagem de Mosquitos e Manutenção da Colônia	31
4.5.4	Ensaio Larvicida em <i>Aedes aegypti</i>	32
5	Resultados e discussão	34
5.1	CONCLUSÃO DAS SINTESES	34
5.2	DADOS DA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X(DRX)	34
5.3	DADOS DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FURRIER (FT-IR)	36
5.4	DADOS DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA (UV-Vis)	37
5.4.1	Absorbância no Ultravioleta (UV-Vis) da norbixina	37
5.4.2	Absorbância no Ultravioleta (UV-Vis) da Nanopartícula de prata (AgNPs)	39
5.4.3	Absorbância no Ultravioleta (UV-Vis) da AgNPs com Norbixina	40
5.5	ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO	41
5.5.1	Ensaio em <i>Artemia salina</i>	41
5.5.2	Ensaio em <i>Aedes aegypti</i>	44
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* L. (Díptera: Culicidae) é um dos insetos mais adaptados ao convívio com os seres humanos, tendo o seu ciclo reprodutivo intimamente ligado ao contato com a humanidade e o clima neotropical. Seu ciclo reprodutivo seria a priori inofensivo, no entanto essa espécie tornou-se vetor de arboviroses, responsável por transmitir os vírus causadores da dengue, zika, chikungunya e a febre amarela urbana (Consoli; Oliveira, 1998).

Nos últimos anos, com o aumento da intensidade das chuvas na América do Sul, notou-se um crescente de casos das doenças transmitidas por esse mosquito, sobretudo, a dengue. Neste cenário têm sido de grande preocupação no setor de saúde as complicações no tratamento de pacientes quando ocorre a co-contaminação da dengue e do coronavírus (Venkatesh *et al.*, 2022; Nicolette, 2021). A epidemia é sazonal, pois depende do tamanho populacional do *Aedes*, que cresce exponencialmente no período chuvoso. Portanto, a melhor forma de controle da epidemia é o controle reprodutivo do mosquito (Fundação Osvaldo Cruz, 2022). Para este fim, além do monitoramento de água parada, muitos larvicidas e pesticidas já foram desenvolvidos.

A maioria dos larvicidas são fórmulas químicas desenvolvidos em laboratório e apesar de terem seu uso aprovados o uso, trouxeram efeitos adversos na saúde e na natureza, pois não são processados no ciclo biogeoquímico. Entre os problemas causados pelos larvicidas e pesticidas têm destaque a poluição química da água; poluição do solo; atividade neurotóxica em humanos; contaminação de alimentos; contaminação no pré-natal e no leite materno; contaminação de animais, entre outros (Mekonen *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021; Carneiro, 2022; Ganie, 2022; Niantakyi, 2022; Yang, 2022; Zarei-Choghan, 2022).

A crescente resistência à larvicidas e inseticidas em populações de *Aedes aegypti* em todo o globo impulsiona ainda mais a pesquisa por novos materiais com eficácia (Gan *et al.*, 2021; Solis-Santoyo *et al.*, 2021; Boyer *et al.*, 2022).

Devido a estas questões aumentou-se o interesse pelos chamados biolarvicidas, que são caracterizados principalmente como um produto

biológico de baixo impacto para a saúde humana e que não acumula no ambiente ou causa impactos negativos em animais e plantas. Na busca por substâncias anti-microbiológicas mais sustentáveis, as nanopartículas de prata têm ganhado notoriedade. Esse destaque vem da possibilidade de aplicações diversas como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios, antitumorais, regeneradores, biosensores e catalisadores (Chen; Schluesener, 2008; Nowack; Krug; Height, 2011; Benedito; Silva; Santos, 2017).

Neste cenário, os extratos da *Bixa orellana*, conhecido popularmente no Brasil como urucum, preparados do tegumento das sementes, têm uma relação com este inseto pouco explorada, mas conhecida principalmente por comunidades tradicionais indígenas por evitar picadas de mosquitos, além de conferir proteção a pele dos raios solares (Cavalcante *et al.*, 2005; Montanha; Barboza; Oliveira, 2014). O princípio ativo do extrato se deve aos carotenoides bixina e norbixina, principais responsáveis por tais propriedades (Giuliano; Rosati; Bramley, 2003). Em resumo, os principais usos da norbixina e da bixina na indústria se deve ao uso como corante de diversas substâncias, sobretudo alimentícias. Devido a isso suas propriedades como antioxidante e níveis de segurança toxicológica para ingestão de mamíferos são extensamente estudadas, mas a relação dessa substância com outros grupos, como os insetos, é inexplorada.

Não havendo registros de pesquisas anteriores sobre possíveis relações entre os princípios ativos do urucum isolados e os culicídeos, este trabalho se propõe a investigar a possibilidade da ocorrência de um efeito larvicida da norbixina quando dissolvida em água. Além disso foi usado nanopartículas de prata como comparativo de eficiência e verificação de possível ação sinérgica. Devido a sua grande extensão de pesquisas voltadas para AgNPs como larvicida, será utilizado a via mais simples e comum de obtenção das mesmas, a rota por redução química do boro-hidreto. Desse modo espera-se que no futuro este trabalho possa servir como base para comparação de ação de diferentes nanopartículas em solução de norbixina em pesquisas larvicidas e de toxicologia aquática.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso da norbixina como um potencial biolarvicida no controle populacional de *Aedes aegypti*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar e caracterizar a solução de norbixina;

Caracterizar a solução de nanopartículas de prata estabilizadas em norbixina através de técnicas de físico-química;

Verificar a atividade toxicológica mínima das soluções desenvolvidas utilizando o teste de toxicidade aquática em *Artemia salina*;

Comparar o potencial toxicológico da solução de norbixina com o potencial toxicológico da solução de nanopartículas de prata estabilizada em norbixina em larvas de *Aedes aegypti*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DO *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* L. (Figura 1) é conhecido popularmente como “mosquito da dengue” e originário do Egito, assim como o vírus causador da dengue. Sua disseminação pelo globo começou no século 16 com as grandes navegações. No Brasil, o primeiro registro da doença ocorreu no final do século 19 em Niterói, no Rio de Janeiro (Fundação Oswaldo Cruz, 2022). Devido a sua rápida proliferação e a capacidade de seus ovos de resistir por mais de 1 ano a estiagem, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera atualmente impossível a exterminação completa do *Aedes aegypti* (OPAS/OMS, 2022).

Figura 1 – Fêmea de *Aedes aegypti*



Fonte: James Gathany, 2005

Em 1908, no Brasil, foi detalhado o ciclo de vida, características e hábitos reprodutivos desta espécie de *Aedes*, entre outras espécies de culicídeos (Peryassu, 1908). Esta publicação revolucionou o combate à dengue, pois correlacionou a densidade populacional humana e do *Aedes*

aegypti, investigou a resistência à dessecação e como a temperatura ambiente afeta a eclosão e crescimento nos estágios iniciais da larva (Consoli; Oliveira, 1998; Fundação Osvaldo Cruz, 2022).

Após uma campanha de mais de 20 anos de combate ao vetor, em 1955 o mosquito da dengue foi oficialmente registrado como erradicado das terras brasileiras. No entanto, ele foi repetidamente reintroduzido em 1967, 1977 e 1980, passando a estar presente em todo o território brasileiro (Fundação Osvaldo Cruz, 2022).

Segundo os registros da OMS, com a distribuição do mosquito, a dengue se espalhou por todas as regiões do globo e a incidência de casos cresceu rapidamente nas últimas 4 décadas. Só na região das américas foram acumulados 1,5 milhão de casos na década de 80 e esse número saltou para 16,2 milhões entre 2010 e 2019, sendo que o Canadá e o Chile são os únicos atualmente livres tanto da dengue quanto do vetor (PAHO, 2020).

A transmissão da dengue, febre chikungunya e febre zika aumenta nos meses de janeiro a junho, devido a relação climática com o controle dos criadouros do mosquito *Aedes aegypti*. Por isso, a secretária de vigilância em saúde intensifica ações de preparação para o próximo período sazonal durante os meses de novembro e dezembro para evitar um aumento intenso dos casos no início do ano seguinte (Brasil, 2020).

A infecção causada pela dengue (Denv-1, Denv-2, Denv-3 e Denv- 4) ocorre em climas tropicais e subtropicais, principalmente em áreas urbanas e semiurbanas, afetando seres humanos de todas as idades, podendo ou não ser assintomática. Os sintomas gerais variam de febre baixa a febre alta incapacitante, com forte dor de cabeça, dor atrás dos olhos, dores musculares e nas articulações e erupções cutâneas. Quando o caso progride para dengue grave caracteriza-se por choque, falta de ar, sangramento intenso podendo ter complicações graves nos órgãos (Brasil, 2021). Atualmente não existe um medicamento específico para tratar do vírus, torna-o uma das principais causas de doenças graves e morte entre crianças em países de vulnerabilidade social na Ásia e na América Latina (OPAS/OMS, 2022; PAHO, 2020).

No caso da chikungunya (CHIKV), após a fase inicial ela pode evoluir para as fases subaguda e crônica que têm duração de até 3 anos. Em casos

mais graves a artralgia (dores articulares intensas) pode ser persistente e destrutiva diminuindo a qualidade de vida (Brasil, 2020).

A febre zika (ZIKV) têm a duração média entre 3 até 6 dias, mas pode ter complicações mais severas. Os sintomas abrangem febre, conjuntivite, cefaleia, artralgia, astenia, rash maculopapular, pode levar a síndrome de Guillain-Barré (doença autoimune neurológica) que causa paralisia e fraqueza muscular generalizada. E em grávidas pode ocorrer a cefaleia em recém-nascidos (Brasil, 2020).

Em 2020 vários países registraram uma alta nos casos segundo a Pan American Health Organization (PAHO) em relação aos dados de 2019, com mais de 3,1 milhões de casos reportados, incluindo 28.176 casos severos e 1.535 mortes por dengue. Sendo que no intervalo de janeiro até maio já tinham sido reportados 1,4 milhões de casos nas américas (PAHO, 2020).

No Brasil, em 2020, foram notificados 979.764 casos prováveis de dengue. Na região nordeste do Brasil, ocorreu cerca de 261,4 casos por 100 mil habitantes no ano de 2020. Para casos de agravamento da dengue no país foram 9.002 com sinais de alarme, 790 casos graves e 541 óbitos confirmados e mais 138 em investigação. Em relação a chikungunya foram notificados 80.914 casos prováveis no país e o Nordeste apresentou a maior taxa de incidência com 102,2 casos por 100 mil habitantes. A zika teve cerca de 7.119 durante o mesmo ano (Brasil, 2020).

No estado do Piauí no ano de 2020 foi detectada somente a circulação do sorotipo Denv-2, sendo registrados 2.147 casos de dengue, 178 casos de chikungunya e 15 casos de zika. Desse número, na primeira metade do ano foram registrados respectivamente 82%, 80,33% e 80% de casos para dengue, chikungunya e zika. Para o ano de 2021, o Piauí registrou uma alta nos casos, sendo eles 3.534 casos de dengue, 228 casos de chikungunya e 56 casos de zika (Brasil, 2021).

Para prevenir a transmissão destas doenças no Brasil o governo investe principalmente no programa nacional de controle da dengue, que foca no controle do vetor *Aedes aegypti* pela população e por agentes governamentais. Nas américas, durante o período de 2000 até 2007, o Brasil foi o país que apresentou os maiores gastos anuais induzidos pela dengue, com uma média

de US\$1,35 bilhão/ano considerando custos diretos e indiretos (Shepard *et al.*, 2011).

Em 2015 foram registrados no Brasil 1,65 milhão de casos de dengue com 811 óbitos, também ocorreram 8.499 casos prováveis de febre de chikungunya, número que aumentou no ano seguinte. No ano de 2016 o Brasil gastou cerca de R\$ 374 milhões no custo médico direto do tratamento de arboviroses. Como custos indiretos é estimado aproximadamente uma perda de R\$ 431 milhões de produtividade por afastamentos relacionados com as arboviroses transmitidas por *Aedes aegypti*, principalmente associado a febre chikungunya. Considerando os custos totais com o manejo das arboviroses, o país sofreu com um impacto de aproximadamente R\$ 2,3 bilhões em 2016 (Teich; Arinelli; Fahham, 2017).

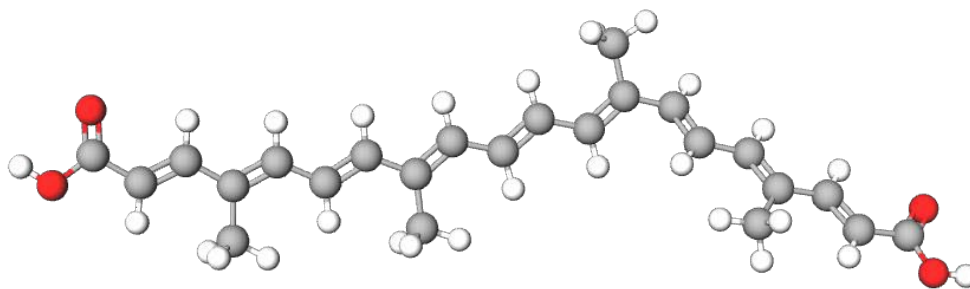
No ano de 2020 além dessas iniciativas foi realizada uma reunião virtual intitulada “Monitoramento da Resistência a Inseticidas 2020-2021” com representantes das 26 unidades federadas e mais o distrito federal, capitais, municípios de fronteira, Conselho Nacional de Secretários de Saúde (CONASS) e pelo Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde (CONASEMS) em julho de 2020 (Brasil, 2021), para tratar de direcionamentos no combate ao *Aedes aegypti*, principalmente no monitoramento da qualidade e seleção tanto de inseticidas quanto larvicidas a serem comprados e distribuídos para uso focado em manutenção da saúde pública.

3.2 MOLÉCULA DE NORBIXINA

3.2.1 Aplicações e Regulamentações

A norbixina, Figura 2, é um carotenoide produzido naturalmente pela *Bixa orellana* L., popularmente chamado de urucum. A obtenção deste componente pode ser feito pela saponificação da bixina, que se encontra em maiores quantidades na polpa aderida ao tegumento das sementes de urucum (Stringhet; Silva, 2008). A bixina e a norbixina são os princípios ativos de maior relevância extraídos da semente cuja a coloração característica vai do vermelho ao amarelo (de Castro *et al.*, 2009).

Figura 2 – Molécula de norbixina



Fonte: De autoria própria.

O urucum é usado por vários povos indígenas no preparo de tintas corporais e cada povo tem seu método próprio (Montanha; Barboza; Oliveira, 2014). Segundo o povo Kraô a tinta que eles fazem a partir das sementes é usada para passar na pele, apresentando tanto ação antisséptica quanto repelente (Cavalcante, 2005). Em uma pesquisa preliminar sobre os compostos voláteis de urucum, Giorgi *et al.* (2013) constatou o potencial da planta para agir como repelente. Além da pintura corporal também é usado para a preservação de alimentos e para a pintura de ossos no enterramento secundário (Cavalcante, 2005).

No Brasil o uso do urucum, da bixina e da norbixina está permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contando na Resolução nº 382, de 5 de agosto de 1999, que regulamenta o uso da bixina, norbixina e demais extratos da semente de urucum em molhos e condimentos, também a liberação para uso em outros alimentos e diferentes ramos, como a indústria dos cosméticos em outras resoluções. A comercialização se dá em todo o território nacional, principalmente na venda como corante alimentício de produtos cárneos (Demczuk; Ribani, 2014). A norbixina em especial têm a capacidade de reagir com a caseína, tornando-a um pigmento importante na indústria dos laticínios, com destaque para a coloração de queijos (Alehosseini *et al.*, 2021).

O uso dessa substância como corante ocorre no mundo todo e possui diversas regulamentações. A diretiva 95 45 CE da comissão de 26 de julho de 1995 estabelece um consenso do uso e pureza do urucum, da bixina e da

norbixina como corante feito pela Comunidade Econômica Europeia (CEE) sob o número de registro e160b e CL-natural-color. A *Food And Agriculture Organization Of The United States* (FAO) em conjunto com a *World Health Organization* (WHO), criou o *Food Chemical Codex* que estabelece parâmetros para uso de extratos de urucum com base em norbixina como corante de forma segura e sem sabor, com o ins.160b(ii) (FAO/WHO, 2011). Também é regularizado pela *Foods Standards Agency*, programa que regulamenta alimentos importados no Reino Unido.

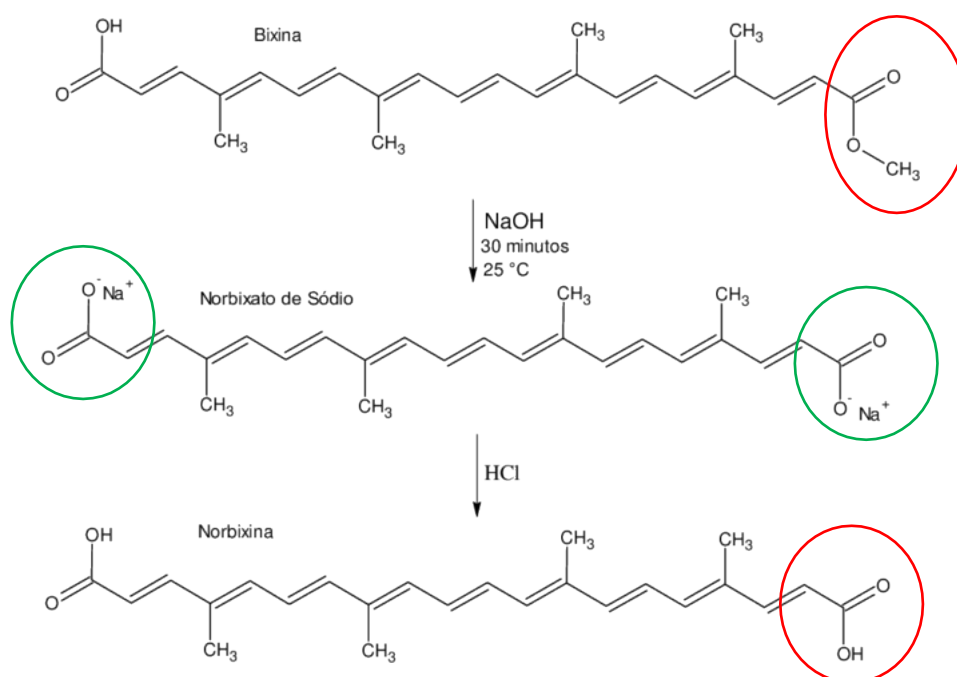
3.2.2 Propriedades Químicas

A estrutura completa e estereoquímica da bixina, norbixina e outras derivadas, foram estabelecidas em 1961 por McKeown. Já a cristalização da bixina foi obtida pela primeira vez por Etti (1878). A bixina e a norbixina têm a particularidade de serem carotenoides contendo dois grupamentos fortemente polares (Pimentel, 1995).

Em natura, a rota de síntese da bixina e da norbixina supõe-se que seja a partir da clivagem enzimática de uma ligação dupla específica do carotenoide licopeno conduzidas pelas enzimas desoxigenasse e desidrogenasse que dará formação a molécula de norbixina, onde a partir da catalisação desta pela enzima metiltransferase será produzida a molécula de bixina (Stringhet; Silva, 2008). Esse processo é reversível e pode ocorrer de forma natural pela desmetilação da bixina formando novamente norbixina (Crispim, 2019).

A extração destes pigmentos do urucum pode ser feita utilizando óleos de soja ou milho, solventes orgânicos com acetona, clorofórmio, propilenoglicol, ou por extração alcalina utilizando KOH e NaOH. Durante a extração alcalina o excesso de álcali faz com que o ácido dicarboxílico se dissocie da molécula causando uma hidrólise do principal éster da bixina, saponificando a bixina e dando origem ao sal de norbixina, ou norbixinato, geralmente de sódio ou de potássio. A adição de ácido ao meio causa a reprotonação do norbixinato resultando na molécula de bixina, produzindo assim a norbixina como corante principal (Stringheta; Silva, 2008). Esse processo pode é exemplificado na Figura 3.

Figura 3 – Conversão da bixina em norbixina



Em vermelho o grupo funcional que diferencia bixina e norbixina. Em verde o grupo funcional do norbixinado de sódio (intermiário entre as estruturas).

Fonte: Adaptado de Stringheta e Silva, 2008

A presença de dois grupos funcionais -COOH da norbixina caracteriza-a como um composto ácido dicarboxílico, contribui para a sua propriedade aniônica (Crispim, 2019). Sua fórmula química é C₂₄H₂₈O₄, podendo doar cerca de 2 ligações de hidrogênio ou aceitar 4, têm a contagem de ligações de estereocentros igual a 9 e uma ligação covalente (NCBI, 2023).

3.2.3 Estudos toxicológicos

A toxicidade da norbixina foi estudada em uma exposição oral em ratos durante 12 semanas usando um extrato de urucum, com a concentração de norbixina estimada em 91,6%. Resultando que a suplementação de alimentos com o teor de 0,9% do extrato causou a hipertrofia de hepatócitos e a partir de 0,3% foi observado um aumento na quantidade de mitocôndrias, enquanto 0,1% não causou alterações. Mas essas modificações não foram considerados significativos para toxicologia, já que elas desaparecem logo após o termino da

suplementação pois a norbixina é expelida em até 24 horas do corpo (Hagiwara *et al.*, 2003).

A Comissão Europeia requisitou uma pesquisa sobre a segurança da ingestão da norbixina por gatos e cachorros obtendo que, a cis-norbixina não apresenta toxicidade *in vivo*, nem riscos de toxicidade no desenvolvimento e é uma substância considerada não carcinogênica. Sendo definido que a norbixina é considerada segura para gatos na concentração máxima de 13 mg/kg de ração completa e para cães na concentração máxima de 16 mg/kg de ração completa (EFSA, 2017).

Em testes *in vitro* a suplantação de eritrócitos com norbixina, aumentou a resistência das células contra estresse osmótico, além disso ajudou a proteger a célula de sofrer fragilidade na membrana causado por nitrato de sódio (NaNO_2) e fragilidade induzida por glicose. Mas *in vivo* a norbixina só foi capaz de proteger as células do estresse causado pelo NaNO_2 (Beni *et al.*, 2020). No plasma humano a norbixina elevou os níveis dos antioxidantes glutathiona e da glutathiona-peroxidase e a administração oral de norbixina seguido do consumo de carne gordurosa diminuiu a concentração de malondialdeído, que é um indicador de estresse oxidativo, no plasma sanguíneo (Camelo *et al.*, 2020).

A característica antioxidante e anti-inflamatória da molécula de norbixina foi estudada na França por possíveis benefícios no uso como neuroprotetor em casos de degeneração macular (Camelo *et al.*, 2020). Os primeiros testes em ratos foram feitos através da alimentação. Nos primeiros 3 meses não houve diferença em comparação com o grupo controle, a pós seis meses já foi visível a preservação macular do dano causado por amplitudes escotópicas (baixa luminosidade) e fotópticas (alta luminosidade) (Fontaine *et al.*, 2020). Posteriormente a aplicação em ratos de um composto gerado a partir da norbixina, aplicado via repetidas injeções intraperitoneais, teve um resultado melhor protegendo a função visual de ratos albinos contra a degeneração da retina pela exposição aguda de luz azul, além de ter um efeito protetor na retina em condições de baixa e alta luminosidade (Fontaine *et al.*, 2023).

A norbixina também já foi investigada como agente cicatrizante. No trabalho de Santos, Sousa e Aguiar (2014) quando o extrato do urucum foi

aplicado no leito truculento da ferida houve um recrutamento maior de células inflamatórias para local e embora também tenha aumentado o número de fibroblastos não houve muita deposição de colágeno no local da ferida em comparação com o grupo controle. Resultado similar ao de Maia Filho *et al.* (2017) onde a norbixina foi utilizada em conjunto com as nanopartículas de prata na obtenção de um gel com efeito cicatrizante em queimaduras, obtendo relativa eficácia na contração do tecido danificado.

Além disso estudos de docagem molecular mostram outras possibilidades de uso para a molécula. Silva *et al.* (2017) realizaram um estudo computacional da capacidade da bixina e da norbixina de se ligarem ao uma proteína do sítio ativo do DENV-4, uma das variantes virais da dengue, obtendo bons resultados de estabilidade. A bixina foi avaliada novamente como possível inibidor do DENV-3 (Fonseca *et al.*, 2022), do ZIKA vírus (Sobrinho *et al.*, 2022) e contra o HIV-1 onde se acoplou na mesma região do fármaco Saquinavir, mostrando que tem potencial de ser usado contra esse vírus (Silva, J. *et al.*, 2018).

Como a norbixina e seus isômeros estão muito ligados ao consumo por seres humanos, é carente o estudo da toxicologia desse componente em espécies que não sejam do grupo dos mamíferos.

3.3 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS)

3.3.1 História do uso

As primeiras sínteses das nanopartículas de prata (AgNPs), similar a metodologias atuais pela rota do citrato, retomam do ano de 1889 (Nowack; Krug; Height, 2011), entretanto o conhecimento aprofundado do que é o material só surgiu anos mais tarde. No final do século 20 o conhecimento e interesse na síntese de nanopartículas cresceu muito, principalmente pelas suas propriedades como antibiótico. Mas devido a ocorrência da 1ª Guerra Mundial e a descoberta da penicilina com um custo menor de produção, o uso das nanopartículas como agente antimicrobiano perdeu notoriedade na época (Rai; Yadav; Gade, 2009).

Apesar de seu uso ser antigo, os estudos para se determinar com precisão os mecanismos de interação bioquímica que a nanopartícula de prata têm em contato com os seres vivos continua sendo estudado. No entanto, por ter um caráter antisséptico, entre outras propriedades, as AgNPs tornaram-se de grande interesse farmacológico. Varadavenkatesan, Vinayagam e Selvaraj (2017) mostraram que as AgNPs também têm potencial para serem utilizadas como anticoagulante, pois elas foram capazes de solubilizar coágulos sanguíneos no intervalo de 5 minutos.

Smekalova *et al.* (2016) avaliou o efeito da combinação de nanopartículas de prata com os antibióticos amoxicillin, penicillin g, colistin e gentamicin contra os patógenos *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus uberis*. De forma geral o crescimento das bactérias Gram positivas foi menos inibido que o crescimento das bactérias Gram negativas. Na pesquisa foram observados efeitos sinérgicos entre AgNPs e os antibióticos no aumento da atividade bactericida.

Shaker e Shaaban (2017), testaram as AgNPs contra patógenos resistentes aos antibióticos baseados em b-lactams, aminoglycosides e quinolones, que formavam biofilmes. As AgNPs foram eficientes em inibir a síntese de biofilmes por patógenos resistentes a múltiplos fármacos. Sendo a concentração inibitória mínima para obter esse resultado em bactérias gram-negativas em valores mínimos de aproximadamente 3 microgramas por mL, efeito associado ao tamanho pequeno das partículas, entre 37 e 168 nm.

Para seres humanos as AgNPs já estão catalogadas como tendo baixa toxicidade (Benedito; Silva; Santos, 2017). Isto se baseia principalmente nos resultados de pacientes com argyria, uma condição caracterizada por deixar a pessoa permanentemente com a pele azul-acinzentada após ingestão prolongada de prata coloidal. Esses casos surgiram principalmente entre 1924 e 1939 devido a automedicação com nano prata coloidal de algumas pessoas da época (Nowack; Krug; Height, 2011; Duran *et al.*, 2019).

As reações toxicológicas severas só foram observadas em humanos que ingeriram concentrações muito altas de AgNPs, ou em formas mais instáveis. A

legislação brasileira estabelece um limite de 0,010 mg/L⁻¹ de Ag total para águas potáveis (Benedito; Silva; Santos, 2017).

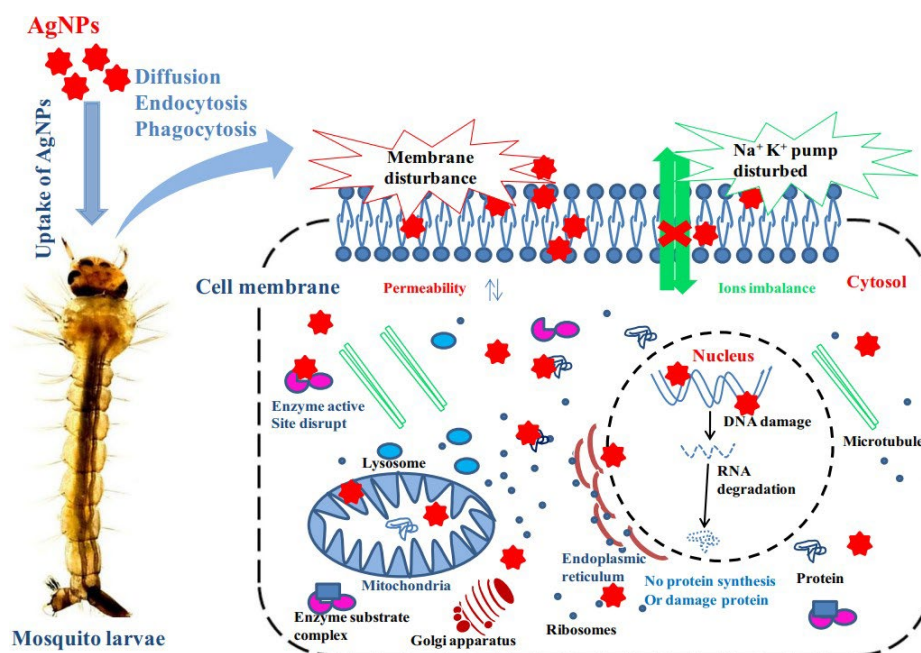
Os principais indícios que justificam a ação citotóxica atualmente são a oxidação celular e a liberação de íons de prata no interior celular. Isso se deve principalmente pelas AgNPs se ligarem com a membrana dos microrganismos desencadeando reações de oxidação que provocam a ruptura regional da membrana facilitando a penetração de íons na célula. Foi observado também que em muitos microrganismos as AgNPs são desfeitas liberando íons de prata que são distribuídas pelo citoplasma e pelo núcleo celular causando reações adversas (Pandian 2010; Duran *et al.*, 2019). Em relação à atividade da prata em escala nanométrica, a ação que ela irá desempenhar pode mudar de acordo com a variação do formato e tamanho (Xie *et al.*, 2007; Samberg; Orndorff; Monteiro-Riviere, 2011).

3.3.2 Nanopartículas de prata como agente larvicida

Na última década, com o avanço da inovação dos métodos de síntese de nanopartículas de prata e a diversificação das propriedades da mesma, a pesquisa sobre o potencial das AgNPs como larvicida cresceu. Como a resistência do *Aedes aegypti* aos larvicidas evolui rapidamente, novas alternativas de combate ao vetor da dengue são continuamente desenvolvidas.

O trabalho de Benelli (2016) apontou o crescimento da busca de diferentes formas de sintetizar e utilizar nanopartículas de prata com extratos vegetais, como forma de combate ao *Aedes aegypti* nos últimos anos. A ação das AgNPs no corpo larval causam reações diferentes dependendo das características de cada nanopartícula, como compilado nas pesquisas de Kumar *et al.* (2020) e Zohra *et al.* (2022). Um esquema das possíveis reações na célula das larvas de *Aedes aegypti* pode ser visto na Figura 4.

Figura 4 – Mecanismos de toxicidade das AgNPs no corpo das larvas do mosquito.



Fonte: Kumar *et al.*, 2020.

Outro dado muito importante para se avaliar a toxicidade é descoberta a aplicação da Concentração Letal para 50% (CL₅₀) dos espécimes e o valor da concentração Letal pra mortalidade em 90% da amostra (CL₉₀). O Alharbi *et al.* (2018) sintetizou AgNPs usando o extrato aquoso de *Bauhinia acuminata*. Somente o extrato aquoso tinha CL₅₀ de 226,02 µg/mL e as AgNPs sintetizadas obtiveram taxa de mortalidade cerca de 8 vezes, em 27,19 µg/mL. Em geral os valores são similares ao de Rajput, Kumar e Agrawal (2020) sintetizou AgNPs usando *A. acuminata* que teve um CL₅₀ 12,39 ppm e CL₉₀ 36,34 ppm. As nanopartículas de prata sintetizadas usando o extrato aquoso de *A. caesia* foram testadas para uso contra larvas de 3 espécies de mosquito, *Aedes albopictus*, *An. subpictus* e *Cx. tritaeniorhynchus*, alcançando valores de CL₅₀ de 11,32 µg/mL; 10,33 µg/mL; 12,35 µg/mL, respectivamente (Benelli *et al.*, 2017).

Alshehri *et al.* (2020) sintetizou AgNPs usando o extrato aquoso de *Rhazya stricta* e comparou a mortalidade de *Aedes aegypti* da Índia e da Arábia Saudita e obteve que os espécimes que vieram da Arábia Saudita precisaram de 3 vezes a dose de CL₅₀ e CL₉₀ das espécimes coletadas na

Índia. No trabalho de Aziz (2022) as nanopartículas fabricadas usando *Ulva lactuca* inibiram emergência de pulpas em 48,7% e a emergência de adultos foi reduzida em 3,5%. Além disso, foram realizados testes usando marcadores genéticos que constataram que ocorreu modificações na estrutura do DNA das larvas.

Fouad *et al.* (2018) usou a polpa da fruta *Cassia fistula* para sintetizar AgNPs e analisou sua atividade contra larvas do primeiro ao quarto estágio larval e a pulpa dos mosquitos *Aedes albopictus* e *Cx. pipiens pallens* e a sua influência no nível de proteínas do metabolismo. Após 24 horas expostas às nanopartículas, as larvas tiveram uma redução de cerca de 60% das proteínas do corpo larval.

4 MATERIAL

4.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NORBIXINA

A norbixina foi extraída utilizando uma solução alcalina de hidróxido de potássio (KOH) a 4%, segundo a técnica descrita primeiro por Pimentel (1995). O processo de extração da norbixina usando uma solução alcalina é o mais utilizado pela indústria para produção de corantes de urucum (Stringheta; Silva, 2008). Isso acontece porque a bixina, pigmento de maior concentração na semente do urucum, não é solúvel em água, mas o faz em meio alcalino. Nessas condições o grupo metil da bixina pode ser saponificado dando origem a norbixina, que é o ácido carboxílico resultante (Stringheta; Silva, 2008). A norbixina pode ser separada da solução pelo processo de precipitação ácida e filtragem. O passo a passo está descrito na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma de extração da norbixina



Fonte: De autoria própria.

A solução de norbixina foi preparada na molaridade de 5×10^{-4} mol/L. Para isso foram mensurados aproximadamente 0,2 g de norbixina em pó, para serem diluídos em 1,0L. Para contornar a questão da norbixina ser insolúvel em água, o pó foi previamente dissolvido, em 100mL de álcool 70% e posteriormente em 100mL de água. Para maior eficiência dessa etapa, o bquer ficou em agitação no ultrassom durante 30 minutos. Em seguida a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 litro, onde a quantidade requerida foi completada com água destilada, resultando a proporção de 9/1 de água e álcool respectivamente. Tendo a norbixina diluída e em solução, o produto foi mantido em armazenamento fechado em sistema refrigerado.

Como a norbixina apresenta caráter insolúvel em água, mesmo com as preparações anteriores, ela tem tendência a criar flocos se armazenada em solução aquosa por semanas. Foi realizado um teste toxicológico tanto com uma solução recém fabricada (Nbx1) quanto com a solução armazenada em sistema refrigerado até o surgimento dos primeiros flocos (Nbx2), para verificar que possíveis efeitos isso pode causar nos indivíduos do teste.

4.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

As nanopartículas de prata foram obtidas usando a metodologia de síntese inicialmente desenvolvida por Creighton, Blatchford e Albrecht (1979) em o AgNO_3 é reduzido utilizando-se do boro-hidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor. Esta é a síntese mais utilizada pela simplicidade e uniformidade das nanopartículas pela redução química do sal metálico, no caso o nitrato de prata (Melo Jr. *et al.*, 2012). Para essa síntese é gotejado uma solução de AgNO_3 na concentração molar $1,0 \times 10^{-1}$ mol/L⁻¹ na proporção de $\frac{1}{4}$ da solução final, como pode ser observado na Figura 6. Esse gotejamento é feito na solução de NaBH_4 a $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L que retêm a parte de $\frac{3}{4}$ do volume total da solução.

A solução de norbixina com AgNPs (NbxAgnp) foi preparada gotejando a solução de norbixina a 1×10^{-3} mol/L na solução de AgNPs logo após o término

da síntese na proporção de 45% solução de norbixina e 55% solução de AgNPs.

Figura 6 – Processo de síntese das nanopartículas de prata (AgNPs).



Fonte: De autoria própria.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICOQUÍMICA

4.3.1 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

O equipamento que realizou a análise no infravermelho foi o Fourier infrared Spectrophotometer IR Affinity-1, da marca Shimadzu, com resolução espectral de 8cm^{-1} e 45 varreduras. O preparo da amostra para a análise se deu com a formação de discos utilizando o Brometo de Potássio (KBr), que é o padrão de referência da técnica, com cerca de 1% do material utilizado. Para isso, o material que estava em estado líquido foi gotejado no pó do KBr e posto para secar a temperatura ambiente.

4.3.2 Caracterização por Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-visível (UV-Vis)

A análise por espectroscopia de absorção do UV-Vis foi realizada com o Equipamento “UV Spectrophotometer UV-1800” da SHIMADZU, utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, cuja varreduras ocorreram no intervalo de 250 a 800 nm. Esse tipo de espectroscopia foi utilizado para obter informações qualitativas, uma vez que os níveis de energia correspondem aos níveis de excitação eletrônica do material. O solvente escolhido para a análise no equipamento foi o hidróxido de potássio a 0,5%.

4.3.3 Caracterização por Difração de Raios-X (DRX)

Para a caracterização das amostras em DRX foi feito uma análise do pó da norbixina e depois, quando o material foi diluído, foi utilizado a técnica de gotejamento em lâminas de vidro para nova análise de DRX. O equipamento usado para a análise foi um difratômetro da Shimadzu® modelo XRD-6000, com um detector de radiação PIXcel/3D. A fonte de radiação de Cu-K α = 0,154nm, operando com uma voltagem de 40kV e com uma corrente de 30 mA. A velocidade adotada de varredura foi de 0,014°/min para valores de 2 θ entre 10° e 90° a uma taxa de 2°/min.

4.4 ENSAIO DE ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA EM *Artemia salina*

Na realização da análise do potencial de ação do larvicida material, foi inicialmente realizado um estudo ecotoxicológico exploratório em à *Artemia salina* conforme a padronização da NBR 16530 (ABNT, 2021). Foi realizado uma variedade de concentrações, para servir de base para as dosagens do teste posterior com as larvas de *Aedes*. Para garantir a confiabilidade do teste foi utilizado a presença de um grupo controle e cada concentração foi replicada 4 vezes.

Antes da realização do teste foi preparado água salina, utilizando o substrato “Ocean Tech, premium reef salt”. No preparo foram diluídos 30 gramas de sal do substrato em 1000 mL de água, em agitação. Utilizando o aparelho PH METER 1900, como controle de monitoramento o PH da solução

foi estabilizado 8,4, sendo o ideal para a sobrevivência da *Artemia salina*, segundo a norma.

Nesta solução, foram colocados os ovos de artêmia sob regime de luz fornecido por lâmpada fluorescente, a temperatura média de 28°C e com um sistema de oxigenação. Após 48 horas ocorreu a eclosão e crescimento inicial, momento em que elas foram cuidadosamente transferidas para os tubos de ensaio para realização do experimento.

Os testes foram conduzidos nas concentrações seriadas de 1.000µg/mL, 750µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL e 100µg/mL, para se delimitar a primeira zona de ação do substrato e com base nisso fazer uma nova diluição seriada dentro de um intervalo mais específico. Em todos os tubos de ensaio foram adicionados dimetilsulfóxido (DMSO) há 1% em 10mL de solução. O teste foi repetido nas concentrações de 250µg/mL, 200µg/mL, 150µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL.

A contagem do número de larvas vivas foi feita após 5 horas, 24 horas e 48 horas. Foram consideradas mortas as larvas que estavam no fundo do tubo e permaneciam imóveis após a agitação. Para determinar os valores da Concentração Letal para matar 50% dos indivíduos (CL₅₀) e Concentração Letal para matar 90% dos indivíduos (CL₉₀) foram calculados usando a linha de regressão de Probit. Desvio padrão das médias dos valores de concentração letal foram calculados e registrados em um formulário tendo como limite de confiança $p < 0,05$.

4.5 COLETA, CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE *Aedes aegypti*

4.5.1 Localização e Caracterização Geográfica

As ovitrampas foram posicionadas na zona sul da cidade de Teresina, uma Metrópole regional urbanizada e capital do estado do Piauí. Localizado na região Meio Norte, este domínio geoambiental é formado pelos Estados do Piauí e Maranhão em uma zona de transição dos domínios da caatinga, cerrados e Amazônia.

Para a decisão da localização das armadilhas de ovoposição foi levado em consideração que a espécie *Aedes aegypti* possui seu estilo de vida bem

integrado à habitação em regiões urbanas. Entretanto, a dinâmica da população humana foi bastante afetada em virtude da pandemia do Coronavírus, período no qual se passa a maior parte da pesquisa. Por isso, considerando as necessidades do vetor, foi proposto que teria maior eficácia colocar armadilhas na zona Periurbana da cidade, no quintal de residências de voluntários, o mais distante possível da residência principal, usando o método aplicado pela vilância sanitária.

4.5.2 Preparação das ovitrampas para coleta dos ovos

Como atrativo natural foi utilizado cevada fermentada na quantia de 10 mg, dispersa em 400mL de água filtrada para cada recipiente da armadilha de ovoposição, Figura 7. Palhetas de madeira foram utilizadas para servir como substrato para a deposição dos ovos pelas fêmeas. Foram instaladas 15 ovitrampas, inspecionadas diariamente durante 7 dias. Quando uma ovitrampa apresentava ovos, a mesma era removida e cuidadosamente armazenada, enquanto uma nova era colocada em seu lugar. Como os ovos precisam de 7 dias de contato contínuo com água para eclodir e os paletes com os ovos eram trocados diariamente, não houve risco de propagação do mosquito. Esse processo se repetiu durante a semana de monitoramento.

Figura 7 – Ovitampa em campo



Fonte: De autoria própria

4.5.3 Triagem de Mosquitos e Manutenção da Colônia

Os ovos recolhidos através das ovitrampas foram levados para o laboratório e colocados para eclosão em água limpa com a adição de pequenas quantidades de levedura, para servir de alimento durante os estágios larvais. Como condições climáticas, eles foram mantidos a temperatura ambiente cerca de 28°C (± 2 °C) e expostos a um fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas no escuro.

Ao atingirem a fase adulta foi realizado o processo de triagem, onde utilizou-se um capturador de alados para isolar e transferir os mosquitos um a um. A identificação das espécies foi feita no do Laboratório de Entomologia Médica (Labem), sediado na Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus CAXIAS. A característica do desenho de lira no mesonoto foi usada para diferenciar o *Aedes albopictus* do *Aedes aegypti*. Os indivíduos pertencentes a espécie *Aedes aegypti* foram transferidos para uma gaiola utilizando o capturador de alados, mostrado na Figura 8, para a formação da colônia, enquanto os outros foram exterminados para evitar a disseminação indevida da espécie.

Figura 8 – Processo de triagem de mosquitos



Fonte: De autoria própria

4.5.4 Ensaio Larvicida em *Aedes aegypti*

Para a realização do teste, essa colônia pura de *Aedes aegypti* reproduziu em laboratório, os ovos adquiridos foram separados e colocados para dar início a eclosão. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com leverdura e quando elas atingiram o 3° e 4° estágio do crescimento larval, estas foram separadas e cuidadosamente em um novo recipiente contendo água destilada, seguindo o protocolo estabelecido pela *World Health Organization* (2005) para testes toxicológicos em larvas de *Aedes aegypti*. Neste novo recipiente que possuía um grupo de *Aedes* no 3° e 4° estágio larval foi adicionado as soluções sintetizadas com atenção a concentração da massa molar final do produto em cada recipiente.

Foram testados 50mL da solução de NbxAgnps, foco principal da pesquisa; 25mL da solução contendo só AgNPs, onde a concentração é equivalente a amostra de NbxAgnps; 25 mL de solução de nitrato de prata, para verificar se há ocorrência de toxicidade para os organismos testados pela presença de prata; 50mL e solução de norbixina recém sintetizado (Nbx1), e 50mL de solução de norbixina floculada (Nbx2).

Todas as amostras tiveram acompanhamento de um grupo controle contendo somente água destilada e DMSO para certificar de que a mortalidade dos indivíduos não é causada pelas condições laboratoriais ou por possíveis complicações em estágios larvais anteriores. Cada recipiente continha 100mL de água destilada com 1% de DMSO, respeitando-se o limite de 100-200mL recomendados, com profundidade acima de 5cm e abaixo de 10cm, os volumes faltantes foram completados com água destilada. O teste prosseguiu com a realização em quadruplicada para cada um desses grupos e em cada recipiente foram utilizadas 25 larvas.

O motivo da escolha dessas diluições foi que realizando-se o preparo das sínteses na contração molar como previamente indicado e fazendo a diluição da amostra para colocar nos recipientes com os volumes sugeridos, a concentração em mols da norbixina é aproximadamente a mesma.

As larvas foram contadas depois de 24 e 48 horas. O delineamento estatístico usado foi inteiramente casualizado (DIC). A mortalidade das

mesmas foi determinada em porcentagem por meio da equação 1, definida por Abbott (1925), onde X é igual a porcentagem de sobreviventes no grupo não tratado e Y é igual a porcentagem de sobreviventes na amostra tratada.

Equação 1:

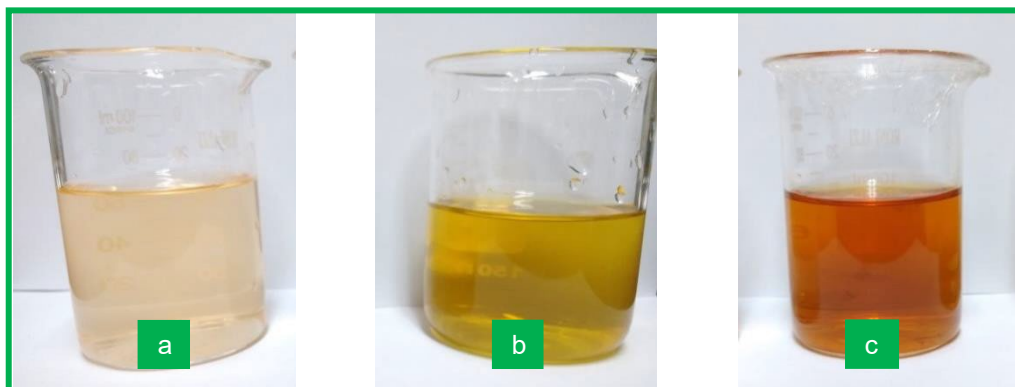
$$\text{Mortalidade(\%)} = \frac{X-Y}{X} 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONCLUSÃO DAS SÍNTESES

O processo de síntese da norbixina resultou em um pó com a coloração vermelho escuro e o método de diluição desse pó produziu uma solução homogênea de tom roseado, como mostra a Figura 9a. A síntese das nanopartículas de prata também foi exitosa produzindo uma solução de cor amarelo intenso, Figura 9b, característica desse tipo de nanopartículas. A união dessas duas soluções resultou em uma solução mais escura de cor vermelho-alaranjado (Figura 9c). Todas as soluções passaram por caracterização físico-químicas, nas etapas posteriores.

Figura 9 – Soluções fabricadas



a) Solução de norbixina; b) Nanopartículas de prata; c) Solução de norbixina com nanopartículas de prata. Fonte: De autoria própria

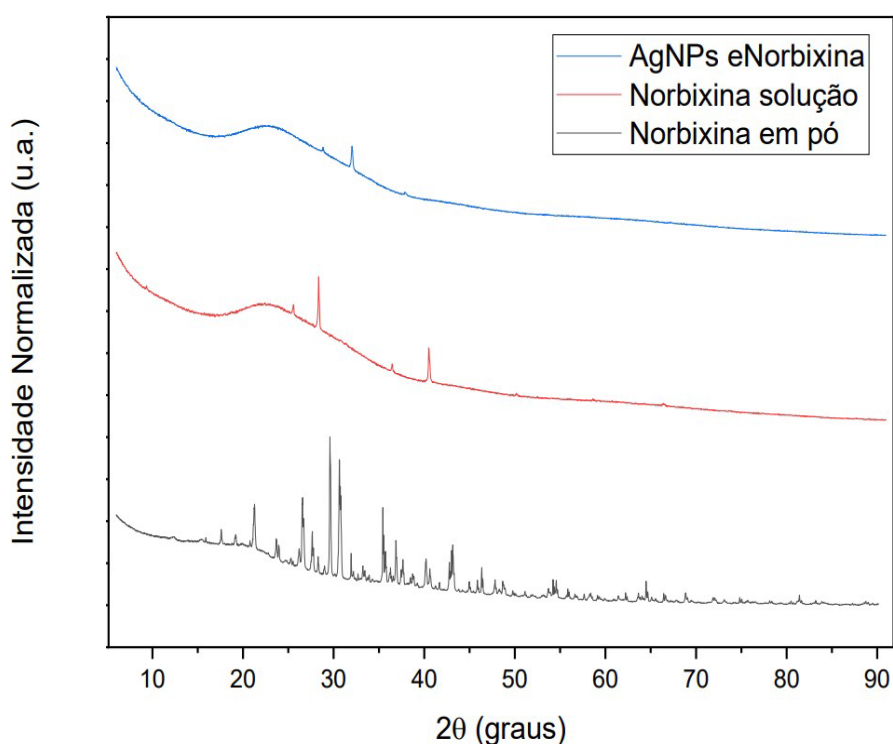
5.2 DADOS DA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X(DRX)

Após as amostras serem preparadas em laminas de vidro e levadas para o equipamento de DRX o Gráfico 1 é obtido apresentando o resultado da norbixina em pó e após a diluição, pela técnica de gotejamento e a solução de nanopartículas de prata com norbixina. No espectro da norbixina obtida em pó, o material se apresenta como semicristalino com uma curva característica da cadeia de carbono. O mesmo material pós diluição e secagem, perde sua

cristalinidade e o ruído da região amora é dominante, sendo conservado somente 4 picos que se encontram, em ordem de leitura da esquerda para a direita, em 25,56°; 28,35°; 36,46° e 40,51° do ângulo 2θ .

No difratograma de AgNPs/Norbixina, o pico mais proeminente de encontra no ângulo 32,03°. Nesta amostra ocorreu redução da intensidade dos picos da norbixina, bem como a presença de picos cristalográficos na região referente a prata. Isso evidencia a continuação da ocorrência de um efeito de mascaramento dos picos da norbixina pela as nanopartículas de prata, como foi observado no espectro do ultravioleta deste trabalho.

Gráfico 1 – Difratograma de Raios-X das Amostras



Fonte: Dados da pesquisa

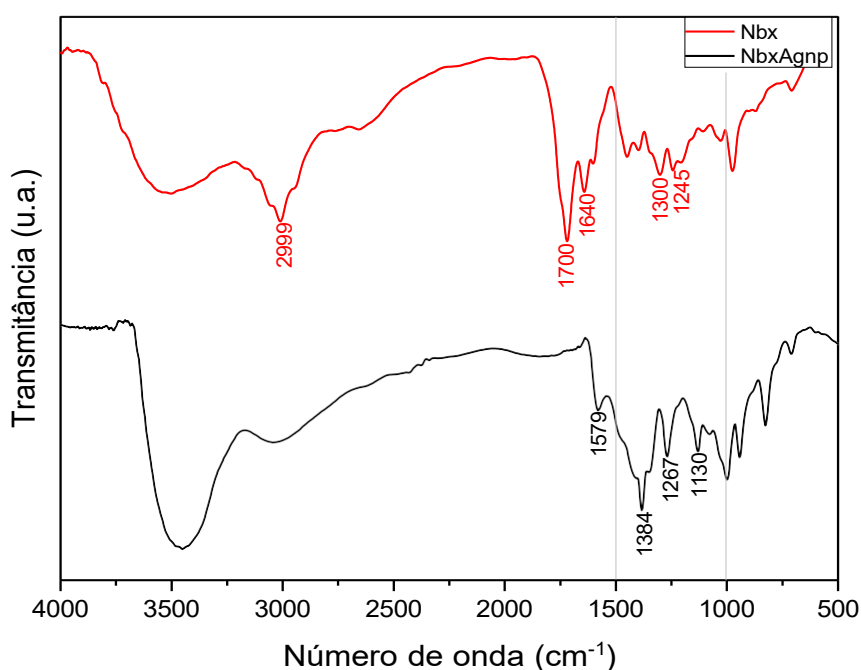
O difratograma da norbixina em pó está de acordo com o espectro obtido por Liu *et al.* (2022). O padrão da amostra de norbixina após a diluição, em vermelho, corrobora com o espectro de norbixina obtido por Perotti *et al.* (2020), o que sugere que eles também usaram a técnica de gotejamento em placa de petri para realizar a leitura no DRX. O espectro geral do difratograma

é similar ao Pilaquina *et al.* (2019) e aos Pavitra Bharathi *et al.* (2017) que obtiveram AgNPs com a estrutura cristalográfica de célula cúbica para prata.

5.3 DADOS DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FURRIER (FT-IR)

O espectrograma gerado pelo infravermelho pode ser observado no Gráfico 2. Para a norbixina temos um pico bem marcado em 1700 cm^{-1} característico do grupamento C=O do ácido carboxílico, pertencente ao grupo funcional da norbixina. Um grande alargamento de banda pode ser visto acima de 2500 cm^{-1} , provavelmente devido aos grupos O-H e C-H em sobreposição. Ainda pode ser visto um claro estiramento em 2999 cm^{-1} , que é característico do estiramento assimétrico CH_3 .

Gráfico 2 – Infravermelho das amostras



Fonte: Dados da pesquisa.

Em ácidos carboxílicos o estiramento C-O ocorre dentro da faixa de 1210 cm^{-1} a 1320 cm^{-1} e no espectro pode ser visto dois picos nessa região, um em 1300 cm^{-1} e o segundo em 1245 cm^{-1} , que ocorre devido a norbixina ter

dois desse grupo funcional, ou seja é um ácido dicarboxílico. O pico em 1640 cm^{-1} ocorre na região característica do grupamento $\text{C}=\text{C}$.

No espectro NbxAgnp está presente o estiramento 1384 cm^{-1} referente ao dobramento do grupo C-H . Também pode ser encontrado dois picos de intensidade média do C-O ligeiramente afastados, quando comparados com espectro da norbixina pura, nas regiões. Um pico pode ser visto em 1579 cm^{-1} dentro da zona de estiramento do grupo $\text{C}=\text{C}$. Essas diferenças podem ter ocorrido devido a presença das nanopartículas de prata, mas um estudo aprofundado sobre a afinidade dos elétrons e das interferências da ressonância de plasmôns em amostras de ácido carboxílico é necessário.

A norbixina pode ser facilmente diferenciada da bixina no espectro do infravermelho pela presença das bandas características do ácido carboxílico. Os dados do espectro de norbixina obteve valores próximos aos registrados por Rahmalia e Naselia (2021) onde para o agrupamento C-COOH observou-se o aparecimento de uma banda na região entre $1271\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$. Uma banda larga é vista na região em 3421 cm^{-1} e indica a presença do grupo OH e isso é confirmado pelo pico em 1620 cm^{-1} , em 1718 cm^{-1} aparece a banda do $\text{C}=\text{O}$ característico do grupo carboxílico.

O espectro possui pontos similares ao de Perotti *et al.* (2020), que declara “o espectro infravermelho da norbixina é dependente da geometria dos isômeros da amostra e das condições de precipitação do substrato”. As principais bandas são 1558 cm^{-1} ; 1382 cm^{-1} que foi associada ao dobramento dos grupos C-H e CH_3 ao longo do esqueleto principal e entre $1271\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$.

5.4 DADOS DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA (UV-VIS)

5.4.1 Absorbância no Ultravioleta (UV-Vis) da norbixina

O espectro de absorbância da norbixina pode ser visualizado no Gráfico 3. O gráfico exibido foi escolhido dentro uma série de diluições, a partir da solução estoque de $0,0019\text{ g}$ de norbixina extraída, diluída totalmente de 50 mL de solução de KOH a $0,5\%$. Sendo selecionado o espectro cujos principais picos de Absorbância (abs) estavam dentro dos limites de no máximo $1,1\text{ abs}$ e no mínimo $0,8\text{ abs}$ para maior precisão da análise quantitativa.

Dentro desses parâmetros o que mostrou o melhor resultado foi a concentração de $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}^{-1}$ da norbixina onde o pico de maior energia apareceu no comprimento de onda de 482 nm com a absorvidade de 0,899 e o que teve maior absorção aparece no comprimento de onda de 453 nm com absorvidade de 1,05.

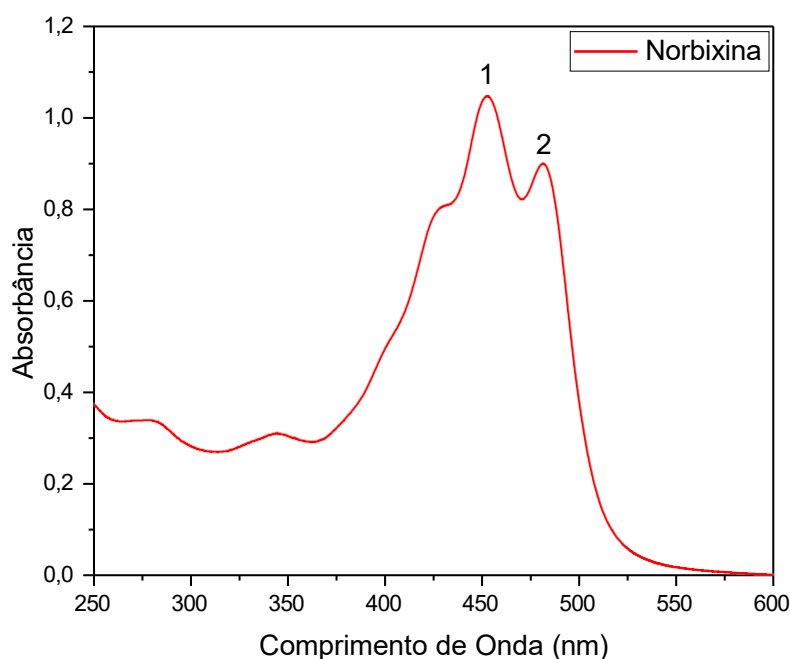
Utilizando a lei de Lambert-Beer foi calculado a absorvidade molar usando a equação 2:

Equação 2:

$$e = A/bc$$

Onde “e” é a absorvidade molar; “A” é absorbância mensurada pelo equipamento; “b” é o caminho da cubeta; “c” é a concentração em mols. Realizando o cálculo utilizando o pico de maior energia (481 nm), obteve-se a absorvidade molar em aproximadamente $15008 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Gráfico 3 – Espectro UV-Vis da norbixina



Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo a FAO, quando a norbixina se encontra em uma solução de hidróxido de potássio a 0,5% mostra a absorbância máxima nas regiões de 453 nm e 482 nm, esses valores estão em acordo com o obtido na análise. Entretanto a absorbância específica relatada por eles e por Silva, M. *et al.* (2018), cerca de 5 vezes menor a obtida no UV-Vis.

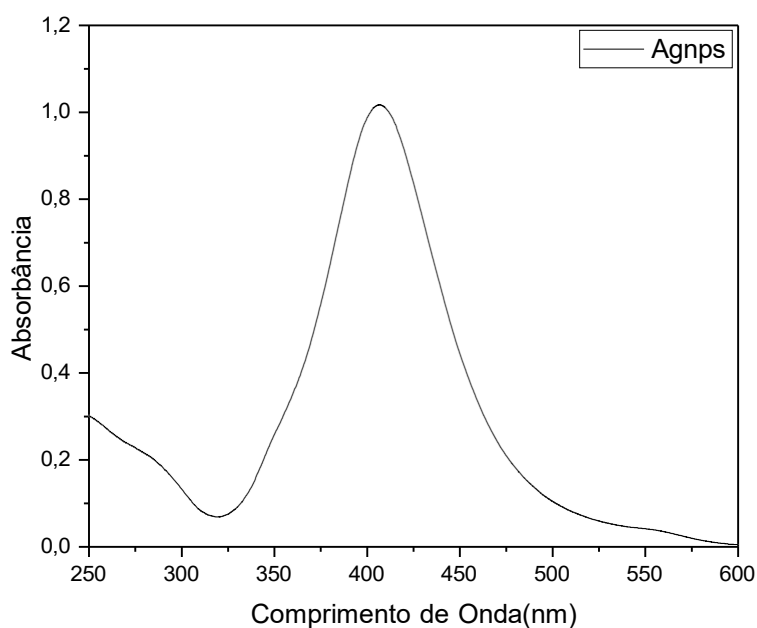
Além disso é observado picos em comprimentos de onda menores, entre 345 nm e 382 nm. Segundo Santos *et al.* (2014) isto é relacionado às transições do nível vibracional mais baixo do estado eletrônico excitado da molécula do carotenoide. Scotter *et al.* (1994) os associa diretamente ao isômero 9'-cis-norbixina.

Outro elemento que pode influenciar nos resultados é que é possível durante a síntese ser produzido mais de um isômero de norbixina, o que pode gerar leve deslocamento na posição dos picos sem grandes interferências na estrutura geral do gráfico (Perotti *et al.*, 2020).

5.4.2 Absorbância no Ultravioleta (UV-Vis) da Nanopartícula de prata (AgNPs)

Usando água deionizada como solvente na preparação da amostra, obteve-se a absorbância máxima no Comprimento de Onda em 406 nm, como mostrado no Gráfico 4. A região da absorbância de nanopartículas metálicas está relacionada ao tipo de metal da qual ela feita e o tamanho da partícula (Creighton; Eadon, 1991; Paramelle *et al.*, 2014), partículas menores absorvem em comprimentos de onda menores. O formato também pode influenciar (González *et al.*, 2014). Segundo Baset *et al.* (2011) a absorbância próxima de 405 nm em água deionizada indica nanopartículas de um tamanho médio de 6 nm a 6,5 nm.

Gráfico 4 – Espectro UV-Vis das nanopartículas de prata



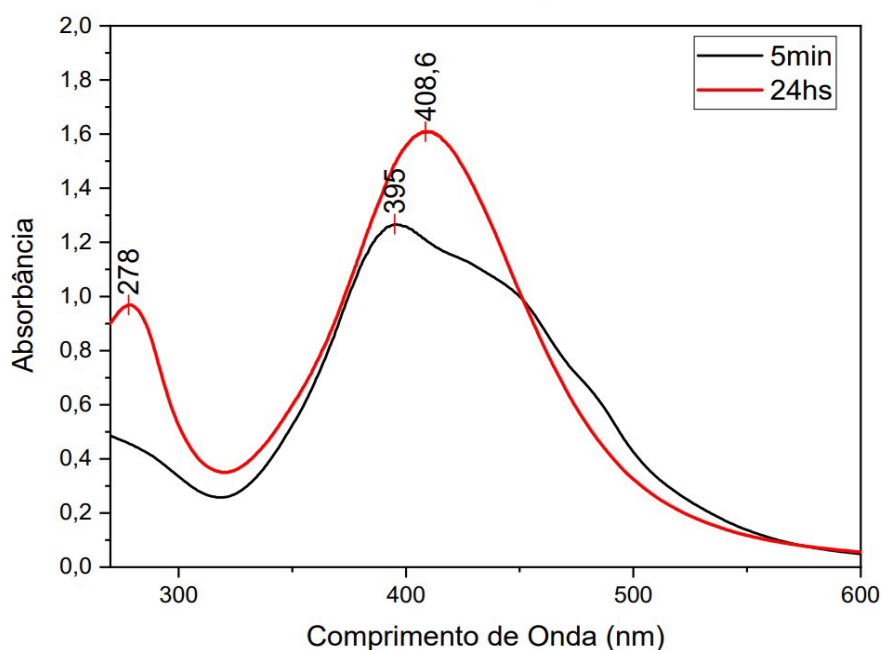
Fonte: Dados da Pesquisa

A interação entre as nanopartículas metálicas e a luz está relacionada com a ressonância plasmônica. Para a formação de um plasmão ocorre a separação de cargas elétricas na partícula em função da oscilação coletiva dos elétrons (da Silva *et al.*, 2019). Ao incidir uma radiação eletromagnética, como a luz ultravioleta, com a mesma frequência que a dos plasmões tem-se a ressonância plasmônica (Creighton, 1982). Esta, por sua vez, produz intensas oscilações eletrônicas na partícula que serão responsáveis pela absorção ou espalhamento da radiação (Da Silva *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016; Zimbone *et al.*, 2011).

5.4.3 Absorbância no Ultravioleta (UV-Vis) da AgNPs com Norbixina

Quando a norbixina e as AgNPs são colocadas em conjunto, os 3 picos principais referente a norbixina somem e observa-se somente o pico da prata, que sofreu um alargamento da base. No Gráfico 5 está como ficou o espectro do material logo após a mistura (5 min) e após 24 horas em repouso.

Gráfico 5 – Norbixina + AgNPs



Fonte: Dados da Pesquisa

É perceptível que em um primeiro momento os picos referentes a norbixina ainda são observáveis. Sendo possível que com o tempo, a inclinação aniônica da molécula de norbixina e a catiônica das nanopartículas de prata encontrem um posicionamento mais estável na solução gerando uma ligação superficial por afinidade eletrônica, onde as AgNPs se dispõem ao redor da cadeia da norbixina.

5.5 ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO

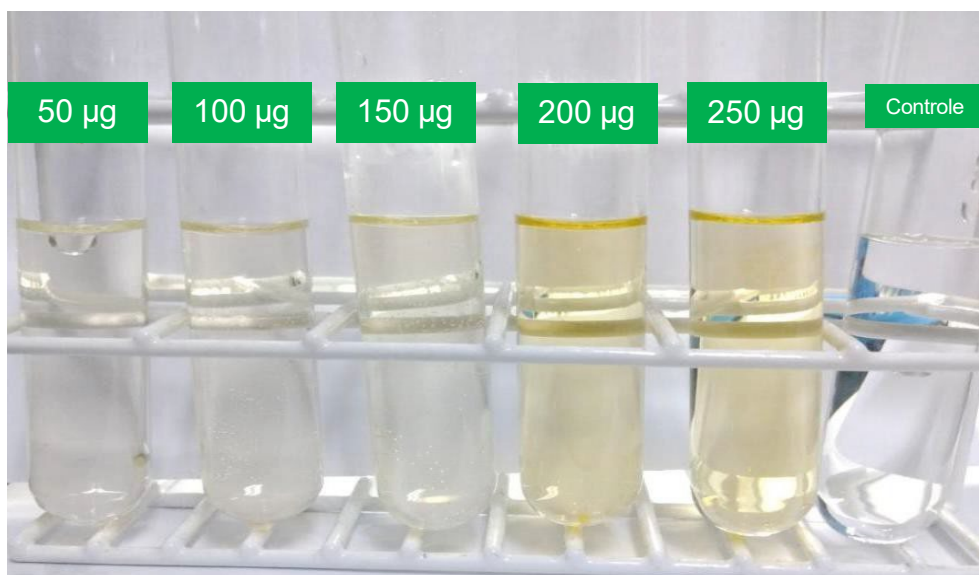
5.5.1 Ensaio em *Artemia salina*

Após 5 horas de exposição a norbixina, houve nas *Artemias salinas* morte total nas concentração de 250 µg/mL e acima (500 µg/mL, 750 µg/mL, 1.000 µg/mL). A menor concentração, de 100 µg/mL, não apresentou mortes. O grupo controle negativo, não apresentou mortalidade.

O segundo teste foi realizado em 24 horas nas concentrações de 250 µg /mL, 200 µg /mL, 150 µg /mL, 100 µg /mL, 50 µg /mL na Figura 10, é exibido as diluições preparadas para o teste e os resultados são exibidos no Gráfico 6. O resultado evidência que a CL₅₀ para a norbixina em microrganismos como a

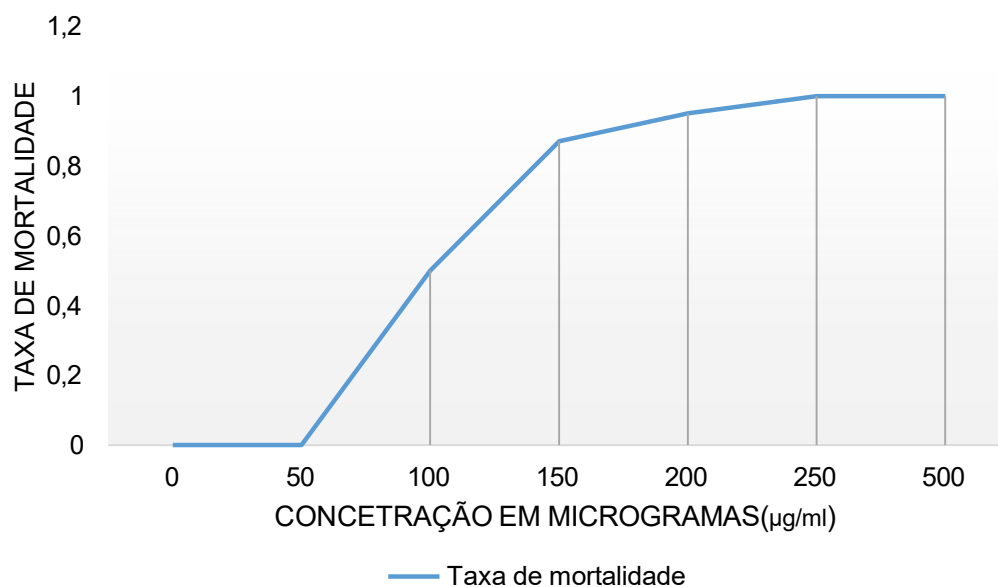
Artemia salina se encontra próximo a concentração de 100 µg/mL, e a CL₉₀ está em 150 µg/mL taxa de erro de $\pm 0,036$.

Figura 10 – Variação da concentração de norbixina



Fonte: Dados da pesquisa

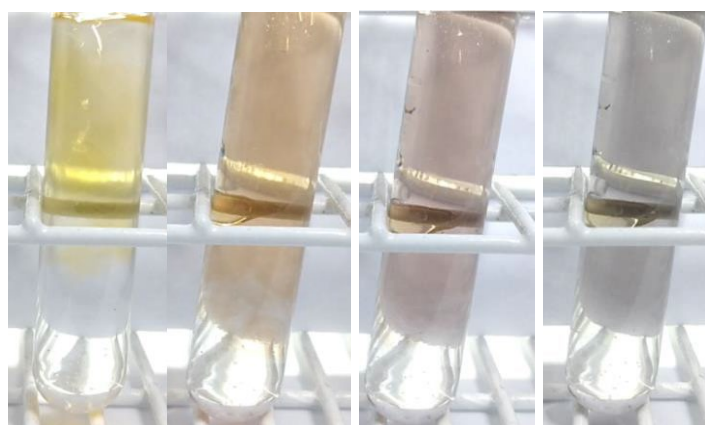
Gráfico 6 – Concentração Letal (CL) da norbixina em 24 horas



Fonte: Dados da pesquisa

Os testes toxicológicos com nanopartículas de prata *Artemia salina* mostrou-se inviável devido a ocorrência de reações químicas em cadeia logo após o contato com a água salgada. A reação é imediata e é mostrado na Figura 11, processos da visíveis da reação que ocorre no intervalo de 1,0 segundo. A solução tende a torna-se transparente com formação de precipitado, conforme a prata sai do tamanho nano e se aglomera com outros íons de prata. As *Artemias* não foram afetadas durante as 72 horas de observação.

Figura 11 – Degradação das nanopartículas de prata em água salina durante o contato



Fonte: Dados da pesquisa

Neste trabalho para o teste para norbixina foi encontrado CL_{50} de 100 mL e CL_{90} de ± 175 mL. Em comparação, o resultado mais próximo encontrado em literatura é de Vilar *et al.* (2015) que encontrou para bixina o valores de CL_{50} $353,64 \pm 67,54$ $\mu\text{L/mL}$ e para a fração oleosa do extrato das sementes de *Bixa orellana* um valor de $285,41 \pm 35,81$ $\mu\text{g/mL}$. Todos para concentração letal em 24 horas após a plicação.

De acordo com Meyer *et al.* (1982) e Martínez (2006) para a escala de toxicidade usando náuplios de *Artemia salina* considera-se que valores de CL_{50} acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ o extrato é considerado atóxico; entre 1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$ o extrato é um extrato ativo de baixa toxicidade; entre 500 e 200 $\mu\text{g/mL}$ a toxicidade é moderada; entre 200 e 5 mg/mL é um composto tóxico e CL_{50} abaixo de 5 $\mu\text{g/mL}$ é extremamente tóxico.

Segundo Kumar (2012), as AgNPs formadas pela biosíntese de extratos de *Sargassum ilicifolium*, têm um CL₅₀ de 1.08mg/L. Para AgNPs encapsulada concentrações acima de 2 nanomols começavam a se acumular na região do intestino e acima de 12 nanomol as nanopartículas de prata induziam a apoptose (Arulvasu, 2014). As AgNPs formadas pela biossíntese de extratos da *Turbinaria conoides* atingiram CL₅₀ = 89 ± 5 µL/mL (Vijayan *et al.*, 2014).

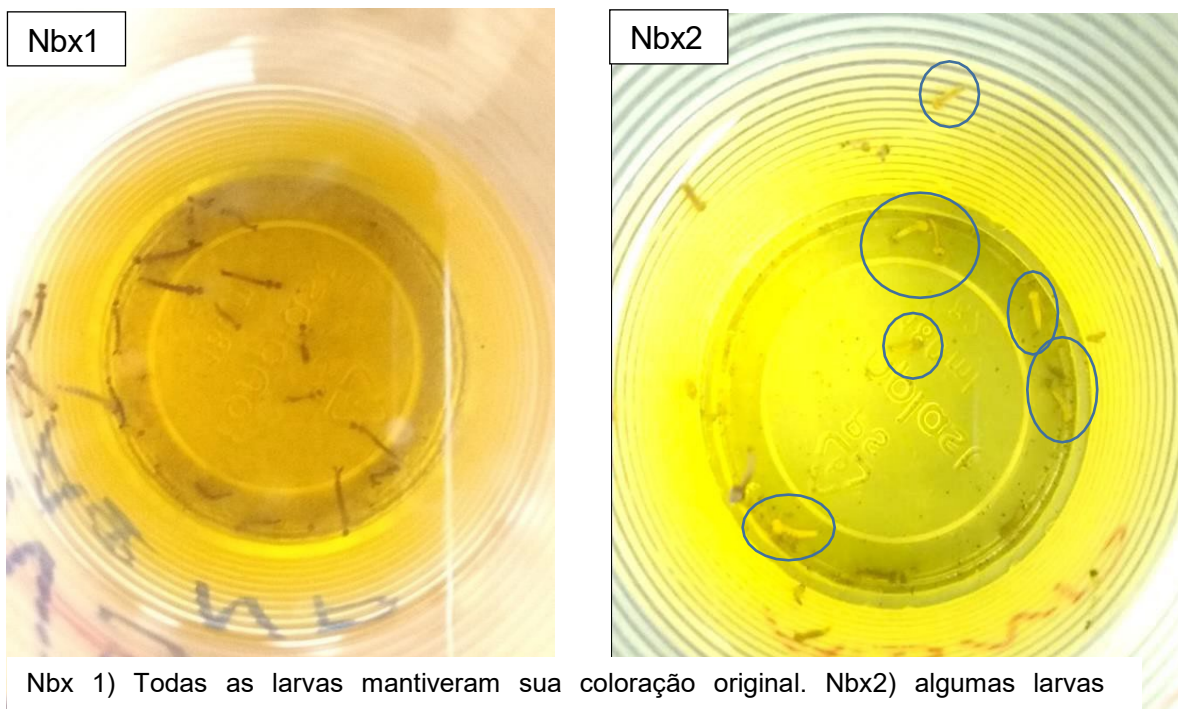
5.5.2 Ensaio em *Aedes aegypti*

Somente as soluções Nbx1 (Solução nova) e Nbx2 (Solução floculada) apresentaram algum efeito contra as larvas de *Aedes aegypti*. Não houve mortalidade observada nos recipientes de Nitrato de Prata, Nanopartículas de Prata ou no de Nanopartículas de Prata com Norbixina, durante o período de observação de 48 horas.

Usando a equação de Abbott temos que a solução Nbx1 causou mortalidade de 5% em 24 horas e 14% em 48 horas. Enquanto a solução de Nbx2 provocou 29% de mortalidade em 24 horas e 38% depois de 48 horas. Prolongando-se o período de observação para uma semana o máximo de mortalidade para Nbx1 foi de 21% e para Nbx2 foi de 65%.

A principal diferença entre essas soluções é que na Nbx2 parte da norbixina estava floculada. As consequências disso foram observáveis a olho nu, pois os flocos aderiram a superfície do exoesqueleto larval, de tal forma que independente da movimentação causada pelo nado, os flocos continuaram aderidos a superfície e ocorreu branqueamento da larva, como pode ser visto na Figura 12. Como houve um branqueamento larval sugere-se que tenha ocorrido uma modificação no exoesqueleto, podendo ser despigmentação possivelmente ou desintegração da exocutícula.

Figura 12 – Ensaio larvicida com as soluções Nbx1 e Nbx2.



Nbx 1) Todas as larvas mantiveram sua coloração original. Nbx2) algumas larvas apresentaram branqueamento. Fonte: Dados da pesquisa

Alterações morfológicas como despigmentação, desintegração da endo e exocutícula, necroses, perdas das cerdas da cabeça, cauda e da antena, não foram observadas nas larvas, quando em contato com a solução de AgNPs, o mesmo para a solução de nanopartículas com norbixina.

Essa reatividade da norbixina nos microrganismos de testes selecionados e a não ocorrência de atividade tóxica do material em mamíferos (Beni *et al.*, 2020, Hagiwara *et al.*, 2003), provavelmente se deve a capacidade da mesma de ajudar na redução de agregados lipídicos no corpo (Fontaine *et al.*, 2020, Somacal *et al.* 2022). Como o micro crustáceo *Artemia salina* têm como característica filogenética a ausência de carapaça (Timms, 2012), eles são mais susceptíveis ao ataque da norbixina que circunda o meio. As larvas de *Aedes aegypti* possuem um revestimento quitinoso, o que pode lhe conferir certa proteção a ação oxidante da norbixina. A norbixina floculada teve maior facilidade de se acumular na região externa do exoesqueleto larval, aumentando a superfície de contato da substância com o animal, o que deve ter facilitado esse processo.

A avaliação da toxicidade das AgNPs em comparação com íons de Ag^+ também foi feita por Sambale *et al.* (2015) investigou o efeito da toxicidade em 4 diferentes linhagens de células de mamíferos comparando-os nas mesmas

concentrações de átomos que as nanopartículas e as nanopartículas demonstraram serem mais tóxicas do que os íons de Ag^+ . Os mecanismos de ação nas células parecem ser diferentes, pois as células cultivadas na presença de AgNPs sofreram apoptose e as células cultivadas na presença dos íons morreram por necrose.

Samberg *et al.* (2014) avaliou a biocompatibilidade e a atividade bactericida de nanopartículas de prata incorporada no copolímero poly(l-lactide-co-epsilon-caprolactone) que pode ser usado como revestimento tecidual, nestas condições só houve diminuição substancial da viabilidade celular para concentrações de Ag de 1,0 mg por grama do material. Também foi realizada uma simulação da degradação dos scaffolds utilizando enzimas para realizar a liberação prolongada de Ag, onde é visto que pelo menos 0,5 mg de Ag precisa ser liberado para inibir tanto o crescimento de bactérias gram-negativas quanto de bactérias gram-positivas.

A toxicidade das nanopartículas de prata em diferentes estágios do crescimento larval foi investigada por Telma *et al.* (2021), apresentando uma sutil variação entre o 3° e 4° estágio. O CL_{90} foi de 63,31 ppm, para o 3° estágio foi de 61,41 ppm, para o 4° estágio foi de 73,76 ppm e para a pulpa foram necessários 65,45 ppm. Gopu *et al.* (2021) usou o extrato da água marina *Amphiroa rígida* para sintetizar nanopartículas de prata. A mortalidade máxima para larvas do 3 estágio ocorreu em 20 $\mu\text{g/mL}$ e a concentração para o 4 estágio larval foi em 40 $\mu\text{g/mL}$.

Ocasionalmente o efeito sinérgico do extrato usado junto com as nanopartículas produz efeitos muito fortes, como o caso de Pilanquina *et al.* (2019) que sintetizou AgNPs usando o extrato aquoso de *S. mammosum* que resultou no CL_{50} de 0,06 ppm e CL_{90} de 0,08 ppm que é uma toxicidade mais de 20.000 vezes superior ao extrato puro, caso diferente do observado neste experimento.

6 CONCLUSÃO

A solução de nobixina têm mais eficácia como larvicida de *Aedes aegypti* quando utilizada sozinha. A extração da nobixina foi exitosa e a caracterização molecular feita pelo UV-Vis e FT-IR comprova isto. Como pode ser observado principalmente pela caracterização do UV-Vis e DRX a solução de nanopartículas de prata e a solução de nobixina entram em equilíbrio após a passagem do tempo e suas ressonâncias se sobrepõe. A solução de nobixina unida a solução de nanopartículas de prata não apresenta efeito tóxico em larvas de *Aedes* nos 3° e 4° estágio.

Este estudo abre portas para novos ramos de pesquisa pois o uso do carotenoide nobixina e seu isômeros no combate as larvas de *Aedes aegypti* não tinha sido explorado anteriormente. Além disso a possível rota de degradação mútua do carotenoide com as nanopartículas de prata, algo que pode gerar método de controle e degradação de nanopartículas metálicas.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16530**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia* sp. (Crustacea, Brachiopoda). ABNT, Rio de Janeiro. 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15308**: Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda-Método de ensaio com misidáceos (Crustacea). 2011.

ALEHOSSEINI, Ali *et al.* Characterization of norbixin and evaluation of its mobility through rennet-induced micellar casein concentrate gels as influenced by an electrical field. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 74, p. 102812, 2021.

ALHARBI, Naiyf S. *et al.* Nanosilver crystals capped with *Bauhinia acuminata* phytochemicals as new antimicrobials and mosquito larvicides. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 146-153, 2018.

ARULVASU, Chinnasamy *et al.* Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *Artemia*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

ALSHEHRI, Mohammed Ali *et al.* Phytochemical analysis of *Rhazya stricta* extract and its use in fabrication of silver nanoparticles effective against mosquito vectors and microbial pathogens. **Science of the Total Environment**, v. 700, p. 134443, 2020.

AZIZ, Al Thabiani. Toxicity of *Ulva lactuca* and green fabricated silver nanoparticles against mosquito vectors and their impact on the genomic DNA of the dengue vector *Aedes aegypti*. **IET Nanobiotechnology**, v. 16, n. 4, p. 145-157, 2022.

BASET, Somaye *et al.* Size measurement of metal and semiconductor nanoparticles via uv-vis absorption spectra. **Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)**, v. 6, n. 2, 2011.

BENEDITO, Aline; SILVA, Fabiana; SANTOS, Ísis. Nanopartículas de prata: aplicações e impacto ambiental. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 16, p. 4-5, 2017.

BENELLI, Giovanni. Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles as an emerging tool against mosquitoes of medical and veterinary importance: a review. **Parasitology research**, v. 115, n. 1, p. 23-34, 2016.

BENELLI, Giovanni *et al.* Biophysical characterization of Acacia caesia-fabricated silver nanoparticles: effectiveness on mosquito vectors of public health relevance and impact on non-target aquatic biocontrol agents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 10228-10242, 2018.

BENI, Anissa Algara *et al.* Dietary supplementation with annatto food-coloring extracts increases the resistance of human erythrocytes to hemolysis. **Nutrition Research**, v. 76, p. 71-81, 2020.

BOYER, Sebastien *et al.* Monitoring insecticide resistance of adult and larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Phnom Penh, Cambodia. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52, 2021. **Boletim Epidemiológico.**, v. 51, n. 2, p. 1-16, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 51, 2021. **Boletim Epidemiológico.**, v. 52, n. 48, p. 1-17, 2021.

CAMELO, Serge *et al.* Beyond AREDS formulations, what is next for intermediate age-related macular degeneration (iAMD) treatment? Potential benefits of antioxidant and anti-inflammatory apocarotenoids as

neuroprotectors. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

CARNEIRO, Laís *et al.* Brazilian pesticides law could poison the world. **Science**, v. 376, n. 6591, p. 362-362, 2022.

CAVALCANTE, Luis Carlos Duarte *et al.* Estudo de pigmento em osso humano do sítio Morro dos Ossos, Piauí. **Mneme-Revista de Humanidades**, v. 7, n. 18, 2005.

CHEN, Xiao; SCHLUESENER, Hermann J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. **Toxicology letters**, v. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.

CREIGHTON, J. Alan. Metal colloids. In: **Surface enhanced Raman scattering**. Boston, MA: Springer US, 1982. p. 315-337.

CREIGHTON, J. Alan; BLATCHFORD, Christopher G.; ALBRECHT, M. Grant. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v. 75, p. 790-798, 1979.

CREIGHTON, J. Alan; EADON, Desmond G. Ultraviolet–visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 87, n. 24, p. 3881-3891, 1991.

CRISPIM, Josiel da Silva. Estudo computacional das propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas da bixina, isobixina, norbixina e isonorbixina via DFT. 2019.

CONSOLI, Rotraut A.; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

SILVA, Edison Z. *et al.* Connecting theory with experiment to understand the sintering processes of Ag nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 17, p. 11310-11318, 2019.

CASTRO, C. B. *et al.* **A cultura do urucum**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009., 2009.

DEMCZUK JR, Bogdan; RIBANI, Rosemary Hoffmann. Atualidades sobre a química e a utilização do urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos** v. 6, n. 1, p. 37-50, 2014.

Organização Pan-Americana da Saúde. **Dengue - OPAS/OMS**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>>. Acesso em: 6 set. 2023.

DIRETIVA 95/45/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 26 de julho de 1995. Diário Oficial das comunidades Europeias, p. 1, L226 de 22.9.1995.

DURÁN, Nelson *et al.* Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v. 42, p. 206-213, 2019.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS). The safety of annatto extracts (E 160b) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 14, n. 8, p. e04544, 2016.

EFSA PANEL ON ADDITIVES AND PRODUCTS OR SUBSTANCES USED IN ANIMAL FEED (FEEDAP) *et al.* Safety and efficacy of cis-norbixin di-potassium salt (annatto F) for cats and dogs. **EFSA Journal**, v. 15, n. 4, p. e04764, 2017.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND FLAVOURINGS (EFSA FAF PANEL) *et al.* Safety of annatto E and the exposure to the annatto colouring principles bixin and norbixin (E 160b) when used as a food additive. **EFSA Journal**, v. 17, n. 3, p. e05626, 2019.

ETTI, C. Ueber das Bixin. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 11, n. 1, p. 864-870, 1878.

FONTAINE, Valérie *et al.* Systemic administration of the di-apocarotenoid norbixin (BIO201) is neuroprotective, preserves photoreceptor function and inhibits A2E and lipofuscin accumulation in animal models of age-related macular degeneration and Stargardt disease. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 7, p. 6151, 2020.

FONTAINE, Valérie *et al.* Anti-Inflammatory Effects and Photo-and Neuro-Protective Properties of BIO203, a New Amide Conjugate of Norbixin, in Development for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration (AMD). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5296, 2023.

FONSECA, Aluísio Marques da *et al.* Synthesis, biological activity, and in silico study of bioesters derived from bixin by the CALB enzyme. **Biointerface Res Appl Chem**, v. 12, n. 5, p. 5901-5917, 2022.

FOOD STANDARDS AGENCY. **Approved additives and E numbers**. Disponível em: <<https://www.food.gov.uk/business-guidance/approved-additives-and-e-numbers>>.

FOUAD, Hatem *et al.* Controlling Aedes albopictus and Culex pipiens pallens using silver nanoparticles synthesized from aqueous extract of Cassia fistula fruit pulp and its mode of action. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 558-567, 2018.

Fundação Osvaldo Cruz (Brasil). Informativos para compartilhamento nas redes sociais: informações gerais. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2022. Disponível em: <<https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/index.html>>. Acesso em maio de 2022.

GAN, Soon Jian *et al.* Dengue fever and insecticide resistance in Aedes mosquitoes in Southeast Asia: a review. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-19, 2021.

GANIE, Shahid Yousuf *et al.* Mechanisms and treatment strategies of organophosphate pesticide induced neurotoxicity in humans: A critical appraisal. **Toxicology**, v. 472, p. 153181, 2022.

GIORGI, Annamaria *et al.* Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repellent activity of Bixa orellana from Brazilian Amazon region. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013.

GIULIANO, Giovanni; ROSATI, Carlo; BRAMLEY, Peter M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 513-516, 2003.

GONZÁLEZ, A. L. *et al.* Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 17, p. 9128-9136, 2014.

GOPU, Mani *et al.* Green biomimetic silver nanoparticles utilizing the red algae *Amphiroa rigida* and its potent antibacterial, cytotoxicity and larvicidal efficiency. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 217-223, 2021.

HAGIWARA, A. *et al.* A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague–Dawley rats. **Food and chemical toxicology**, v. 41, n. 8, p. 1157-1164, 2003.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING. **Compendium of Food Additive Specifications: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: 67th Meeting 2006**. Food & Agriculture Org., 2006.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Seventy-Seventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. World Health Organization, 2013.

KIM, Dahye *et al.* Bromoacetate Olefination Protocol for Norbixin and Julia–gonçalvescinski Olefination for Its Ester Syntheses. **ACS omega**, v. 4, n. 6, p. 10019-10024, 2019.

KUMAR, Dinesh *et al.* Biocontrol of mosquito vectors through herbal-derived silver nanoparticles: prospects and challenges. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 25987-26024, 2020.

LIU, Hang *et al.* Utilization of protein nanoparticles to improve the dispersibility, stability, and functionality of a natural pigment: Norbixin. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107329, 2022.

FILHO, Antônio Luiz Martins Maia *et al.* Ação cicatrizante da nanopartícula de prata com norbixina em queimaduras. **ConScientiae Saúde**, v. 16, n. 2, p. 241-248, 2017.

MANIMEGALAI, Thulasiraman *et al.* Green synthesis of silver nanoparticle using *Leonotis nepetifolia* and their toxicity against vector mosquitoes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and agricultural pests of *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 43103-43116, 2020.

MCKEOWN, G. G. Paper chromatography of bixin and related compounds. **Journal of Association of Official Agricultural Chemists**, v. 44, n. 2, p. 347-351, 1961. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/44/2/347/5731115?redirectedFrom=fulltext>>

MELO Jr, Maurício Alves *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química nova**, v. 35, p. 1872-1878, 2012.

MEKONEN, Seblework *et al.* Exposure of infants to organochlorine pesticides from breast milk consumption in southwestern Ethiopia. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 22053, 2021.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MONTANHA, Gisele de Oliveira; BARBOZA, José Joaci; DE OLIVEIRA, Anátalia Daiane. Puruborá: mitos de um povo indígena ressurgido da Amazônia. **Tellus**, p. 151-174, 2014.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
"PubChem Compound Summary for CID 5281249,

Norbixin" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Norbixin>.

Último acesso: 6 agosto, 2023.

NICOLETE, Vanessa C. *et al.* Interacting epidemics in Amazonian Brazil: prior dengue infection associated with increased coronavirus disease 2019 (COVID-19) risk in a population-based cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 11, p. 2045-2054, 2021.

NOWACK, Bernd; KRUG, Harald F.; HEIGHT, Murray. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. 2011.

NYANTAKYI, Jackson Adiyiah *et al.* Seasonal changes in pesticide residues in water and sediments from River Tano, Ghana. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2022, 2022.

PAHO PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. PLISA Health Information Platform for the Americas: Dengue cases. Washington, D.C. 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/data/index.php/en/mnutopics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>. > (Acesso em: 15 maio 2023).

PANDIAN, S. R. K. *et al.* Mechanism of bactericidal activity of Silver Nitrate-a concentration dependent bi-functional molecule. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 805-809, 2010.

PARAMELLE, David *et al.* A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. **Analyst**, v. 139, n. 19, p. 4855-4861, 2014.

PAVITHRA BHARATHI, V. *et al.* Ipomoea batatas (Convolvulaceae)-mediated synthesis of silver nanoparticles for controlling mosquito vectors of Aedes albopictus, Anopheles stephensi, and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae). **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 45, n. 8, p. 1568-1580, 2017.

PEROTTI, Gustavo F. *et al.* Intercalation of apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) into layered double hydroxides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 2211-2223, 2020.

PERYASSU, Antonio Goncalves. **Os culicídeos do Brasil**. Typographia Leuzinger, 1908.

PILAQUINGA, Fernanda *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Solanum mammosum* L.(Solanaceae) fruit extract and their larvicidal activity against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0224109, 2019.

PIMENTEL, F. A. **Avaliação de métodos de obtenção e da estabilidade de pigmentos de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Universidade Federal de Vicosa, 1995.

RAJPUT, Shubhra; KUMAR, Dinesh; AGRAWAL, Veena. Green synthesis of silver nanoparticles using Indian Belladonna extract and their potential antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and larvicidal activities. **Plant cell reports**, v. 39, p. 921-939, 2020.

RAHMALIA, W.; NASELIA, U. A. Transition energy, spectral fine structure, and absorption coefficient of norbixin (9'-cis-6, 6'-diapocarotene-6, 6'dioic acid) in different polar solvents. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2021. p. 012085.

RAI, Mahendra; YADAV, Alka; GADE, Aniket. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.

_____. Resolução nº 382, de 5 de agosto de 1999. Art. 1º, Aprovar o "Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 13 - molhos e condimentos", constante do Anexo desta Resolução. Diário oficial [da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/res0382_05_08_1999.html>

SAMBALE, Franziska *et al.* Investigations of the toxic effect of silver nanoparticles on mammalian cell lines. **Journal of Nanomaterials**, v. 16, n. 1, p. 6-6, 2015.

SAMBERG, Meghan E.; ORNDORFF, Paul E.; MONTEIRO-RIVIERE, Nancy A. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 2, p. 244-253, 2011.

SAMBERG, Meghan E. *et al.* In vitro biocompatibility and antibacterial efficacy of a degradable poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) copolymer incorporated with silver nanoparticles. **Annals of biomedical engineering**, v. 42, p. 1482-1493, 2014.

SANTOS, Leticia F. *et al.* Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Applications in functional foods. **Dyes and Pigments**, v. 110, p. 72-79, 2014.

SCOTTER, M. J. *et al.* Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Additives & Contaminants**, v. 11, n. 3, p. 301-315, 1994.

SHAKER, Mohamed A.; SHAABAN, Mona I. Synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial and anti-adherence activities against multidrug-resistant isolates from *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Taibah University medical sciences**, v. 12, n. 4, p. 291-297, 2017.

SHEPARD, Donald S. *et al.* Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 84, n. 2, p. 200-207, 2011.

SILVA, Jacilene *et al.* Bixinoids potentially active against dengue virus: a molecular docking study. **International J. Sci. Eng. Res**, v. 8, n. 4, p. 882-887, 2017.

SILVA, Jacilene *et al.* Estudo comparativo de docking molecular entre o Inibidor de protease saquinavir e o carotenoide bixina como potencial inibidor do vírus HIV tipo 1 (1hxb). **Revista Expressão Católica Saúde**, v. 3, n. 1, p. 35-41, 2018.

SILVA, Marta Gomes da *et al.* The annatto carotenoids and the norbixin absorption coefficient. 2018.

SMEKALOVA, Monika *et al.* Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. **The veterinary journal**, v. 209, p. 174-179, 2016.

SOBRINHO, Antonio Carlos Nogueira *et al.* Bixinoids derived from bixa orellana as a potential Zika virus inhibitor using molecular simulations. Antiviral effect on the Zika virus of bixinoids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, 2022.

SOLIS-SANTOYO, Francisco *et al.* Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, 2021.

SOMACAL, Sabrina *et al.* Norbixin, a natural dye that improves serum lipid profile in rabbits and prevents LDL oxidation. **Food Research International**, v. 159, 2022.

STRINGHETA, P. C.; SILVA, P. I. Pigmentos de urucum extração, reações químicas, usos e aplicações. **Viçosa: Suprema**, 2008.

TEICH, Vanessa; ARINELLI, Roberta; FAHHAM, Lucas. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **J. bras. econ. saúde (Impr.)**, p. 267-276, 2017.

THELMA, J.; BALASUBRAMANIAN, C. Ovicidal, larvicidal and pupicidal efficacy of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus marisflavi* against the chosen mosquito species. **Plos one**, v. 16, n. 12, p. e0260253, 2021.

TIMMS, Brian V. An identification guide to the brine shrimps (Crustacea: Anostraca: Artemiina) of Australia. **Museum Victoria Science Reports**, n. 16, 2012.

VARADAVENKATESAN, Thivaharan; VINAYAGAM, Ramesh; SELVARAJ, Raja. Structural characterization of silver nanoparticles phyto-mediated by a

plant waste, seed hull of *Vigna mungo* and their biological applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1147, p. 629-635, 2017.

VENKATESH, U. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and Dengue Virus Co-infection: Indian Perspectives. **Disaster Medicine and Public Health Preparedness**, v. 16, n. 5, p. 1769-1771, 2022.

VILAR, Daniela de Araujo *et al.* Estudo fitoquímico da bixina e fração oleosa extraídos da *Bixa orellana* biomonitorado pela atividade leishmanicida. 2015.

VIJAYAN, Sri Ramkumar *et al.* Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of seaweed, *Turbinaria conoides*, and their antimicrofouling activity. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. World Health Organization, 2005.

XIE, Jianping *et al.* Silver nanoplates: from biological to biomimetic synthesis. **ACS nano**, v. 1, n. 5, p. 429-439, 2007.

YANG, Yuheng *et al.* Ecological risk assessment and environment carrying capacity of soil pesticide residues in vegetable ecosystem in the Three Gorges Reservoir Area. **Journal of Hazardous Materials**, v. 435, 2022.

ZAREI-CHOUGHAN, Mohammad *et al.* Spatial distribution, ecological and health risk assessment of organophosphorus pesticides identified in the water of Naseri artificial wetland, Iran. **Marine Pollution Bulletin**, v. 179, 2022.

ZHANG, Xi-Feng *et al.* Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 2016.

ZHU, Zhixian *et al.* Maternal exposure to pesticides during pregnancy and risk for attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring: a protocol for systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 100, n. 26, 2021.

ZIMBONE, M. *et al.* Dynamic light scattering and UV-vis spectroscopy of gold nanoparticles solution. **Materials Letters**, v. 65, n. 19-20, p. 2906-2909, 2011.

ZOHRA, Tanzeel *et al.* Green nano-biotechnology: a new sustainable paradigm to control dengue infection. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2022, 2022.