



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**CO-CRISTALIZAÇÃO DA CURCUMINA COM D-MANITOL:
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES SOBRE LARVAS DO *Aedes Aegypti*
(Linnaeus, 1762)**

Matheus Garbuio*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Co-orientadora:

Dra. Natalia Mayumi Inada

* bolsista (CAPES)-88882.426526/2019-01

**São Carlos – SP
2021**

MATHEUS GARBUIO

“Co-cristalização da curcumina com d-manitol: caracterização e aplicações sobre larvas do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Co-orientadora:

Dra. Natalia Mayumi Inada

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Instituto de Física (IFSC) - Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Departamento de Morfologia e Patologia – DMP - UFSCar

Dr. Alessandra Ramos Lima

Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

São Carlos
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Matheus Garbuio, realizada em 27/07/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (USP)

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Alessandra Ramos Lima (UFMS)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Dedico este trabalho aos meus pais, que não mediram esforços para que eu chegasse até
essa etapa da minha vida.

Dedico a minha prima por me inspirar a ser eu mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por me ajudar a superar as dificuldades para realizar este sonho, bem como conceder oportunidades de viver experiências.

A minha família, que independe da situação, foi meu suporte. Meus tios e primos muito obrigado. E meu carinho especial ao meu cachorro Oliver, minha gata Gaia e minha calopsita Quitinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao corpo docente, pelos ensinamentos e a oportunidade de prosseguir com a minha formação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato por toda orientação, confiança e oportunidade de realizar esta pesquisa.

A minha co-orientadora Dra. Natalia Mayumi Inada por todas as reuniões para direcionar o meu trabalho e a todos os conselhos e ensinamentos. Muito obrigado Nat!

Agradeço ao pessoal do Zika, Me. Natasha por todo apoio, trabalho em conjunto, e especialmente, Dr. Larissa Marila de Souza uma grande amiga, cuja parceria foi um ponto essencial para o desenvolvimento deste trabalho, além da troca de conhecimentos e da amizade que foram muito mais importantes, pois me fizeram crescer e amadurecer. Muito obrigado Lari!

A toda a equipe do Laboratório de Biofotônica, especialmente o pessoal do rolezinho, que me faziam sair um pouco da rotina e me divertir, meu muito obrigado pessoal.

Às pessoas que, ao longo do projeto, me deram suporte para que eu pudesse evoluir na pesquisa: à Dra. Thaila, por me ensinar a utilizar o laboratório de microbiologia e por contribuir nas correções e orientações amigas; ao Dr. Lucas, por me ensinar a utilizar várias ferramentas para a caracterização, todas as orientações e conversas, obrigado pela ajuda; ao Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, pela ajuda e confecção das formulações de curcumina.

Ao meu amigo Caio, por demonstrar que as coisas são mais fáceis do que se imagina, por me fazer sorrir nos piores momentos e por sempre estar comigo sempre. Muito obrigado Vi!

As minhas amigas Renata e Raissa, a primeira por ser minha ouvinte (que não é fácil haha), minha confidente e ter uma conexão que só a gente entende; e a segunda, pelos rolês, por ter gostos muito parecidos com os meus e estar sempre de prontidão por mim.

As minhas amigas Leticia, Gabi e Emily, que mesmo distantes, sempre estamos juntos, seja em uma conversa, uma lembrança, uma ligação. Muito obrigado.

A minhas primas Julia e Lenita, a primeira por ser minha irmã da vida, levando para sair, comer e pelas conversas e a segunda por me distrair, pelos churrascos e pelas músicas.

A Fran por me inspirar nas coisas simples da vida e pela profissional que tanto me ensinou.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar e contribuir na avaliação do meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*Where there is desire there is gonna be a flame
Where there is a flame someone's bound to get burned
But just because it burns doesn't mean you're gonna die
You gotta get up and try, and try, and try
You gotta get up and try, and try, and try
You gotta get up and try, and try, and try*

-Pink

Garbuió, Matheus. **Co-cristalização da curcumina com D-manitol: caracterização e aplicações sobre larvas do *Aedes aegypti***. 2021. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2021.

RESUMO

A busca por novos compostos para a eliminação das larvas do mosquito *Aedes aegypti* é uma estratégia utilizada por vários pesquisadores. O Brasil, por exemplo, vem enfrentando grandes problemas devido aos altos números de casos de arboviroses transmitidas pelo mosquito. Com o objetivo de diminuir a velocidade de seleção de populações resistentes aos inseticidas químicos, a inativação fotodinâmica (IFD) em larvas de *Ae. aegypti* é uma relevante e promissora técnica alternativa ao combate da proliferação do mosquito. A curcumina (CUR), um pigmento extraído das raízes da *Curcuma longa*, foi descoberta como um potencial fotolarvicida. Apesar dos avanços nessa área, a CUR ainda apresenta algumas limitações, como sua baixa estabilidade, biodisponibilidade e solubilidade em água. Com isso, o objetivo deste estudo foi desenvolver formulações à base de CUR e D-manitol via co-cristalização, com a finalidade de obter uma melhora na sua solubilidade e consequentemente viabilizar sua aplicação em criadouros do *Ae. aegypti*. Foram preparadas 4 formulações : (1)85:15, (2)75:25, (3)50:50 e (4)25:75 proporções de D-manitol:curumina. A caracterização das formulações foi realizada com as seguintes técnicas: espectroscopia de absorção (UV-vis), espectroscopia infravermelho (FTIR), espectroscopia de fluorescência, microscopia confocal, ensaios de solubilidade em pH 2, 7 e 11, o ensaio de degradação (da formulação mais eficaz) em lâmpadas fluorescentes (0,5 mW/cm²) 24 h. Para ensaios de eficácia, as formulações foram utilizadas nas concentrações entre 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 mg.L⁻¹ com lâmpadas brancas fluorescentes de 18 W, irradiância de 0,5 mW/cm² e após 24 h a mortalidade das larvas foram registrados. Os tempos de internalização e de eliminação das formulações no sistema digestório das larvas de *Ae. aegypti* foram determinadas por microscopia óptica. Foram realizados testes de toxicidade aguda e de aplicação em campo simulado (da formulação mais eficaz). A análise da atividade microbiana em águas de criadouros artificiais e do campo simulado. A formulação 1 foi a que apresentou a melhor solubilidade, seguida por 2, 3 e 4, porém, em relação a eficácia fotolarvicida, a formulação 3 apresentou o melhor desempenho, com um valor de CL₅₀ de 0,01 mg.L⁻¹, além disso, apresentou o menor tempo de internalização e o maior tempo de eliminação, 30 minutos e 8 dias respectivamente. Com seus melhores resultados, a formulação 3 foi eleita como a mais eficaz, além de apresentar uma segurança ambiental, devido não apresentar mortalidade nos testes de ecotoxicidade aguda e manter sua persistência no campo por 14 dias com luz e 6 dias na sombra.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, inativação fotodinâmica, curcumina, métodos de controle.

Garbuio, Matheus. **Co-crystallization of curcumin with D-mannitol: characterization and applications on *Aedes aegypti* larvae**. 2021. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2021.

ABSTRACT

The search for new compounds to eliminate *Aedes aegypti* mosquito larvae is a strategy used by several researchers. Brazil, for example, has been facing major problems due to the high number of cases of arboviruses transmitted by the mosquito. In order to reduce the speed of selection of populations resistant to chemical insecticides, photodynamic inactivation (IFD) in *Ae. aegypti* has been used as an alternative. Curcumin (CUR), a pigment extracted from the roots of *Curcuma longa* has been discovered as a potential photolarvicide. Despite advances in this area, CUR still has some limitations, such as its low stability, bioavailability and water solubility. Thus, the objective of this study was to develop formulations based on CUR and D-mannitol via co-crystallization, in order to obtain an improvement in their solubility and, consequently, enable their application in *Ae. aegypti*. The characterization of the formulations carried out: absorption spectroscopy (UV-vis), infrared spectroscopy (FTIR), fluorescence spectroscopy, confocal microscopy, solubility tests at pH 2, 7 and 11, the degradation test (of the most effective formulation) in fluorescent lamps (0.5 mW/cm²) 24h. For efficacy trials, the formulations were used at concentrations between 0.00625; 0.0125; 0.025; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.8 mg.L⁻¹ with 18W white fluorescent lamps, 0.5 mW/cm² irradiance and after 24h larvae mortality were recorded. The determination of the internalization and elimination time of the formulations in the digestive system of *Ae. aegypti* through optical microscope images. Acute toxicity tests and simulated field application (of the most effective formulation) were carried out. And the analysis of microbiota activity in artificial breeding waters and in the simulated field where the formulations were placed by counting the log of colony forming units. Among the formulations, formulation 1 had the best solubility, followed by 2, 3 and 4, however, in relation to photolarvicidal efficacy, formulation 3 had the best performance, with a LC50 value of 0.01 mg.L⁻¹, in addition, had the shortest internalization time and the longest elimination time, 30 minutes and 8 days, respectively. With its best results, formulation 3 was chosen as the most effective, in addition to presenting an environmental safety, as it does not present mortality in acute ecotoxicity tests and maintains its persistence in the field for 14 days in light and 6 days in the shade.

Keywords: *Aedes aegypti*, photodynamic inactivation, curcumin, control methods.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 – Introdução

Figura 1.1 Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Casa da Ciência (adaptado)...17

Figura 1.2 Identificação dos sorotipos DENV no território brasileiro. Fonte: Boletim epidemiológico, Ministério da Saúde.19

Figura 1.3 Distribuição global das arboviroses: Zika, Chikungunya e dengue. Fonte: Portal IOC/Fiocruz.21

Figura 1.4 Curva epidêmica dos casos de dengue no Brasil nos anos de 2019 e 2020. Fonte: Sinan Online/ Ministério da Saúde 2020.22

Figura 1.5 *Curcuma Longa* - Açafrão-da-terra. Fonte: PorPlanta, 2020.26

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Figura 2.1 Bandeja plástica branca para eclosão dos ovos (substrato para oviposição: fita de papel filtro) de *Ae. aegypti*.33

Figura 2.2 Representação dos ensaios de eficácia - recipientes com água destilada e lâmpadas fluorescentes.34

Figura 2.3 Aquários de aclimação de *Danio rerio* (Zebrafish) – filtro, termostato, termômetro, timer de fotoperíodo e iluminação.36

Figura 2.4 Ensaio de toxicidade aguda em *Danio rerio* (Zebrafish). Um sistema de aeração foi montado com o auxílio de bombas, mangueiras de ar e pedras porosas.37

Figura 2.5 Ensaio de campo simulado com caixas d'água. À direita: caixas do grupo 1 que permaneceram abertas permitindo 100% a entrada de luz solar. À esquerda: caixas do grupo 2, cujas caixas tiveram 50% da luz bloqueada, simulando assim um ambiente sombreado.38

Figura 2.6 Adição das larvas de *Aedes aegypti* (30 larvas) às caixas d'água.39

Capítulo 3 – Resultados e Discussões

Figura 3.1 Espectros de absorção: cur_etanol = curcumina livre, 85:15 = formulação 1, 75:25 = formulação 2, 50:50 = formulação 3 e 25:75 = formulação 4.41

Figura 3.2 Espectros de fluorescência: cur = curcumina, 85:15 = formulação 1, 75:25 = formulação 2, 50:50 = formulação 3 e 25:75 = formulação 4.42

Figura 3.3 Espectros de infravermelho: CUR = curcumina, D-man = D-manitol, 85:15 = formulação 1, 75:25 = formulação 2, 50:50 = formulação 3 e 25:75 = formulação 4.43

Figura 3.4 Microscopia confocal das formulações. A - 85:15 = formulação 1, B - 75:25 = formulação 2, C - 50:50 = formulação 3 e D - 25:75 = formulação 4.45

Figura 3.5 Espectros de fluorescência das formulações no estado sólido (A) e Disposição e organização dos cristais das formulações (B).46

Figura 3.6 Diagrama da solubilidade em comparação com a proporção de D-manitol nas formulações de Curcumina. A- pH 3; B- pH 7; C- pH 11.47

Figura 3.7 Curva padrão das formulações, com base na absorbância máxima em 450 nm. Inseto: Equação linear da reta ajustada, com respectivo fator de ajuste r^249

Figura 3.8 Porcentagem da degradação da formulação 3 durante 24h (absorção em 450 nm).	50
Figura 3.9 Comparação da mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 24 horas, após realização dos bioensaios com as formulações de curcumina.	52
Figura 3.10 Internalização das formulações 1, 2 ,3 e 4 na concentração de CL ₂₅ no sistema digestório de larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> . (*) diferença no tempo de internalização.	54
Figura 3.11 Eliminação das formulações 1, 2 ,3 e 4 na concentração de CL ₂₅ no sistema digestório de larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> . (*) diferenças no tempo de eliminação. ...	56
Figura 3.12 Proliferação microbiana da água de criadouros artificiais de larvas de <i>Ae. aegypti</i> durante 14 dias após a aplicação das formulações (1-4).	57
Figura 3.13 Atividade larvívora da curcumina em caixas d'água expostas à luz solar direta e indireta.	59
Figura 3.14 Avaliação da carga microbiana da água dos criadouros tratados com curcumina (25 mg.L ⁻¹). A) Caixas expostas a luz direta, B) Caixas expostas a luz indireta e C) Controle.	61

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	14
1.1 Biologia do <i>Aedes aegypti</i>	16
1.2 Epidemiologia.....	18
1.3 Métodos de controle.....	22
1.4 Inativação fotodinâmica.....	25
1.5 Curcumina.....	26
1.6 Inativação Fotodinâmica aplicada ao controle de vetores	28
1.7 Objetivos	29
1.7.1 Objetivo Geral	29
1.7.2 Objetivos Específicos.....	29
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	30
2.1 Preparo e caracterização das formulações de curcumina em D-manitol	30
2.1.1 Preparo das formulações	30
2.1.2 Espectroscopia UV-Vis	30
2.1.3 Espectroscopia de fluorescência.....	31
2.1.4 Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	31
2.2 Estudo de solubilidade	32
2.3 Fotoestabilidade da formulação	32
2.4 Manutenção das larvas	32
2.4.1 Ensaios de eficácia	33
2.5 Determinação do tempo de internalização e eliminação das formulações em larvas de <i>Ae. aegypti</i>	34
2.6 Ensaios de proliferação microbiana em criadouros artificiais	35
2.7 Avaliação do risco em modelo animal.....	36
2.6 Atividade larvicida e investigação da persistência em aplicação de campo simulado	37
2.8 Análise da proliferação microbiana em aplicação de campo simulado	39
2.9 Análises Estatísticas.....	39
Capítulo 3 – Resultados e Discussões	40
3.1 Caracterização das formulações de curcumina em D-manitol.....	40
3.1.1 Espectros de absorção das formulações de curcumina.....	40

3.1.2 Espectros de fluorescência das formulações de curcumina	42
3.1.3 Espectros de infravermelho das formulações de curcumina	43
3.2 Ensaio de solubilidade das formulações.....	46
3.3 Fotodegradação em luz fluorescente.....	48
3.4 Determinação das concentrações letais.....	51
3.4.1 Eficácia larvívica das formulações.....	51
3.5 Tempo de internalização e eliminação da curcumina em larvas do <i>Ae. aegypti</i>	54
3.5.1 Tempo de internalização (TI).....	54
3.5.2 Tempo de eliminação (TE).....	55
3.6 Avaliação do crescimento bacteriano em águas de criadouro artificial.....	57
3.7 Toxicidade aguda em peixes (<i>Danio rerio</i>)	58
3.8 Persistência da formulação 3 em aplicação de campo simulado	59
3.9 Avaliação do crescimento bacteriano após o uso da formulação 3 em aplicação de campo simulado	60
Capítulo 4 – Conclusões	61
Referências	63

Capítulo 1 – Introdução

Os culicídeos, de modo geral, são insetos conhecidos popularmente como mosquitos, muriçocas ou pernilongos. Pertencentes à Família Culicidae, eles atraem com frequência a atenção da Saúde Pública por serem importantes vetores de patógenos (HENCHAL, 1990). Até o momento, foram identificadas mais de 9.579 espécies, sendo o gênero *Aedes* o mais conhecido e a espécie de maior importância, *Aedes aegypti* responsável pela transmissão de arboviroses como a dengue, Zika, chikungunya e febre amarela (TISSOT, 2008).

Arbovírus é um termo usado para designar vírus cuja sua replicação ocorre em insetos e mais precisamente em artrópodes. Esses vírus são transmitidos para os seres humanos através da picada do mosquito (HENCHAL, 1990; FORATINNI, 2002). Dessa forma, a proliferação dessas doenças está diretamente relacionada à infestação dos insetos vetores. Para minimizar a incidência dessas arboviroses é essencial que algumas abordagens de controle populacional de insetos sejam adotadas. Conscientização e engajamento da população (BRAGA, 2007a), a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere o uso de inseticidas. Os métodos mais utilizados para a eliminação dos criadouros de *Aedes aegypti* é a aplicação de inseticidas químicos. No entanto, esses produtos podem desencadear uma série de problemas ambientais (BRAGA, 2007b).

Atualmente, novas estratégias para o controle do *Ae. aegypti* estão sendo estudadas, como a introdução de mosquitos transgênicos (estéreis) e o uso de armadilhas para “mosquitos da dengue”. O primeiro método corresponde a liberação de mosquitos estéreis no ambiente. Esses mosquitos *Ae. aegypti* que receberam doses de radiação para ficarem inférteis, e após a cópula, as fêmeas realizam a postura de ovos inviáveis (DE OLIVEIRA, 2020). Já no segundo método, são instaladas armadilhas e, com o auxílio da população local, são distribuídas e posicionadas em locais estratégicos para que os mosquitos depositem seus ovos (DO NASCIMENTO XAVIER, 2017).

Outro método é o controle biológico, realizado através de organismos como peixes larvóforos (predadores de larvas) (ANDRADE, 2004), e os microrganismos entomopatogênicos, como fungos, bactérias e parasitas. O exemplo mais comum de microrganismo entomopatogênico é o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), uma bactéria responsável pela produção e liberação de proteases tóxicas (POLANCZYK, 2003). Ambos

são aplicáveis contra a proliferação de larvas de mosquitos, todavia, apresentam algumas especificidades que podem torná-los inviáveis. Para os peixes é necessário um período de aclimação no ambiente (ANDRADE, 2004) e o Bti, em larga escala, tem um custo elevado e a exposição das partículas de toxinas diretamente na luz solar pode inativá-las, diminuindo sua eficiência (POLANCZYK, 2003).

Alguns mosquitos e artrópodes possuem em sua microbiota uma bactéria denominada Wolbachia. Em mosquitos *Ae. aegypti*, esses microrganismos não são encontradas. (SKELTON, 2016). Como método de controle, a Wolbachia deve ocorrer de duas formas: (i) fêmeas infectadas, que ao copular com machos infectados ou não, passarão essas bactérias para prole, tornando-a infectada; (ii) machos infectados, que ao copular com fêmeas não infectadas, não geram prole, ocorrendo uma incompatibilidade entre os gametas, o que leva à morte do embrião (ARAÚJO, 2015). A limitação desse estudo se deve a localização dos mosquitos infectados e a quantidade dos mesmos, pois apenas teremos essas duas condições quando um dos mosquitos apresentarem a bactéria.

Em vista disso, novas tecnologias de controle ao *Ae. aegypti* têm sido estudadas como possíveis alternativas. Até o momento, o uso de fotossensibilizadores (FSs) para o controle de espécies de mosquitos vem se tornando promissor e abre perspectivas para o desenvolvimento de moléculas altamente eficazes, de baixo custo e de impacto ambiental reduzido.

A interação de FSs com a luz visível, produz espécies de oxigênio altamente reativas. Essas espécies se acumulam no interior do organismo alvo, causando reações oxidativas e danos irreversíveis capazes de ocasionar a morte celular. Esse processo é denominado inativação fotodinâmica (IFD) (DONDEJI, 2005; HUANG, 2009).

Os FSs atuam através da inativação fotodinâmica (IFD), cuja molécula fotossensível é capaz de interagir com a luz visível, originando espécies de oxigênio altamente reativas. O mecanismo de ação dessas moléculas é caracterizado pela produção de radicais livres e/ou oxidantes que se acumulam no interior de um organismo alvo, levando à reações fotoquímicas após ativação por luz. A partir destas reações irão acontecer trocas de energia entre moléculas de oxigênio, podendo gerar novas formas tóxicas capazes de ocasionar a morte celular.

A curcumina (CUR) é um fotossensibilizador (FS) natural originário dos rizomas da herbácea *Curcuma longa*. Esse pigmento amarelado pertence aos diferolulmetanos, cujas propriedades são: anticarcinogênicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas (MENON e SUDHEER, 2007). Estudos mais recentes mostraram que a CUR é uma alternativa promissora para o controle de larvas do *Ae. aegypti*. De Souza *et al.* (2019), avaliaram a atividade da CUR como um fotolarvicida em larvas de *Ae. aegypti* expostas a luz solar, resultando em altas taxas de mortalidade. De Souza *et al.* (2020) também avaliaram a atividade fotolarvicida e ovicida da CUR associada à sacarose e ao D-manitol. Esses açúcares foram utilizados como um atrativo para as larvas, promovendo melhor palatabilidade da formulação, além de melhorar sua solubilidade em água.

Dreyer (2009) comparou três FSs, azul de metileno, clorina a e rosa bengala em seus estudos no controle de *Ae. aegypti* e constatou que o rosa bengala é o mais eficiente entre eles e que a concentração de 0,01 mg.L⁻¹ é a mais efetiva. Lima *et al.* (2016) avaliaram a mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* frente a atividade dos corantes: extrato de clorofila, azul de metileno e eosina azul de metileno. O estudo mostrou que a eosina azul de metileno foi o corante que melhor demonstrou potencial fotodinâmico frente as larvas.

Sabe-se do grande potencial que a CUR apresenta como fotolarvicida, no entanto, a associação com D-manitol pode ser um atrativo para os microrganismos presente na água dos criadouros, podendo gerar um desequilíbrio na microbiota local. Aliado a isso, e como a molécula de CUR apresenta baixa solubilidade em água, surgiu a motivação deste estudo: viabilizar uma formulação de CUR, caracterizando-a com diferentes proporções de D-manitol, que apresente melhor biodisponibilidade e solubilidade em meio aquoso, com o objetivo de manter a eficácia contra as larvas de *Ae. aegypti* e minimizar os impactos ambientais.

1.1 Biologia do *Aedes aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* apresenta metamorfose completa, ou seja, seu desenvolvimento passa pelas fases de ovo, larva, pupa para depois emergir em mosquito. As larvas surgem após a eclosão dos ovos. Em seguida, ocorre um crescimento gradual representado por quatro estágios nos quais ocorrem as trocas do exoesqueleto. Logo após,

acontece a fase de empupamento e, por último, a emergência do adulto (HICKMAN, 2004). Todo o ciclo de vida possui a duração de 7 a 14 dias (Figura 1.1). Esse tempo irá depender muitas vezes do clima, incluindo temperatura e umidade e de outros fatores como a disponibilidade de recursos (alimento) e a densidade populacional de larvas nos criadouros (CLEMENTS, 1992; FORATTINI 2002; CARVALHO e MOREIRA 2017).

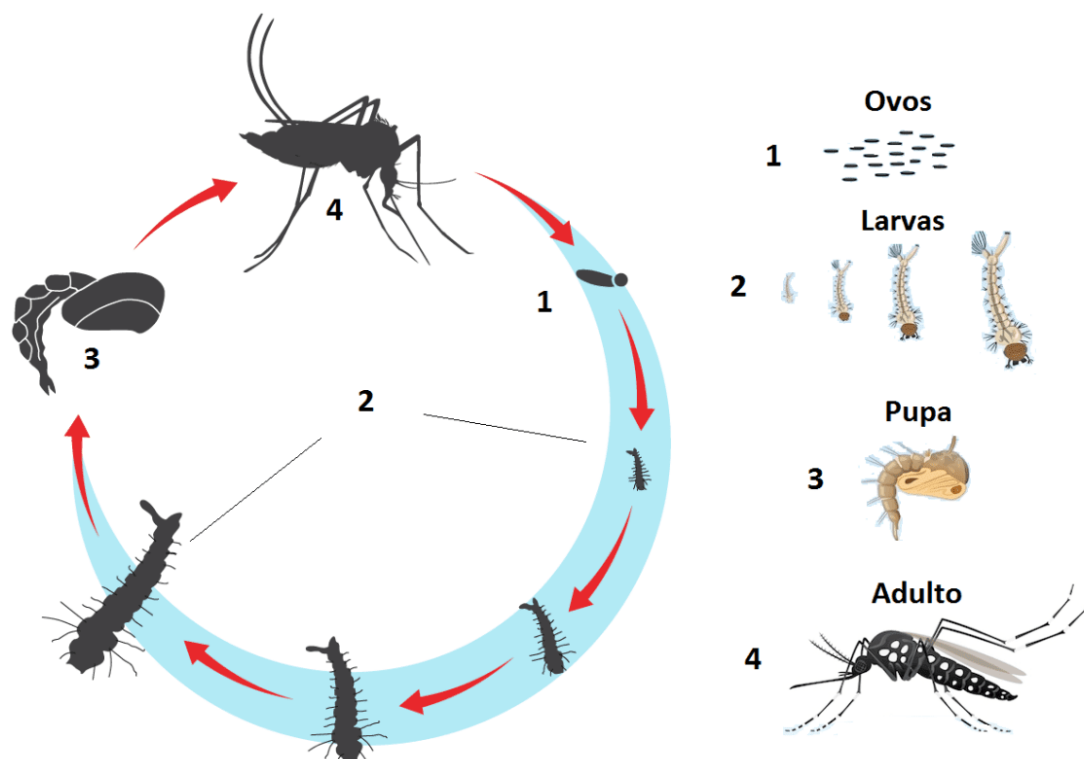


Figura 1.1 Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Casa da Ciência (adaptado).

O mosquito é um inseto cosmopolita, possui hábitos diurnos, conseguindo se adaptar com facilidade em ambientes urbanos. Machos e fêmeas possuem a dieta de seiva ou néctar de plantas, caracterizada por substâncias açucaradas. Após a cópula, as fêmeas necessitam do repasto sanguíneo para o processo de desenvolvimento e maturação dos ovos (SILVA, 1999; SILVA, 2002).

No instante em que a fêmea oviposita, seus ovos apresentam uma coloração branca e, à medida que entram em contato com o oxigênio atmosférico, escurecem (GERIS, 2012). A distribuição dos ovos pela fêmea ocorre de forma fragmentada em diversos criadouros e

a mesma realiza a “oviposição em saltos” (*skip-oviposition*), para diminuir a disputa entre a prole e abranger uma maior dispersão (VALLE *et al.* 2014).

A postura dos ovos é realizada na superfície próxima da água ou em ambientes passíveis de serem inundados. Geralmente, em regiões peridomiciliares, as fêmeas majoritariamente ovipositam em recipientes artificiais como caixas d’água, pneus e materiais descartáveis (BRAGA, 2007a). O número de ovos vai depender da quantidade de sangue que foi ingerido, e uma fêmea consegue colocar até 200 ovos em um criadouro (FORATTINI, 2002).

Após a maturação dos ovos no ambiente, ocorre um fenômeno denominado quiescência, que é um período de dormência, no qual os ovos permanecem viáveis e garantem resistência a fatores ambientais adversos como temperaturas elevadas (dessecação), esperando que o ambiente se alague novamente para possibilitar a eclosão (CHRISTOPHERS, 1960; KLIEWER, 1961; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

As larvas são predominantemente aquáticas, apresentam quatro estágios de trocas de exoesqueleto, sendo o terceiro o mais utilizado em experimentos de ação larvicida (SILVA; SILVA; LIRA, 1998). As mesmas apresentam aspecto vermiforme com coloração variada, desde o esbranquiçado até tons de preto, e têm o corpo fragmentado em cabeça, tórax e abdômen (HICKMAN, 2004).

As pupas possuem divisão do corpo diferente, uma fusão da cabeça com tórax denominada cefalotórax e abdômen, em formato de vírgula. Nessa fase intermediária, as pupas não se alimentam e sua coloração se torna mais escura à medida que a emergência do adulto se aproxima (GERIS, 2012).

1.2 Epidemiologia

O mosquito *Ae. aegypti* é um dos principais vetores do vírus da dengue, chikungunya e Zika, arboviroses que preocupam as autoridades médicas sanitárias do Brasil e de todo o mundo (COSTA e CALADO, 2016).

A dengue é uma doença febril aguda (infecção viral), e a transmissão ocorre através da picada de fêmeas do mosquito infectadas com o vírus. A doença é caracterizada por febre alta, acompanhada de intensas dores de cabeça e nas articulações. Outros sintomas também

observados são náuseas, vômitos e erupções na pele. Especificamente, a dengue possui cinco sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5, sendo o último recém descoberto durante um surto de dengue na Malásia (IOC/Fiocruz, 2016). A Figura 1.2 representa a situação espacial dos sorotipos com maior incidência nos estados do Brasil em 2020.

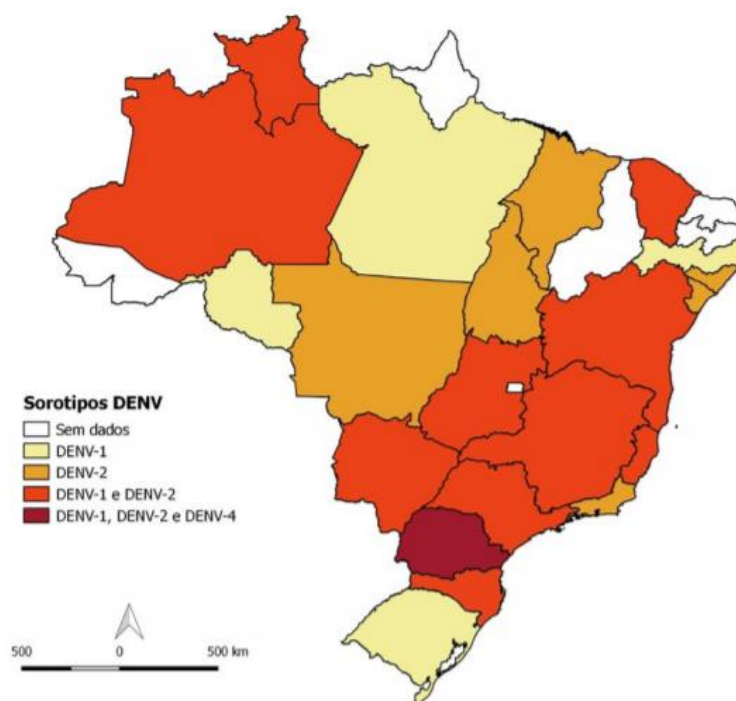


Figura 1.2 Identificação dos sorotipos DENV no território brasileiro. Fonte: Boletim epidemiológico, Ministério da Saúde.

Chikungunya e Zika são doenças que tiveram os seus primeiros casos notificados nos anos de 2014 e 2015, respectivamente. A Chikungunya é causada pelo vírus CHIKV, pertencente ao gênero *Alphavirus*, caracterizada por febres e dores articulares. Diferente da dengue, a Chikungunya pode ter seus sintomas persistindo por anos, tornando-se crônica. Também é possível o aparecimento de quadros atípicos caracterizados por serem mais graves, como problemas neurológicos, cardiovasculares, renais, oculares e dermatológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Em 2015, foram registrados no Brasil 38.499 casos de Chikungunya e em 2016 houve um aumento de 589,7% dos casos, passando de 260 mil

notificações. A incidência da doença no país foi de 129,9 casos por 100 mil habitantes sendo o Nordeste a região com maior incidência, apresentando 407,7 casos por 100 mil habitantes ((MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A Zika é causada pelo vírus ZIKV e apresenta sintomas parecidos com as outras arboviroses, dengue e Chikungunya, porém pode ocorrer o desenvolvimento de complicações raras e graves, como encefalites, Síndrome de Guillain-Barré e microcefalia, esta última relacionada à infecção do vírus durante a gestação (MUSSO e GUBLER, 2016). Em 2016, foram registrados no Brasil 214.193 casos de Zika representando uma incidência de 104,8 casos por 100 mil habitantes. E diferente dos casos de Chikungunya, a região Centro-Oeste teve a maior incidência de Zika do país: 219,2 casos por 100 mil habitantes (OPAS, 2017b).

O ano de 2016 foi marcado pelo grande número de casos de dengue no Brasil e em todo o mundo. O Brasil registrou mais 1,5 milhões de casos, e a região com a maior incidência foi o Centro-Oeste, com 1.313,8 casos por 100 mil habitantes, seguida do Sudeste, com 999,5 casos por 100 mil habitantes. O país foi o que apresentou maior número de casos das Américas, que na sua totalidade estimou 1,38 milhões de casos (ANAHP, 2016).

Em 2019, o Brasil enfrentou um grande aumento de casos de dengue em relação a 2018. Segundo o Ministério da Saúde, cerca de 1,5 milhão de casos foram registrados. Este cenário se tornou preocupante, levando em conta que em 2015 houve um surto com quase 1,7 milhões de notificações. No mesmo ano, no Pacífico Ocidental foram registrados mais de 375 mil casos suspeitos de dengue, as Filipinas relataram 176.411 casos, a Malásia 100.028 e as Ilhas Salomão com mais de 7.000 casos. No continente africano, Burkina Faso também registrou um surto localizado com mais de 1.000 casos (SAÚDE DO VIAJANTE, 2019).

Também foi identificado um surto de Chikungunya na África, 53.238 casos na Etiópia e 11.434 casos registrados na República do Congo. No continente asiático, o Ministério da Saúde da Malásia notificou 562 casos representando um aumento de 85 casos desde o relatório do ano anterior (2018). De acordo com o Centro Nacional de Controle de Doenças (CDRT), 602 casos foram registrados em todo o país da Índia, no mesmo ano.

A Figura 1.3 mostra a distribuição global dos vírus da dengue, Chikungunya e Zika. Vale ressaltar que, os países mais afetados estão situados entre os Trópicos de Capricórnio

e Câncer, representando regiões tropicais do globo, onde geralmente ocorre a maior incidência devido à alta temperatura e precipitações recorrentes durante todo o ano.

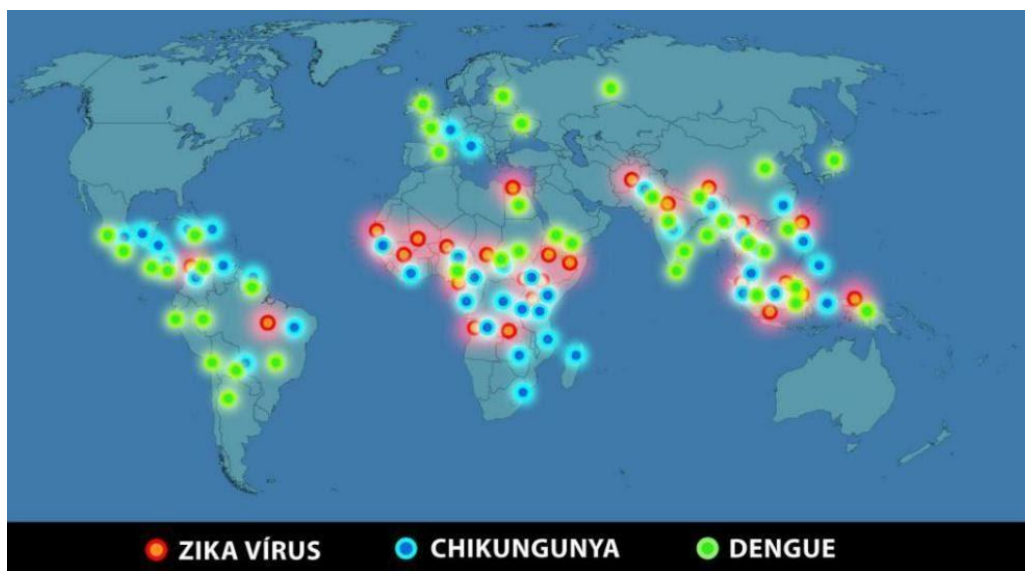


Figura 1.3 Distribuição global das arboviroses: Zika, Chikungunya e dengue. Fonte: Portal IOC/Fiocruz.

Em relação ao ano anterior (2019), 2020 não apresentou aumento nos números de casos prováveis de chikungunya e Zika mas um decaimento das notificações, segundo Ministério da Saúde. Já a dengue estava apresentando um cenário com números de casos ainda maiores que 2019 no Brasil, com dois picos relevantes nas semanas epidemiológicas (SE) 7 e 11 (Figura 1.4).

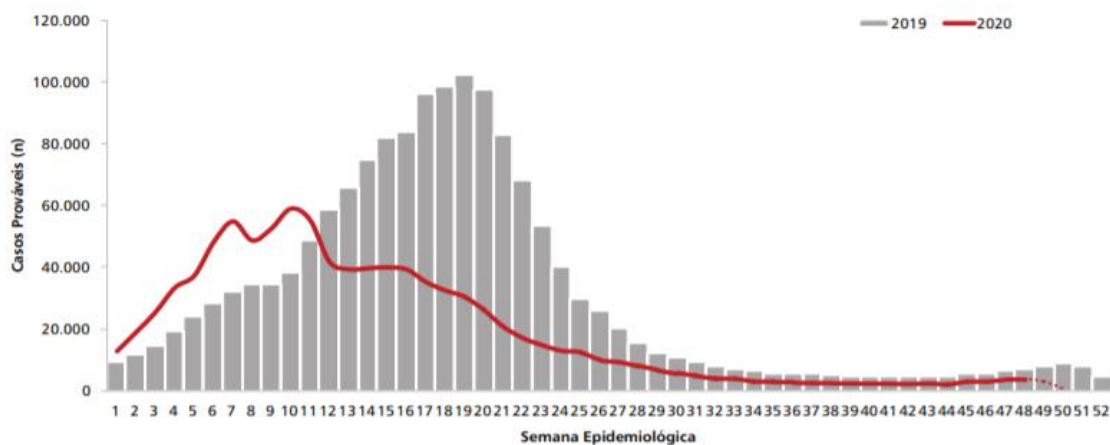


Figura 1.4 Curva epidêmica dos casos de dengue no Brasil nos anos de 2019 e 2020. Fonte: Sinan Online/ Ministério da Saúde 2020.

Todavia, na semana 12 esses números começaram a ter uma redução, isto ocorreu possivelmente pelo enfrentamento da pandemia do coronavírus (covid-19), em que a quarentena dificultou o atraso das notificações e o receio da população em sair de casa, procurar um atendimento médico. Sendo assim, esses dados não são conclusivos e podem sofrer alterações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

1.3 Métodos de controle

O controle de mosquitos transmissores de arbovírus tornou-se um grande desafio, em regiões em desenvolvimento. Dentre outras preocupações, a falta de infraestrutura e de recursos para que a população tenha o necessário para enfrentar a proliferação dos vetores é de suma importância, como por exemplo, coleta de lixo, saneamento básico, implementação de programas de controle, pois interferem diretamente na eficácia dos métodos de controle (VALLE, 2015).

No caso do *Ae. aegypti*, atualmente existem três métodos de controle envolvendo detectar, destruir ou destinar adequadamente criadouros naturais ou artificiais. Dentre eles podemos citar o controle biológico, mecânico ou ambiental e químico (COSTA, 2018).

O controle biológico é baseado na utilização de organismos predadores ou microrganismos patogênicos qualificados em reduzir a população do vetor. Os peixes (*Gambusia affinis*) e os invertebrados aquáticos são capazes de se alimentar das formas imaturas dos mosquitos (larvas e pupas). Já os microrganismos patogênicos são conhecidos por produzirem e liberarem toxinas. Um microrganismo já utilizado em aplicações no controle de vetores é o Bti, um bacilo responsável pela produção e liberação de toxinas potencialmente larvicidas (POLANCZYK, 2003; ZARA, 2016).

A estratégia para o controle mecânico ou ambiental envolve a detecção dos criadouros de formas imaturas e destinação ou destruição correta dos mesmos. As desovas são retiradas do ambiente e destruídas. As larvas e pupas podem ser drenadas junto os reservatórios naturais ou artificiais. Por sua vez, os reservatórios são eliminados ou, dependendo da ocasião, descartados ou limpos e devolvidos para seu destino inicial. Por fim,

a contenção da forma adulta abrange a redução do contato do mosquito com a população, ou seja, utilização de telas em janelas, portas e uso de repelentes e roupas protetoras (ZARA, 2016; COSTA, 2018).

O controle químico se faz por meio do uso de substâncias químicas nas diferentes fases do vetor. Nas fases larvárias são classificados como larvicidas e na fase de mosquito (fase adulta) são nomeados adulticidas. As principais categorias desses compostos são: análogos de hormônios juvenis, neurotoxinas e inibidores de síntese de quitina. No entanto, esses inseticidas podem gerar prejuízos à saúde humana, impactos ambientais e selecionar populações de mosquito altamente resistentes. (BRAGA, 2007).

O controle populacional dos vetores por meio de produtos químicos pode ser conduzido por dois caminhos. O primeiro é o tratamento focal, cuja aplicação ocorre mediante um larvicida, em situações que há presença de formas imaturas que não consigam ser mecanicamente eliminadas. Complementar ao primeiro, o segundo tratamento denominado perifocal, leva em consideração a aplicação de inseticidas, voltados para a fase adulta, ao redor da região onde há informação de criadouros (Ministério da Saúde, 2009).

Os primeiros produtos a serem utilizados com o intuito de controlar os surtos de doenças foram os organoclorados, conhecidos na década de 60 como DDTs (dicloro-difenil-tricloroetano). Esses produtos foram lançados na época sem nenhuma pesquisa prévia e aplicados como pesticidas universais, pois eram econômicos e fáceis de manipular. Com o passar dos anos, o uso indiscriminado desses produtos foi um dos fatores para o aparecimento de populações resistentes e alguns estudos apontavam muitas enfermidades relacionadas ao ser humano quando em contato com essas substâncias (OLIVEIRA FILHO, 1997).

Os organofosforados (OFs) foram os compostos que substituíram os DDTs. Desde meados do século XX, têm sido um dos inseticidas mais utilizados e, aproximadamente, existem cerca de 40 formulações conhecidas. Apesar de apresentarem um amplo espectro de produtos eficazes e atuarem no controle de endemias, esses compostos geram graves problemas de saúde pública, causando intoxicações responsáveis por um grande número de mortes (CONSOLI, 1986).

Como alternativa aos OFs, uma nova classe de compostos foi implementada, os piretróides, que são os inseticidas mais utilizados hoje contra “pragas agrícolas”. Esses

compostos são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mas requerem cuidados no seu manuseio e, principalmente, no intervalo de aplicações, para não selecionar populações resistentes e não prejudicar o meio ambiente (BRAGA, VALLE, 2007).

A Tabela 1.1 mostra os principais inseticidas utilizados na história, segundo a OMS. São apresentados o nome comercial dos produtos, suas principais características, tempo de persistência/degradação no ambiente e modo de ação nos organismos alvo.

Tabela 1.1 Inseticidas utilizados no controle do *Aedes aegypti* e seus respectivos produtos comerciais, principais características, persistência/degradação no meio e modo de ação.

Grupo/ Inseticida	Produto Comercial	Principais Características	Persistência/ Degradação	Modo de ação
Organoclorados	DDT (diclorodifeniltricloroe- tano), BHC (hexaclorobenzeno)	-Alta persistência no ambiente; -Alta solubilidade em lipídios, acumulam-se em tecidos gordurosos de organismos.	-Alta estabilidade química e tóxica.	Atuam nos receptores GABA causando depressão das atividades do sistema nervoso central (excitação, tremores, convulsões).
Organofosforados	Fenitrothion, Malathion, Pririmifós- metil, Temefós	-Custo relativamente baixo; -Largo espectro de atividade e de alto impacto sobre insetos; -Ampla gama de produtos agrícolas e sanitários;	São biodegradáveis, sendo, portanto sua persistência curta no solo, 1 a 3 meses.	Por contato e ingestão. Agem como inibidores das enzimas colinesterases, causando o aumento dos impulsos nervosos, levando a morte.
Carbamatos	Bendiocarb, Propoxur	-Paralisação muscular do inseto; -Os alvos apresentam 3 sintomas: excitação, convulsão e paralisia, em seguida a morte.	São compostos instáveis e muitos fatores influenciam a degradação: a umidade, temperatura, luz e volatilidade.	Com ação de contato e ingestão são igualmente inibidores das enzimas colinesterases porém como mecanismos diferentes dos organofosforados.
Piretróides	Deltametrina, Lambdacialotrina, Alfacipermetrina, Bifentrina, Etofenprox	-São atualmente os inseticidas mais utilizados; -Apresentam baixa toxicidade em mamíferos; -Baixo impacto ambiental; -São necessárias baixas concentrações para exercerem sua ação; -Agem nos insetos com rapidez causando paralisia imediata e mortalidade, efeito de choque denominado “Knock down”; -Devem respeitar um intervalo de segurança após aplicação.	-Intervalo de segurança de até 37 dias; -Boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente.	São os compostos de mais rápida ação na interferência da transmissão de impulsos nervosos. Podem possuir efeito repelente, espantando os insetos ao invés de eliminá-los.

Fonte: OMS, 2020.

1.4 Inativação fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é conhecida na categoria de controle de vetores como inativação fotodinâmica (IFD), uma técnica capaz de destruir tecidos seletivos através de reações fotoquímicas. É muito utilizada no tratamento de tumores cutâneos do tipo não melanoma, no tratamento de lesões tumorais, em terapias antibacteriana e antifúngica, na descontaminação de alimentos, água, em tratamentos odontológicos e dermatológicos (acne), no controle de vetores e pragas agrícolas, entre outros (NITZAN, 1994; DOUGHERTY, 1998 e LUKSIENE, 2004; MAISCH, T, 2007 e CALIN, M. A.; PARASCA, S. V., 2009).

A ativação do processo da IFD, envolve três componentes principais atóxicos separados: fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular. Essa interação gera a transferência de energia para o oxigênio celular levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) capazes de induzir a morte celular (MAISCH, T, 2007).

Durante o processo da IFD, o FS interage com o substrato e, na presença de luz passa do estado fundamental para o estado tripleto. O mecanismo de ação da IFD ocorre por dois tipos de reação: reação de tipo I e reação de tipo II. Na reação de tipo I, o FS transfere elétrons diretamente para as moléculas vizinhas, esses íons-radicaís reagem com o oxigênio no estado fundamental, gerando EROs. A produção excessiva de EROs é o resultado de um mecanismo denominado estresse oxidativo, uma situação de desequilíbrio bioquímico e/ou fisiológico, onde há o excesso de radicais livres capazes de levar à morte celular. (BOVERIS, A, *et al.*, 2008 e CALIN, M. A.; PARASCA, S. V., 2009). Na reação de tipo II, o FS excitado transfere energia diretamente para o oxigênio molecular que está no seu estado fundamental (tripleto), tornando-o reativo, denominado oxigênio singleto. Esse oxigênio é altamente oxidativo e citotóxico (CALIN, M. A.; PARASCA, S. V., 2009 e HUANG, L. *et al.* 2012)

O FS é caracterizado por acumular-se no interior das células, e quando excitados suas reações (tipo I e tipo II) geram trocas de energia que resultam em lesões celulares. Este fator leva a dois padrões de morte celular, apoptose e necrose. O primeiro remete a um evento programado fisiologicamente e o segundo é por estímulos externos tais como, a degradação de organelas, quebras de membranas celulares, com conseqüente ruptura celular (HUANG, L. *et al.*, 2012 e ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K., 2013).

1.5 Curcumina

A curcumina (CUR) é um pigmento originário do rizoma da *Curcuma longa*, popularmente conhecida como açafrão da terra (Figura 1.5). É pertencente à família Zingiberaceae, cujas espécies encontradas são utilizadas pela população como alimento, perfumes e corantes (NOORAFSHAN *et al.* 2013).



Figura 1.5 *Curcuma Longa* - Açafraão-da-terra. Fonte: PorPlanta, 2020.

Há milhares de anos, a raiz é utilizada no Oriente, na medicina tradicional e na culinária devido ao conhecimento sobre suas propriedades e seus mecanismos biológicos e sítios de ação da molécula são aspectos que vem sendo pesquisados (GUPTA *et al.* 2013).

A cúrcuma apresenta três principais pigmentos em sua composição: curcumina, bis-demetoxicurcumina, e demetoxicurcumina, no entanto o primeiro é o mais abundante na raiz. A Figura 1.6 apresenta a estrutura molecular desses curcuminóides.

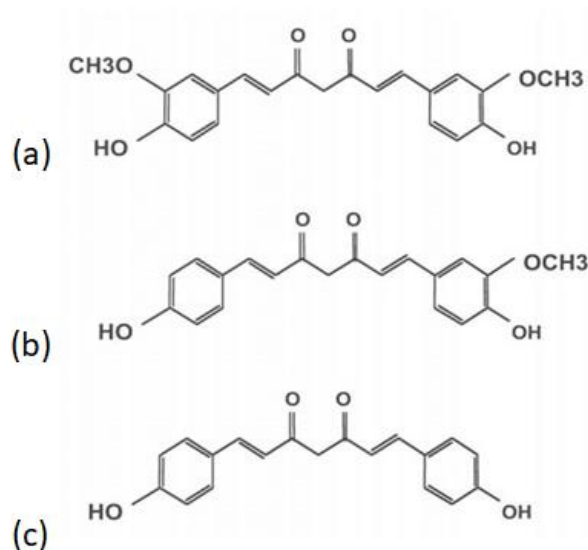


Figura 1.6 Estrutura molecular dos curcuminóides. (a) curcumina, (b) demetoxicurcumina e (c) bisdemetoxicurcumina. Fonte: MAZZARINO, 2013.

Quimicamente, a curcumina é denominada 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona, sua fórmula é $C_{21}H_{20}O_6$, contando em sua estrutura dois anéis fenólicos (Figura 1.6a) (CHIGNELL, 1994). Estudos mostram que a curcumina absorve luz na região azul, variando entre os comprimentos de onda de 400 a 480 nm, dependendo do solvente utilizado (CHIGNELL, 1994).

A curcumina é usada a partir do seu pigmento amarelo na indústria alimentícia como corante, tempero, conservante e também pode ser consumida pelos animais, já reportado por muitas pesquisas que investigaram sua toxicidade (SHARMA *et al.* 2004). Nos últimos anos, compostos à base plantas, extratos naturais ou derivados têm atraído muito a atenção da população científica. No caso dos curcuminóides, suas propriedades atuam em processos biológicas e farmacêuticas, como antioxidantes, anti-inflamatórias (MENON e SUDHEER, 2007) e antidiabéticas (HEWLINGS e KALMAN, 2017).

Segundo Srivastava *et al.* (2009) a curcumina atua também na proteção do sistema cardiovascular (quimioprotetor) mantendo as funções normais do miocárdio, e no sistema nervoso, auxilia em tratamentos da doença de Parkinson (MYTHRI *et al.* 2012). No entanto, a aplicação da curcumina é limitada devido à sua baixa solubilidade em água e biodisponibilidade (HU, 2015).

Na IFD, a curcumina foi descoberta como um FS potencial com funções antimicrobianas. Dovigo *et al.* (2011) investigaram o efeito antifúngico associando a curcumina com diferentes doses de luz em *C. albicans* alcançando uma redução de 85% das colônias. Segundo Paschoal *et al.* (2013), seus estudos utilizando curcumina apresentaram uma redução de 70% em culturas planctônicas de *Streptococcus mutans*.

1.6 Inativação Fotodinâmica aplicada ao controle de vetores

A aplicação de compostos fotossensíveis em insetos foi provavelmente sugerida por Barbieri em 1928, utilizando em seus estudos derivados de xanteno contra larvas de mosquitos (BARBIERI, 1928). Na década de 50, Schildmacher continuou seus estudos, demonstrando a eficiência dos corantes em larvas do gênero *Anopheles* e *Aedes* (SCHILDMACHER, 1950).

Ben Amor e Jori (2000) retomaram os estudos sendo os primeiros a utilizarem porfirinas e clorinas como fotoinseticidas. Desde então, o uso de sintéticos de porfirina e seus derivados estão sendo explorados para o controle de insetos vetores, como *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*.

Wohllebe (2009) mostrou o potencial de derivados naturais de clorofila (clorofilina e feoforbida) contra larvas de *Culex*. As larvas foram expostas a clorofilina por 4 horas. O valor de CL_{50} encontrado foi de 6,88 mg.L⁻¹. Lima (2016) investigou as propriedades fotodinâmica dos FSs extrato de clorofila, azul de metileno e eosina azul de metileno em larvas de *Ae. aegypti*.

Os FSs mais utilizados como fotoinseticidas são: clorofilas, clorofilinas e seus complexos de cobre, hematoporfirina IX (HpIX), ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), clorinas, Photogem® (DE SOUZA, 2015), entre outros. Uma das vantagens em utilizar essas moléculas está relacionada ao menor custo de produção, alta eficácia, baixo impacto ambiental e alto nível de segurança em humanos (ORMOND, 2013).

Aplicada a IFD, a CUR apresentou uma eficácia contra larvas de *Ae. aegypti*, estudos mais recentes mostraram que esse FS é capaz de eliminar cerca de 90% das larvas do *Ae. aegypti* quando expostas à luz natural (solar) em 48 horas (DE SOUZA, 2019). Em outro

estudo, de Souza *et al.* (2020) observaram que a CUR possuía propriedade ovicida e associada à sacarose e D-manitol, puderam apresentar melhores resultados.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo Geral

Desenvolver novas misturas a base de curcumina conjugada ao D-manitol, com a finalidade de obter formulação estável, economicamente viável e de fácil aplicação em criadouros de larvas do *Ae. aegypti*.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as formulações em diferentes proporções de curcumina e D-manitol através espectroscopia de absorção (UV-vis), espectroscopia infravermelho (FTIR), espectroscopia de fluorescência e microscopia confocal de fluorescência.
- Identificar a formulação mais solúvel através de ensaios de solubilidade em diferentes pH.
- Determinar a fotoestabilidade da formulação mais eficaz.
- Determinar as concentrações letais 50% (CL_{50-24h}) das novas formulações através de ensaios de eficácia em larvas *Ae. aegypti* da linhagem Rockfeller.
- Determinar o tempo de internalização e de eliminação das formulações no sistema digestório das larvas de *Ae. aegypti*.
- Analisar o crescimento microbiana em águas de criadouros artificiais contendo as formulações através da contagem de colônias bacterianas.
- Avaliar de risco em modelo animal (Zebrafish), através de ensaio de ecotoxicidade aguda.
- Investigar a persistência (atividade residual) das formulações de curcumina.
- Analisar o crescimento microbiana na aplicação da formulação 3 em condições simuladas de campo.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 Preparo e caracterização das formulações de curcumina em D-manitol

2.1.1 Preparo das formulações

O prepara das formulações foi realizado através da co-cristalização, um processo farmacêutico que sintetiza co-cristais, capaz de melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos (MCNAMARA, 2006; HICKEY, 2007).

No Laboratório de Química Bio-orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), de acordo com o protocolo descrito por Carmona-vargas, 2017.

Foram preparadas quatro formulações, denominadas 1, 2, 3 e 4 contendo o ativo de CUR nas seguintes proporções: 15 (1), 25 (2), 50 (3) e 75% (4) utilizando o D-manitol como excipiente. Em um Becker de 500 mL foram adicionados etanol (150 mL) e CUR (150, 250, 500 e 750 mg) respectivamente. Em seguida, a mistura real foi mantida em agitação magnética e aquecida até o início da ebulição do etanol. Após a completa dissolução da CUR foram adicionados D-manitol (850, 750, 500 e 250 mg) em água (50 mL), respectivamente. A nova mistura reacional foi mantida em aquecimento até a ebulição. Por fim, o solvente da mistura reacional foi evaporado utilizando um fluxo médio de nitrogênio gasoso e aquecimento (~ 70°C).

Após aproximadamente 10 minutos observou-se a completa evaporação do solvente e o aquecimento foi interrompido imediatamente (remoção do Becker da placa de agitação e aquecimento) evitando-se assim a fusão do D-Manitol. O sólido formado foi removido do Becker e acondicionado em frasco âmbar o qual foi mantido para secagem sob alto vácuo (5 mmHg) por 24 horas adicionais. As formulações (1-4) foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas nomeadamente UV-vis, fluorescência e FT-IR.

2.1.2 Espectroscopia UV-Vis

Para obtenção dos espectros de absorção das formulações (1, 2, 3 e 4), as amostras foram solubilizadas em água destilada (pH = 7) e mantidas em banho de ultrassom por 5

minutos. Em seguida, as soluções foram analisadas utilizando um espectrofotômetro UV-vis Varian Cary® (Varian Medical Systems, EUA), do Laboratório de Biofotônica do IFSC. A faixa de análise foi de 200 a 800 nm, a partir de uma solução estoque em meio aquoso na concentração de 1,5 mg.L⁻¹.

2.1.3 Espectroscopia de fluorescência

A solução estoque do item 2.1.2 foi utilizada para obtenção dos espectros de fluorescência das formulações (1, 2, 3 e 4). As soluções foram analisadas em um espectrofotômetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies), do Laboratório de Biofotônica do IFSC. A faixa de emissão foi de 500 a 620 nm, o comprimento de onda de excitação foi de 450 nm.

2.1.4 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Para a obtenção dos espectros de infravermelho, as formulações (1, 2, 3 e 4) no estado sólido, CUR (livre) e do D-manitol foram analisados diretamente em um espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR (acessório de ATR – refletância total atenuada), do Laboratório de Biofotônica do IFSC. A faixa de resolução foi de 650 a 4000 cm⁻¹, e os dados coletados foram transferidos e analisados no programa OriginPro.

2.1.5 Microscopia confocal de fluorescência

As imagens de fluorescência das formulações 1-4 foram realizadas por meio de Microscópio Confocal de Fluorescência invertido da Zeiss - LSM780 (Zeiss, Jena, Alemanha) do Laboratório de Biofotônica do IFSC, com excitação em 450 nm. Um filtro de passa-alta de 480 nm foi utilizado para eliminar a excitação do laser. As formulações foram utilizadas da mesma forma que do item 2.1.4.

Espectros de fluorescência foram avaliados para obter informações sobre a formação dos cristais de curcumina nas formulações. As imagens também auxiliaram na determinação da localização da curcumina e do D-manitol.

2.2 Estudo de solubilidade

Para avaliar o efeito do D-manitol na solubilidade da CUR em meio aquoso, o equivalente a 60 mg de CUR para cada formulação (1, 2, 3 e 4) e 15 mL de água em diferentes pHs 3, 7 e 11, foram adicionados em frascos do tipo falcon. As soluções foram homogêneas e levadas para uma incubadora com agitação (Heratherm Incubator - Thermo Scientific), onde foram agitadas em 200 rpm, por 1 h, ausência de luz e temperatura ambiente (25°C).

Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 4400 rpm por 10 min e filtradas usando um filtro de membrana de 0,45 µm. Os filtrados foram adequadamente diluídos com água e também analisados em relação a CUR (a 450 nm) com espectrômetro UV-vis. Os espectros foram obtidos de acordo com a curva de calibração realizada anteriormente.

2.3 Fotoestabilidade da formulação

A formulação 3 foi selecionada devido ao seu melhor resultado frente os testes de eficácia contra larvas de *Ae. aegypti* (descritos no item 3.4.1). Uma solução estoque foi preparada com concentração de 10 mg.L⁻¹. A equação da reta foi através das concentrações (20, 40, 80, 100 e 120 mg.L⁻¹) da solução estoque e medida no espectrômetro UV-Vis.

Para o estudo de fotodegradação foram utilizados recipientes plásticos com água (250 mL) com iluminação utilizando lâmpada fluorescente com a intensidade de 0,5 mW/cm² por 24 h. Durante esse período, alíquotas da solução foram retiradas nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 24 h e levadas para medir a absorvância de cada amostra em um espectrômetro UV-Vis na faixa de 200 a 800 nm. O perfil da CUR foi determinado pelo ajuste exponencial do pico de absorvância a 450 nm, em função do tempo. Os resultados foram analisados no programa OriginPro.

2.4 Manutenção das larvas

As larvas do *Ae. aegypti* foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil. Os estudos biológicos foram conduzidos no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC-USP).

As fitas com os ovos (Figura 2.1), foram colocadas em bandejas plásticas contendo 2 litros de água dechlorada, em sala climatizada à 27 °C com fotoperíodo (12 horas claro e 12 horas escuro). Anteriormente, a água foi aquecida a 30 °C e grânulos de fermento biológico foram adicionados para garantir uma eclosão homogênea.



Figura 2.1 Bandeja plástica branca para eclosão dos ovos (substrato para oviposição: fita de papel filtro) de *Ae. aegypti*.

Após a eclosão, as larvas foram alimentadas diariamente com ração AlconBASIC® MEP 200 Complex (Alcon, Santa Catarina, Brasil) até atingirem o 3° estágio de desenvolvimento, para a realização dos ensaios de inativação fotodinâmica para a obtenção da CL₅₀.

2.4.1 Ensaios de eficácia

Para os ensaios de eficácia foram realizados de acordo (WHO, 2005), com adaptações. Foram utilizados recipientes plásticos, com volume de 50 mL de água de clorada com 15 larvas, em triplicata (Figura 2.2). As concentrações de CUR das formulações variaram entre 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 mg.L⁻¹. Além dos grupos tratados, foram preparados três grupos controle: controle luz (somente água), controle escuro e controle D-manitol (correspondente à maior concentração de D-manitol). Para os ensaios, foram utilizadas lâmpadas brancas fluorescentes de 18W, irradiância de 0,5 mW/cm², com fotoperíodo de (12:12h) (claro:escuro). Após o período de 24 horas, a mortalidade larval foi registrada e os valores da concentração letal 50% (CL₅₀) foram calculados no OriginPro.

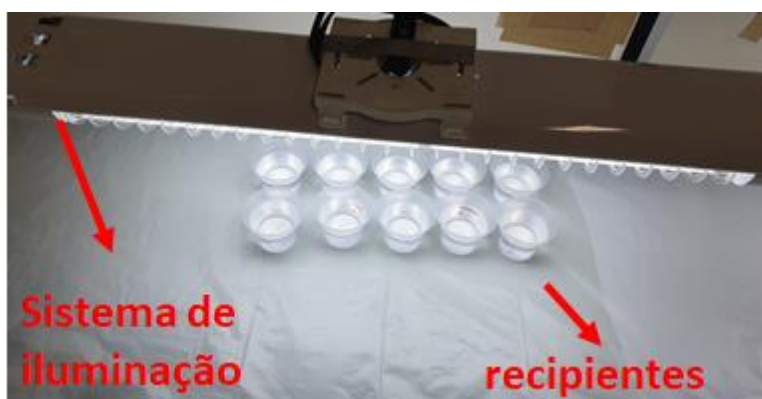


Figura 2.2 Representação dos ensaios de eficácia - recipientes com água destilada e lâmpadas fluorescentes.

2.5 Determinação do tempo de internalização e eliminação das formulações em larvas de *Ae. aegypti*

Para determinar o tempo de internalização (TI) e o tempo de eliminação (TE) das formulações 1, 2, 3 e 4 no trato digestório das larvas de *Ae. aegypti*, foram realizadas imagens via microscópio óptico (Nikon H600L), com uma lente de aumento (4X). A mesma solução estoque do item 2.1.2 preparadas concentrações CL₂₅ (0,02; 0,015; 0,005 e 0,01 mg.L⁻¹) para as formulações 1,2, 3 e 4 respectivamente.

Em seguida foram utilizadas 10 larvas para cada concentração, transferidas para recipientes plásticos com 20 mL de água destilada e adicionou-se a solução das formulações

correspondentes. Para o TI foram utilizados: 0 (larvas controle), 5, 15, 30 e 60 minutos após o contato com as formulações. Para o TE, as larvas passavam pelo TI de 60 minutos, em seguida, transferidas para novos recipientes plásticos com apenas água destilada (20 mL) e não houve alimentação. Os tempos foram definidos após a transferência e exposição as formulações, sendo eles: 30 minutos, 2 horas, 1, 2, 4, 6 e 8 dias.

Uma larva de cada formulação foi transferida do recipiente plástico com pipeta de Pasteur, colocada sobre uma lâmina de microscópio e o excesso do líquido foi retirado com um papel toalha para que as larvas se mantivessem imóveis para os registros das imagens.

2.6 Ensaios de proliferação microbiana em criadouros artificiais

Visto que o D-manitol é um atrativo não apenas para as larvas de *Ae. aegypti* mas também para microbiota presente na água de criadouros artificiais, foram realizados ensaios em laboratório para avaliar a proliferação de microrganismos pré (0 horas) e pós tratamento (2, 7 e 14 dias).

Em colaboração com a Vigilância Epidemiológica de São Carlos - SP, os agentes epidemiológicos cederam criadouros artificiais móveis encontrados na cidade de São Carlos para a realização dos ensaios de proliferação microbiana. As amostras de água desses criadouros foram fracionadas em 50 mL e colocadas em recipientes plásticos para a divisão dos grupos experimentais, em triplicata. As condições avaliadas foram: controle luz, controle D-manitol e formulações (1-4).

Alíquotas de 100 μ L das amostras de água foram retiradas de cada recipiente e adicionadas em microtubos de plástico contendo 900 μ L de solução salina tamponada (PBS) para homogeneização. Em seguida, diluições seriadas foram realizadas e o plaqueamento feito em placas de Petri contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI). As placas foram divididas em seis partes iguais, sendo que cada parte recebeu 17 μ L de cada diluição, plaqueados pelo método de espalhamento. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados obtidos foram, expressos em log UFC/mL.

2.7 Avaliação do risco em modelo animal

O teste de toxicidade aguda foi realizado com organismos adultos (fêmeas e machos) da espécie *Danio rerio* (Zebrafish), peixe de água doce, originário da Ásia, pertence à família Cyprinidae. Essa espécie foi escolhida por ser de fácil manutenção, aquisição, baixo custo e ter metodologia bem estabelecida para testes de toxicidade aguda de curta duração.

Os exemplares foram mantidos no Laboratório de Biofotônica (IFSC), na Universidade de São Paulo, campus de São Carlos e os ensaios foram realizados de acordo com protocolo estabelecido pela OECD (2005). O cultivo foi realizado em aquários de 50L (Figura 2.3), mantendo sempre 1 g de peixe por litro nas seguintes condições: água declorada, condutividade de 500 μ S, pH entre 7-7,5, temperatura entre 26-27 °C e fotoperíodo 12 h luz/ 12 h escuro. Os peixes foram alimentados diariamente através de alimentador automático (Hopar Automático H-9000) com ração comercial (Tetramin[®]).

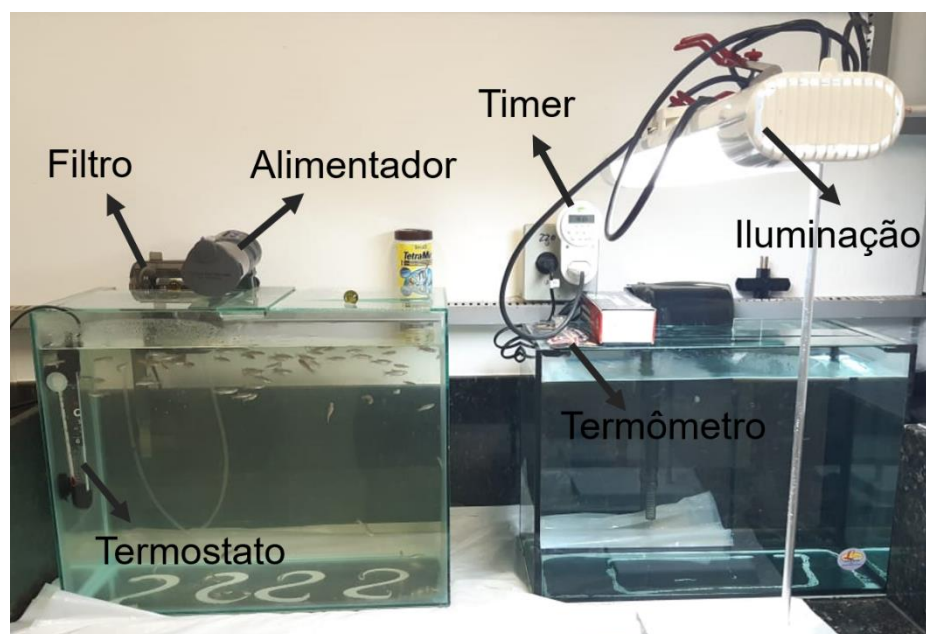


Figura 2.3 Aquários de aclimação de *Danio rerio* (Zebrafish) – filtro, termostato, termômetro, timer de fotoperíodo e iluminação.

Todos os exemplares foram expostos a essa substância para a determinação da concentração letal a 50% dos organismos (CL_{50-96h}). Por ter obtido melhor desempenho na atividade larvicida, a formulação 3 foi a escolhida para os ensaios de toxicidade aguda em *D.*

rerio. Para isto, os testes foram montados em Becker de vidro (Figura 2.4), com capacidade para 2 L e os peixes (n=5) foram expostos a cinco concentrações: 7,2, 14,4, 28,8, 57,6 e 100 mg.L⁻¹. Os peixes foram mantidos por 96 h em condições estáticas e a cada 24 horas (24, 48, 72, e 96 h) a mortalidade e os parâmetros da água (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) foram monitorados. Os controles (sem a curcumina) foram mantidos em meio a 100 mg.L⁻¹ (concentração máxima testada). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



Figura 2.4 Ensaio de toxicidade aguda em *Danio rerio* (Zebrafish). Um sistema de aeração foi montado com o auxílio de bombas, mangueiras de ar e pedras porosas.

O uso dos exemplares de *D. rerio* neste estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo (CEUA/IFSC) na reunião de 04/01/2021, protocolada sob o CEUA nº 6242301120.

2.6 Atividade larvicida e investigação da persistência em aplicação de campo simulado

A formulação 3 foi escolhida por apresentar um bom desempenho nos experimentos em condições de laboratório. Os ensaios de persistência foram realizados de acordo com o Boletim e Desenvolvimento da Embrapa (VILARINHOS et al., 2003).

Os testes foram conduzidos em ambiente aberto, utilizando caixas d'água de fibra de vidro com capacidade para 100 litros de água. Essas caixas foram dispostas em dois grupos:

grupo 1, cujas caixas permaneceram abertas (permitindo a penetração da luz direta) e, grupo 2, cujas caixas foram permaneceram parcialmente fechadas ao longo do experimento, simulando um ambiente sombreado (ambiente comum aos criadouros de *Ae. aegypti*) (Figura 2.5).



Figura 2.5 Ensaio de campo simulado com caixas d'água. À direita: caixas do grupo 1 que permaneceram abertas permitindo 100% a entrada de luz solar. À esquerda: caixas do grupo 2, cujas caixas tiveram 50% da luz bloqueada, simulando assim um ambiente sombreado.

Inicialmente, as caixas foram preenchidas com água da torneira, permanecendo sob aclimatação por 24 horas. As caixas receberam três concentrações de curcumina 25, 15 e 10 mg.L⁻¹ e três caixas (para cada grupo) foram mantidas como caixas controle. A formulação 3 foi aplicada simultaneamente à adição de 30 larvas por caixa. A reposição das larvas aconteceu diariamente (Figura 2.6) até que as formulações perdessem o efeito. As caixas foram monitoradas diariamente a mortalidade larval e formação de pupas (controle).



Figura 2.6 Adição das larvas de *Aedes aegypti* (30 larvas) às caixas d'água.

2.8 Análise da proliferação microbiana em aplicação de campo simulado

Amostras de água de cada grupo foram avaliadas quanto ao aumento da microbiota durante a realização do ensaio de campo. Para isso, alíquotas de 1 mL foram coletadas de cada grupo e transferidas para microtubos.

As coletas foram realizadas nos dias 1, 2, 3, 5, 8, 14 e 20 durante a execução do ensaio de campo. Todas as amostras foram levadas ao laboratório de microbiologia para a realização do processamento. Para a realização das diluições seriadas, alíquotas de 100 μL de cada amostra foram transferidas para microtubos contendo 900 μL PBS. Posteriormente, todas as diluições foram plaqueadas em placas de Petri contendo ágar BHI.

As placas foram divididas em quadrantes, e cada quadrante recebeu 25 μL , que foram plaqueados pelo método de espalhamento. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/mL.

2.9 Análises Estatísticas

Os dados de mortalidade larval foram submetidos à análise de Probit para estimar os valores de CL_{50-24h} e outros parâmetros (intervalo de confiança de 95%, X^2 , grau de

liberdade) usando o programa OriginPro. Os dados microbiológicos e a mortalidade larval média foram analisados por ANOVA (one-way) e teste Tukey ($p < 0,05$), com a finalidade de determinar significância entre o controle e os grupos tratados.

Capítulo 3 – Resultados e Discussões

3.1 Caracterização das formulações de curcumina em D-manitol

3.1.1 Espectros de absorção das formulações de curcumina

A Figura 3.1 representa o espectro de absorção da curcumina em etanol (livre) e das formulações 1, 2, 3 e 4 em água destilada. A ausência do D-manitol na Figura 3.1 é devido o mesmo não apresenta absorbância. A CUR em etanol, apresentou uma absorção máxima em

430 nm e as formulações apresentaram um deslocamento para o vermelho, com absorção máxima em 450 nm.

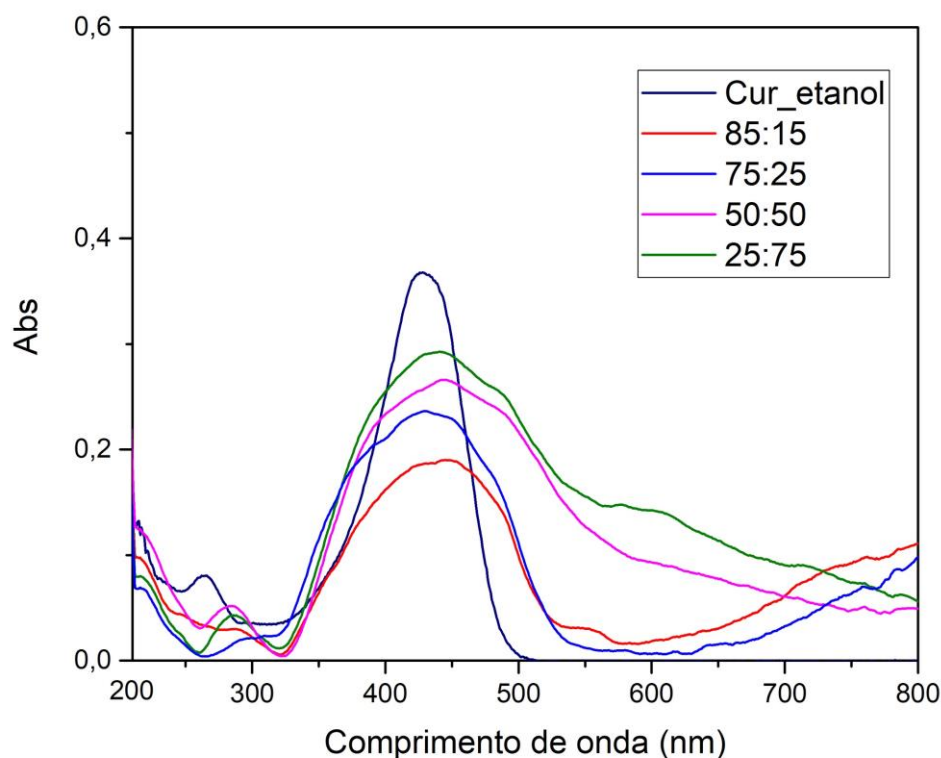


Figura 3.1 Espectros de absorção: cur_etanol = curcumina livre, 85:15 = formulação 1, 75:25 = formulação 2, 50:50 = formulação 3 e 25:75 = formulação 4.

A CUR possui a propriedade de absorver luz na região do azul, podendo variar dependendo do solvente, visto que as propriedades espectrais da curcumina estão relacionadas a natureza do solvente em que está incorporada (CHIGNELL, 1994). Em etanol, o pico máximo de absorção da curcumina foi de 450 nm e em comparação com as formulações, foi possível identificar um desvio para o vermelho, em cerca de 20 nm. Esse

Esse pequeno desvio gerado pelas formulações foi provavelmente causado pelo D-manitol presente ser mais polar nas formulações (de OLIVEIRA, 2008). Isso foi observado por Chignell e seus colaboradores (1994), que avaliaram a CUR em diferentes solventes, como etanol, tolueno e acetonitrila observaram esse desvio.

3.1.2 Espectros de fluorescência das formulações de curcumina

A CUR em água destilada (pH = 7) excitada a 450 nm, exibiu uma fluorescência máxima no comprimento de onda 558 nm (Figura 3.2). No entanto, as demais formulações apresentaram um desvio para o azul, com a fluorescência máxima entre 541 e 542 nm (Figura 3.2).

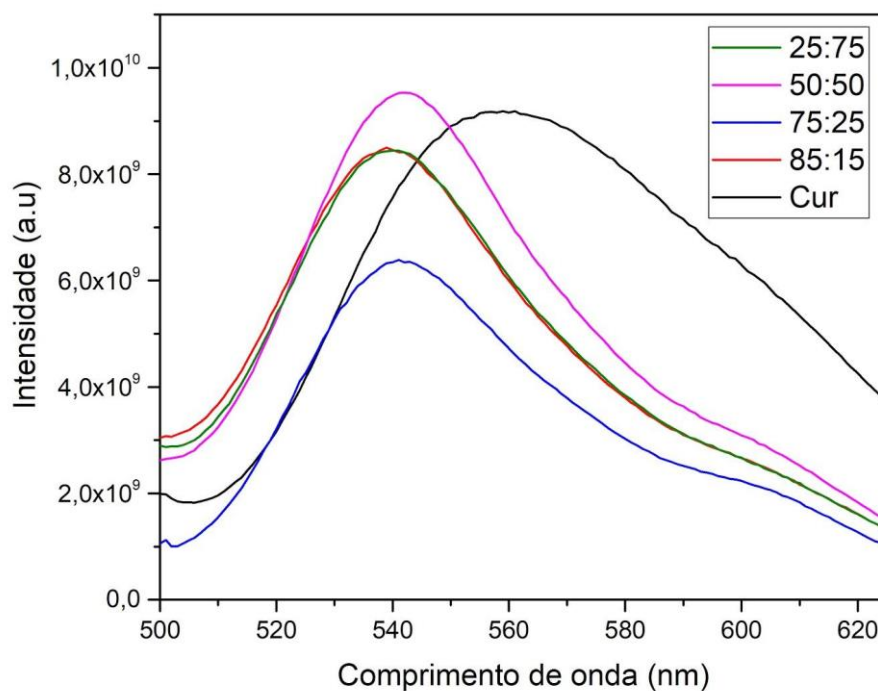


Figura 3.2 Espectros de fluorescência: cur = curcumina, 85:15 = formulação 1, 75:25 = formulação 2, 50:50 = formulação 3 e 25:75 = formulação 4.

A adição do D-manitol nas formulações resultou em um pico de fluorescência em menor comprimento de onda em comparação com a CUR em água, gerando o desvio para o azul. Segundo Tapal (2012), a mudança no pico máximo de fluorescência indica que as moléculas de CUR estavam polares e passaram para situação de menor polaridade. Este ocorrido já foi relatado por outros trabalhos, porém em casos que a CUR é associada com proteínas como caseína α S1, micelas de caseína e albumina sérica humana (SAHU et al., 2008, SNEHARANI et al., 2009, LEUNG et al., 2009).

Em casos de açúcares (carboidratos), Wong (2019) e colaboradores analisaram a fluorescência de cápsulas a base de CUR induzida por açúcar e dopamina. Seu composto apresentou um desvio para o vermelho, em relação a CUR, todavia a CUR que eles utilizaram foi dissolvida em etanol. Segundo os mesmos, a frutose aumentou o sinal da hidrofobicidade e das ligações de hidrogênio proporcionando esse deslocando dos picos de emissão para o vermelho (DUTTA et al., 2013).

3.1.3 Espectros de infravermelho das formulações de curcumina

Os espectros de infravermelhos da CUR (linha verde), D-manitol (linha marinho), formulação 85:15 (1) (linha rosa), formulação 75:25 (2) (linha azul), formulação 50:50 (3) (linha vermelho) e formulação 25:75 (4) estão apresentados na Figura 3.3.

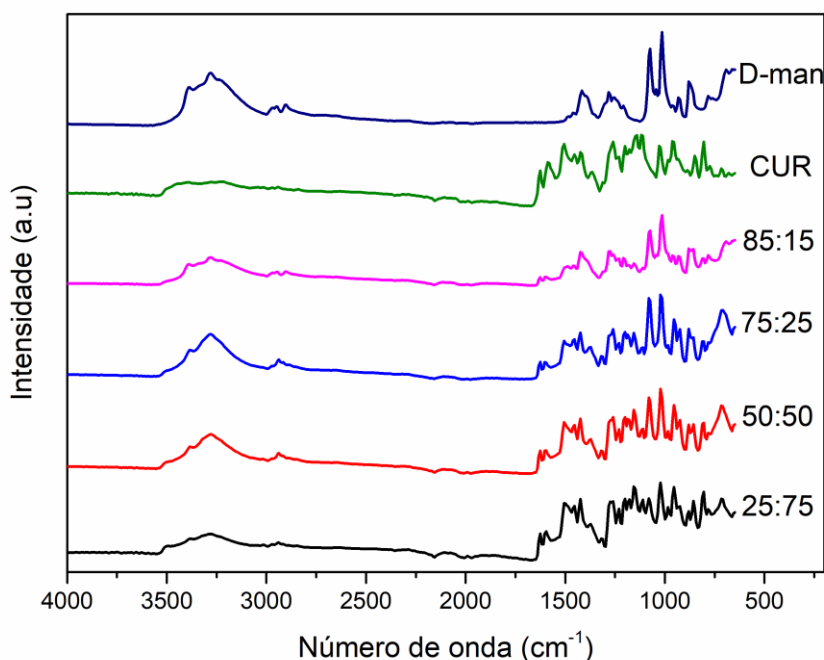


Figura 3.3 Espectros de infravermelho: CUR = curcumina, D-man = D-manitol, 85:15 = formulação 1, 75:25 = formulação 2, 50:50 = formulação 3 e 25:75 = formulação 4.

O espectro da CUR apresenta picos em: 3508 cm^{-1} (vibração de alongamento OH fenólico), 1628 cm^{-1} (porção aromática C = C alongamento), 1597 cm^{-1} (vibrações de

alongamento do anel de benzeno), 1509 cm^{-1} (C = O e C = vibrações C), 1428 cm^{-1} (vibrações de flexão CH olefínicas), 1278 cm^{-1} (vibrações de alongamento C – O aromáticas), 1024 cm^{-1} (vibrações de alongamento C – O – C).

O espectro do D-manitol apresenta picos em: 3250 cm^{-1} (vibrações de alongamento dos grupos OH), 2940 cm^{-1} (vibração de alongamento do grupo funcional CH) (SARI, et al., 2013). As bandas de transmissão características dos carboidratos aparecem em 1416, 1080 e 1047 cm^{-1} (JESUS, 2010 e ZHICHAO, 2015).

Ao comparar os espectros da CUR, D-manitol e das formulações, todos os picos de absorção da CUR e o D-manitol observados nas formulações. O enfraquecimento nas vibrações do D-manitol foi observado conforme a proporção em que o mesmo diminuía nas formulações. A formulação 4 apresentou os picos de absorção mais próximos a CUR do que o D-manitol, por apresentar a maior proporção de CUR em relação as demais.

3.1.4 Microscopia confocal de fluorescência

Para investigar a interação da CUR com D-manitol, avaliamos por microscopia confocal de fluorescência. As imagens de fluorescência nos auxiliaram na visualização da disposição da CUR e do D-manitol após a co-cristalização (Figura 3.4).

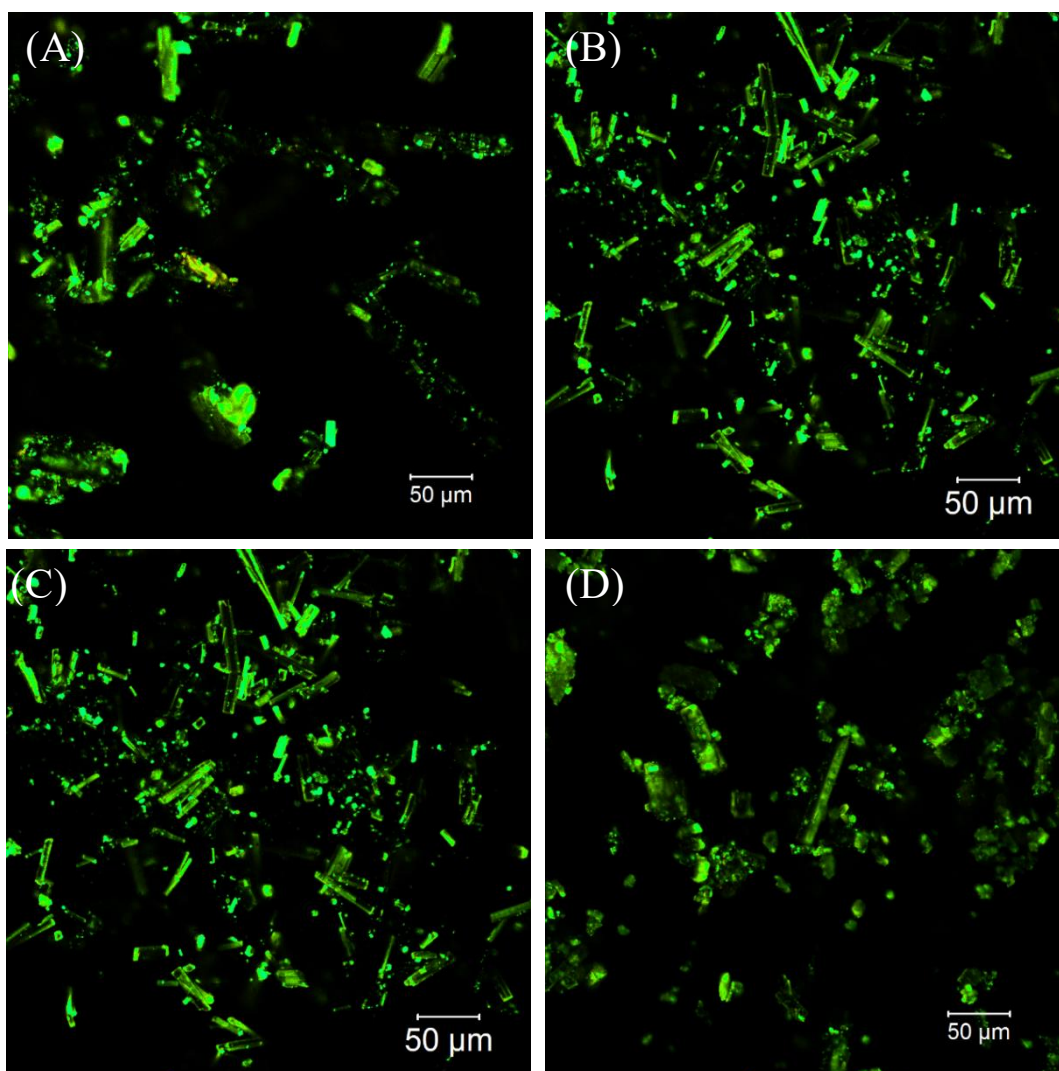


Figura 3.4 Microscopia confocal das formulações. A - 85:15 = formulação 1, B - 75:25 = formulação 2, C - 50:50 = formulação 3 e D - 25:75 = formulação 4.

As imagens mostraram que a CUR estava presente em toda amostra das formulações, no entanto, a CUR apresentava uma diminuição na formação de cristais à medida que sua proporção foi aumentando em relação à quantidade D-manitol. (Figura 3.4A – Figura 3.4D). Essa pode estar relacionada a uma competição de cristalização, onde o mais saturado pode cristalizar primeiro.

Foi possível observar também pequenos aglomerados de curcumina livre devido a diferença nos espectros de fluorescência na Figura 3.5A.

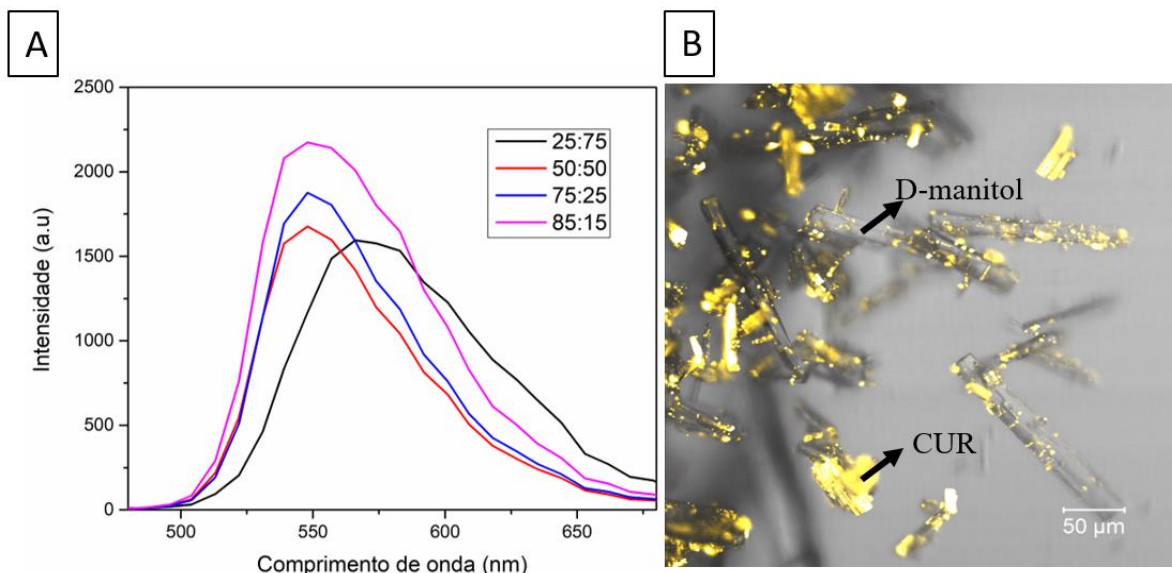


Figura 3.5 Espectros de fluorescência das formulações no estado sólido (A) e Disposição e organização dos cristais das formulações (B).

Por outro lado, podemos observar que nas formulações, maior intensidade de fluorescência na região superficial dos cristais, indicando que na co-cristalização a organização da CUR torna do D-manitol em uma formação heterogênea (Figura 3.5B). Essa disposição também foi observada por Shebis (2020) e seus colaboradores utilizando CUR e vanilina, porém diferente do presente trabalho, com uma conformação mais ordenada.

3.2 Ensaios de solubilidade das formulações

Devido à sua natureza hidrofóbica, a CUR é pouco solúvel em água. O estudo de solubilidade foi realizado para entender se a CUR e as formulações apresentadas neste estudo mostraram diferentes perfis de solubilidades em pH distintos. A Figura 3.6 apresenta um diagrama com os valores da solubilidade das formulações 1, 2, 3 e 4 e da CUR em soluções com água em pH (3, 7 e 11).

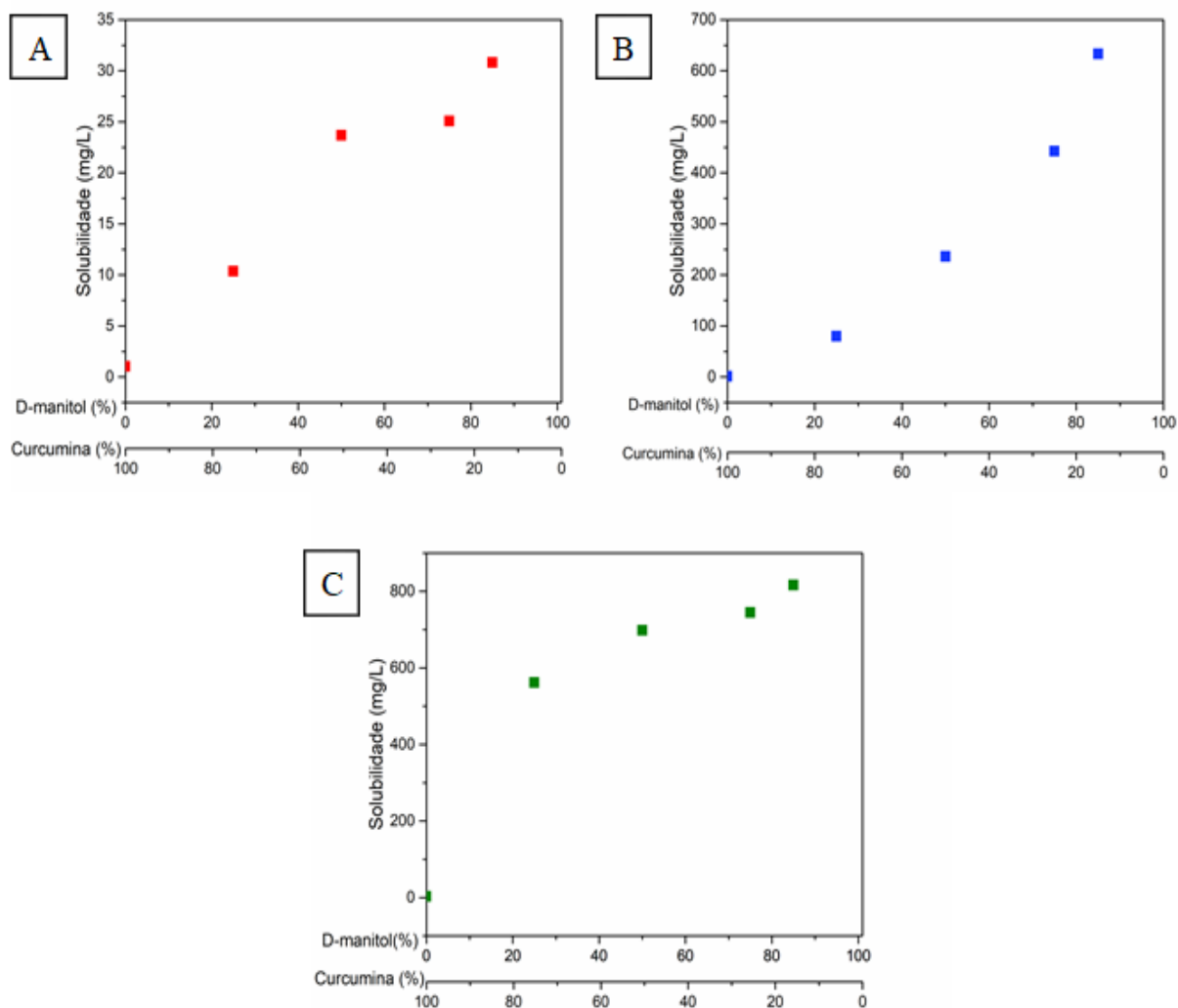


Figura 3.6 Diagrama da solubilidade em comparação com a proporção de D-manitol nas formulações de Curcumina. A- pH 3; B- pH 7; C- pH 11.

Segundo a Figura 3.4, a solubilidade da CUR e das formulações estão aumentando conforme o pH da água se aproxima de condições alcalinas (pH 11), apresentando 816,42; 744,37; 698,24; 561,7 e 2,7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as formulações 1, 2, 3, 4 e CUR em solução aquosa respectivamente. Isto pode ocorrer devido à desprotonação de grupos hidroxila em sua estrutura química (ABOUDIABO, 2020). No entanto, a CUR tem uma ação mais rápida neste ambiente, e pode ser rapidamente degradada nessas condições.

Em ambientes neutros (pH 7), as formulações 1,2,3 e 4 apresentaram valores médios em comparação aos demais pHs, com: 633,08; 442,57; 235,88 e 79,66 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a CUR em

solução aquosa apresentou a metade da concentração no pH 11, com valor de $1,34 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Finalmente, as formulações no pH 3 apresentaram as menores concentrações, indicando uma menor solubilidade. Os valores foram 1,05 para solução aquosa de CUR, 30,8; 25,08; 23,66 e $10,35 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as formulações 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

A baixa solubilidade e biodisponibilidade da CUR dificulta sua ação no meio aquoso. Frati (1997) e seus colaboradores já haviam observado que a adição do D-manitol ao seu composto aumentava a eficiência. O presente trabalho também segue essa tendência pois conforme a proporção de D-manitol foi aumentando nas formulações (independente do pH), observou maior solubilidade da CUR. Assim como Song (2016), que utilizou succinato de d - α -tocoferil polietilenoglicol 1000 (TPGS), a medida que a concentração do TPGS aumentava, a solubilidade da CUR em meio aquoso também elevava.

3.3 Fotodegradação em luz fluorescente

A curva padrão da formulação 3 foi construída através da obtenção de espectros de absorção no UV-Vis em diferentes porcentagens (20, 40, 80, 100 e 120 mg.L^{-1}) (Figura 3.7).

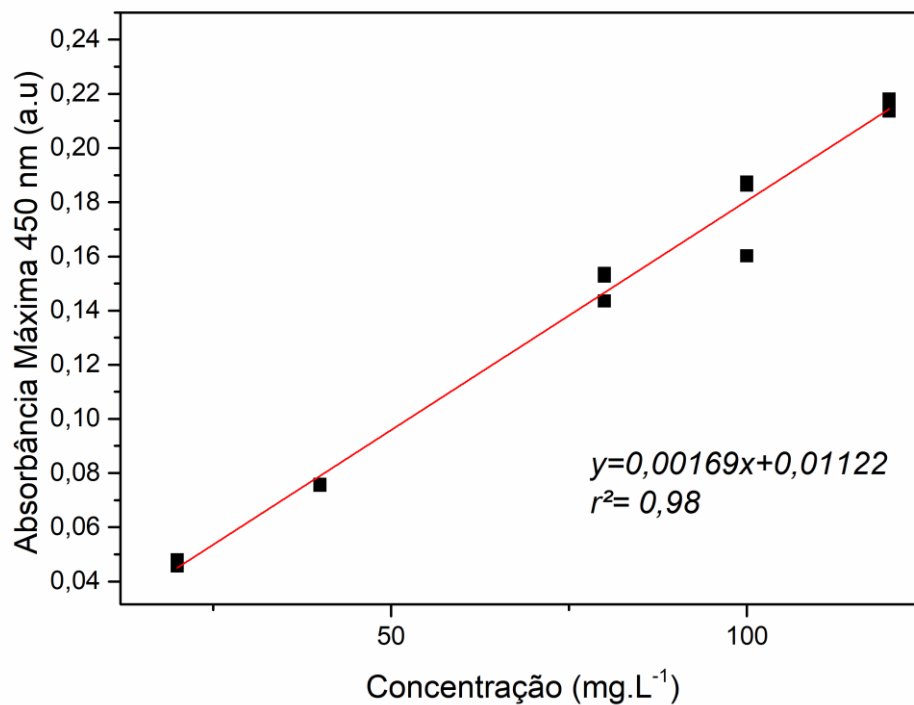


Figura 3.7 Curva padrão das formulações, com base na absorbância máxima em 450 nm. Inseto: Equação linear da reta ajustada, com respectivo fator de ajuste r^2 .

A formulação 3, que apresentou o melhor desempenho larvicida contra larvas do *Ae. aegypti*, foi fotodegradada durante 24 horas utilizando lâmpadas fluorescentes. A Figura 3.8 representa o decaimento na porcentagem de absorção durante 24 h e a Tabela 3.1 apresenta os valores referentes.

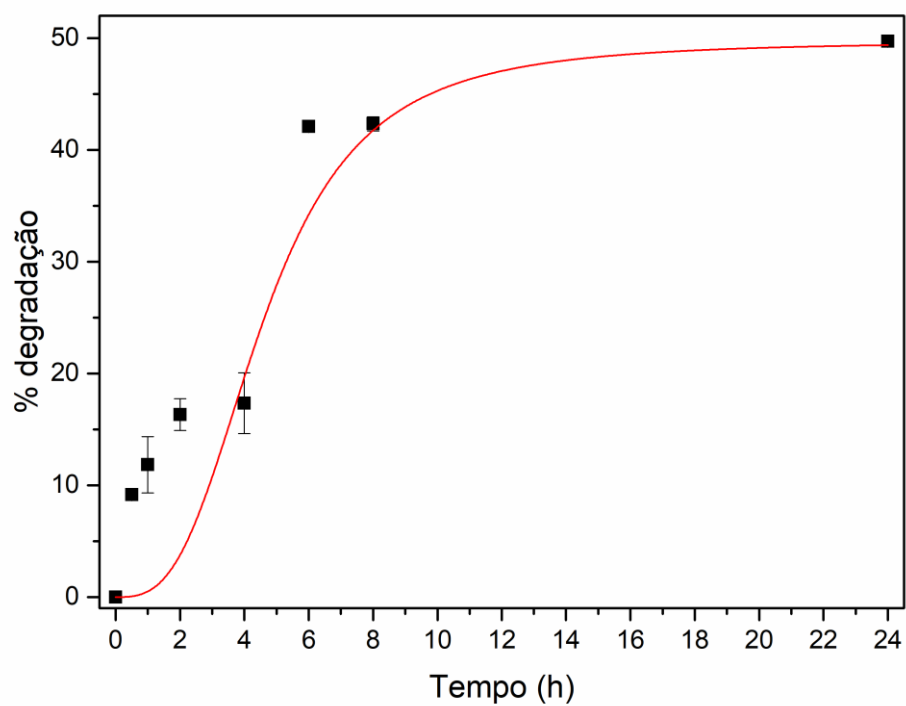


Figura 3.8 Porcentagem da degradação da formulação 3 durante 24 h (absorção em 450 nm).

Tabela 3.1 Porcentagem da degradação da formulação 3 no período de 24 horas

Tempo (h)	Abs (450nm)	Concentração (mg.L⁻¹)	% Degradado
0	0,215	18,98	0
0,5	0,2	17,25	9,14
1	0,19	16,73	11,83
2	0,18	15,9	16,32
4	0,17	15,7	17,33
6	0,13	11	42,33
8	0,12	10,95	42,08
24	0,11	9,55	49,71

Na primeira hora, a degradação chega a mais de 9%, aumentando gradualmente. Entre 4 e 6 horas ocorre um aumento no tempo de degradação, chegando a 42% e após 24 horas se mantém a pouco mais de 49%. A fotodegradação da CUR ocorre devido vários processos (fotofísicos e fotoquímicos) na presença de O₂, tornando inevitável a formação de EROs e/ou o oxigênio singlete. Essas moléculas geram reações oxidativas na estrutura molecular da CUR, podendo promover produtos de degradação.

De Souza (2019b) demonstrou em seus estudos o potencial na CUR associada ao d-manitol em criadouros reais do *Ae. aegypti*. A formulação 3 deste trabalho, não era totalmente solubilizada na solução, podendo ser provável que tenha ocorrido um processo de degradação e solubilização da CUR devido aos agregados formados vide (Figura 3.5)este pode ser o motivo de que em outros trabalhos a fotodegradação da CUR apresenta menores taxas.

3.4 Determinação das concentrações letais

3.4.1 Eficácia larvicida das formulações

As formulações desenvolvidas no item 2.1 foram preparadas afim de avaliar a eficácia sobre às larvas de *Aedes aegypti*. Determinou-se a concentração letal para mortalidade de 50% da população (LC₅₀) das formulações através dos cálculos realizados pelo resultado da Figura 3.9 e da curva de mortalidade.

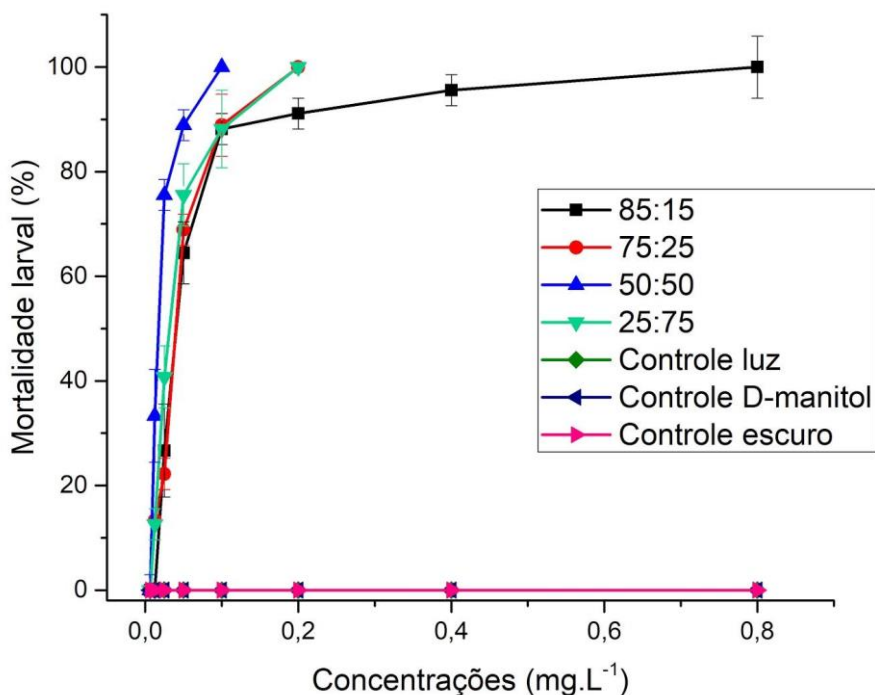


Figura 3.9 Comparação da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em 24 horas, após realização dos bioensaios com as formulações de curcumina.

As formulações apresentaram concentrações letais com valores semelhantes a CL_{50} descrita por de Souza (2019) com a formulação na proporção 99% de D-manitol e 1% de curcumina (99:1), porém seus experimentos foram realizados em condições de iluminação natural (luz solar), em média cerca de 680 vezes maior a intensidade de luz do que a do presente trabalho.

Segundo os dados mostrados na Tabela 3.2 e análises estatísticas entre as formulações, houve uma diferença significativa ($p \geq 0,05$), e a formulação 3 foi a apresentou um melhor desempenho em relação às demais, com o valor de CL_{50-24h} ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$). Este valor é menor do que em outros artigos que estudaram atividade larvicidas de óleos essenciais em larvas de *Aedes aegypti*, variando as CL_{50} de 2 a 10 mg.L^{-1} (FURTADO, 2005).

Tabela 3.2 Concentração letal (LC₅₀) das formulações (1-4) em larvas de *Aedes aegypti* expostas por 24 horas

Formulações	LC50-24h (mg.L ⁻¹)	95% limite de confiança LC50 inferior superior	Modelo ajuste	X ² (df)
85:15	0,04	(0,01-0,14)	y=7,96+2,12x	0,13733 (4)
75:25	0,03	(0,00-0,13)	y=9,02+2,72x	0,32068 (5)
50:50	0,01	(0,00-0,79)	y=9,02+2,07x	0,4857 (5)
25:75	0,02	(0,02-0,11)	y=8,98+2,59	0,27594 (5)

LC₅₀, concentração letal 50% mortalidade; χ^2 , chi-square; d.f: graus de liberdade.

Outros extratos de plantas mostraram CL₅₀ entre 15 e 30 mg.L⁻¹, Leite et al. (2009) obteve 8,87 mg.L⁻¹ com o extrato etanólico da *P. americana*, Costa et al. (2005) encontrou efeitos tóxicos dos extratos de *Syzigium aromaticum*, *Lippia sidoides* e *Hyptis martiusii*, com os valores de 18,5, 19,5 e 21,4 mg.L⁻¹. E mais recente, Martins et al. (2020) apresentou a CL₅₀ de óleo essencial da *Pimenta dioica Lindl.* (26,91 mg.L⁻¹).

Além disso, a formulação 3, provou ser mais eficiente com valores de CL50 menores do que de outros FSs encontrados na literatura, mesmo não apresentando a melhor solubilidade em meio aquoso. Lima et al. (2018) avaliaram a mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* frente a atividade da eosina azul de metileno, seus valores variaram de 5 a 50 mg.L⁻¹ com iluminação em LEDs brancos. Dreyer (2009) comparou três FSs, azul de metileno, clorina a e rosa bengala e apenas a rosa bengala se aproximou dos valores mostrados neste trabalho.

3.5 Tempo de internalização e eliminação da curcumina em larvas do *Ae. aegypti*

3.5.1 Tempo de internalização (TI)

O TI das formulações 1, 2, 3 e 4 foram observados nas estruturas anatômicas das larvas de *Ae. aegypti* (Figura 3.10). Sem exposição às formulações (bloco preto), formulação 1 (bloco vermelho), formulação 2 (bloco azul), formulação 3 (bloco rosa) e formulação 4 (bloco verde).

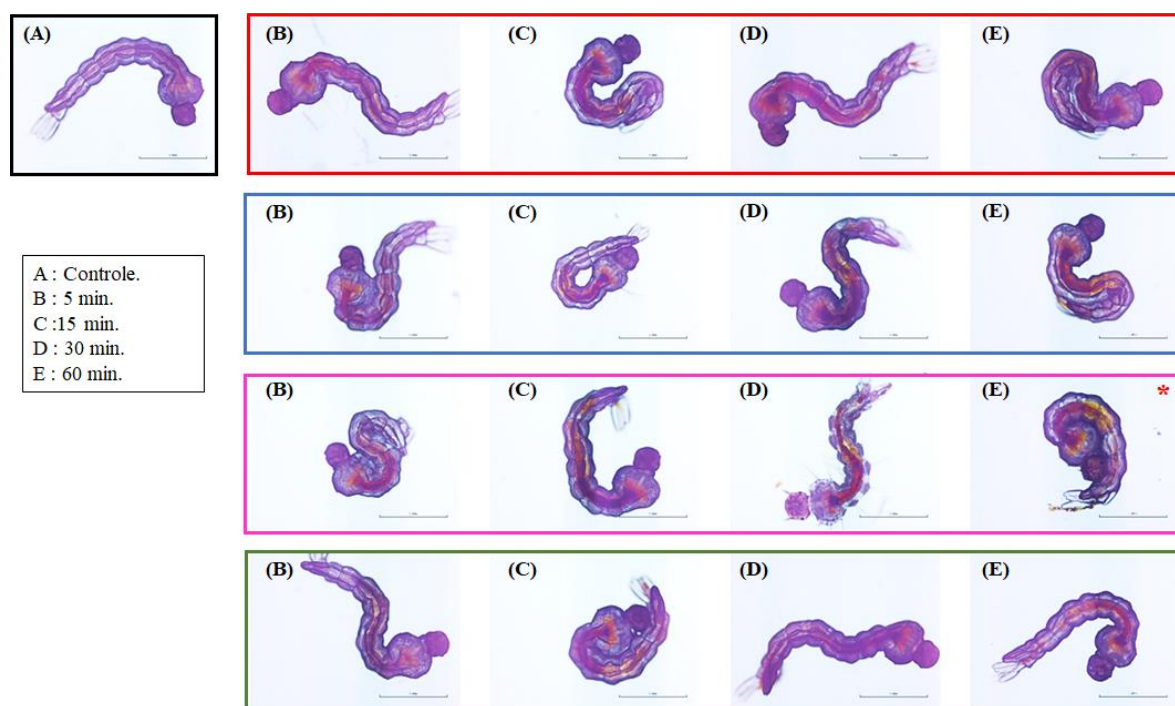


Figura 3.10 Internalização das formulações 1, 2, 3 e 4 na concentração de CL_{25} no sistema digestório de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*. (*) diferença no tempo de internalização.

A membrana peritrófica possui uma função de compartimentalização entre as células epiteliais e o lúmen (camada acelular que protege o intestino) (BARRETO, 2006). A coloração das formulações partiu de um amarelo escuro até o vermelho, isso porque o sistema digestório da larva pode variar o seu pH de 5 até 11 (ARRUDA, 2020). Nota-se que a internalização das formulações (1-4) foi gradual conforme ao longo tempo de exposição (B-E). Além disso, o processo de interação das formulações iniciou-se no tórax, em uma

estrutura denominada ceco gástrico (região anterior do intestino médio da larva) seguindo o acúmulo das mesmas para os demais segmentos do abdômen.

Em todas as formulações houve a pigmentação do trato digestório da larva, sendo 5 minutos (Figura 3.10B) o tempo inicial de exposição. Em relação as demais formulações, A 3 neste tempo (Figura 3.10B bloco rosa), foi a que apresentou uma melhor distribuição nas larvas atingindo região anterior e região media. Em contrapartida as demais formulações (1,2 e 4) atingiram apenas a região anterior.

O TI das formulações 1, 2 e 4 foram de 60 minutos, similar aos resultados encontrado no estudo de Lima (2016), utilizando como FSs utilizados o azul de metileno e eosina azul de metileno. Por outro lado, ainda em comparação com os FSs de Lima (2016), a formulação 3 apresentou um menor TI, 30 minutos. Neste mesmo tempo, foi possível observar o início do processo de eliminação da formulação 3 com destaque para, extrusão do intestino e da membrana peritrófica (Figura 3.10E bloco rosa). Esse comportamento é caracterizado como um mecanismo de defesa da larva frente a xenobióticos.

Essas observações nos levam a hipótese de que a formulação 3 apresentou melhor atividade fotolarvicida devido a sua rápida internalização e distribuição atingindo simultaneamente diferentes compartimentos da larva.

3.5.2 Tempo de eliminação (TE)

Após uma hora de exposição as formulações, as larvas foram transferidas para recipientes com água destilada para iniciar o experimento de TE (Figura 3.11). Formulação

1 (bloco vermelho), formulação 2 (bloco azul), formulação 3 (bloco rosa) e formulação 4 (bloco verde).

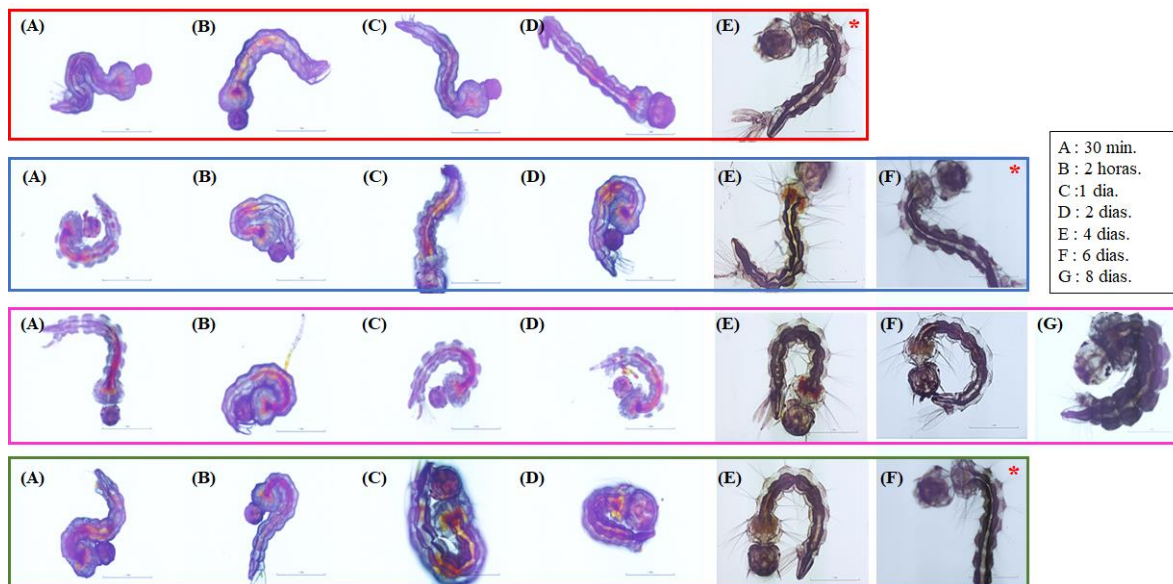


Figura 3.11 Eliminação das formulações 1, 2, 3 e 4 na concentração de CL_{25} no sistema digestório de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*. (*) diferenças no tempo de eliminação.

Na Figura 3.11 observou-se que ao longo do tempo, o trato digestório da larva foi clareando, indicando a eliminação das formulações. A formulação 1 (bloco vermelho), apresentou o menor TE, observado em 4 dias. As formulações 2 e 4 apresentaram um TE intermediário, pois demoraram cerca de 6 dias para eliminar todas as partículas ao longo do trato.

E por último, a formulação 3 que apresentou o maior TE, levando 8 dias para ser totalmente eliminada. E também com o maior tempo de retenção da formulação, é possível que esse contato cause alterações morfológicas através da interação da CUR com os tecidos.

É válido ressaltar que as larvas foram mantidas na ausência de luz, não provocando a mortalidade das mesmas, porém a formulação 3 retardou o processo de empupamento das larvas (HICKMAN, 2004). Esse retardo também foi observado por Mezzacappo e seus colaboradores (2021) utilizando CUR como fotolarcívica.

3.6 Avaliação do crescimento bacteriano em águas de criadouro artificial

Os ensaios de proliferação microbiana foram realizados nos criadouros onde as formulações foram colocadas para eliminar as larvas de *Ae. aegypti*. A Figura 3.12 apresenta o crescimento da microbiota da água de criadouros artificiais, pré (0 dia) e pós tratamento, em relação aos dias.

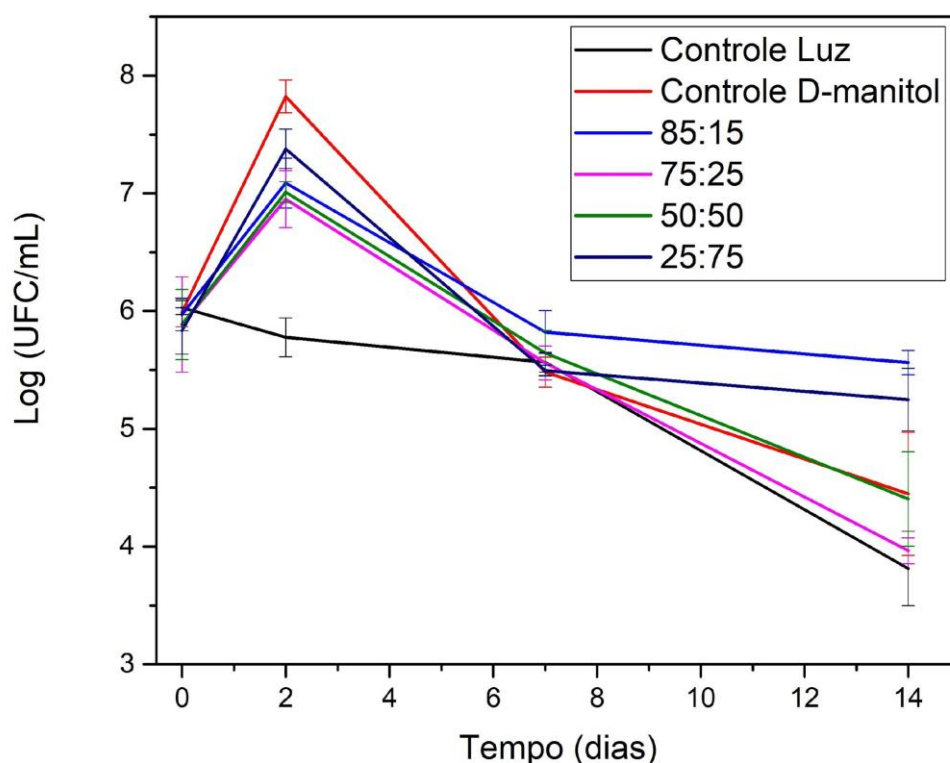


Figura 3.12 Proliferação microbiana da água de criadouros artificiais de larvas de *Ae. aegypti* durante 14 dias após a aplicação das formulações (1-4).

Um aumento na proliferação microbiana é observado em todas as formulações que contêm D-manitol logo 48 horas após o início de tratamento. No entanto, após 7 dias de tratamento, a população de microrganismos retorna ao valor inicial encontrado no grupo controle. Com 14 dias é possível notar que a população sofreu reduções, e em alguns grupos essa redução chega a 2 ordens logarítmicas.

Embora as formulações não tenham apresentado diferença significativa na proliferação de microrganismos após 7 dias de aplicação do larvicida, as formulações também não estimularam seu crescimento anormal. Mahdi Jowkar (2006) avaliaram a proliferação de microrganismos em águas tratadas com compostos biocidas e descobriram que o composto mais eficaz foi 8-citrato de hidroxiquinolina cuja água não apresentou crescimento significativo em até 6 dias de tratamento.

Assim como o trabalho supracitado, as formulações 1, 2, 3 e 4 além de não causar uma proliferação descontrolada, entre 7 e 14 dias foi possível identificar uma diminuição das colônias iniciais sugerindo que as mesmas tenham inibido esse crescimento, assim como alguns estudos de IFD com linhagens resistentes de *Staphylococcus aureus*, em espécies de fungos como *Candida* e em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (KAUR et al., 2010; DOVIGO et al., 2011 e DIAS RIBEIRO et al., 2013).

3.7 Toxicidade aguda em peixes (*Danio rerio*)

Os efeitos dos poluentes na biota não-alvo nem sempre são letais, eles podem causar efeitos adversos subletais, como: comprometer a aptidão e sobrevivência da população, superprodução de EROs levando a falhas em mecanismos fisiológicos, alterações nos embriões, entre outros (ZUCKER, 1985).

Piriproxifeno (larvicida sintético) pode prejudicar peixes de água doce, atingindo principalmente os embriões e a região neurológica (neurotóxicos) (TRUONG et al., 2016), outros pesticidas também são capazes de danificar o DNA e a morfologia dos organismos afetados (MAHARAJAN et al., 2018).

Embora alguns extratos de plantas e óleos essenciais possam apresentar uma alta taxa de mortalidade contra larvas imaturas de mosquitos, e também são considerados ambientalmente seguros, os larvicidas botânicos (CONTI et al., 2014).

Os estudos deste trabalho, não reportaram toxicidade aguda para *D. rerio* (macho e fêmea) em concentrações até 100 mg.mL⁻¹ (OECD, 203). Não foi observado mortalidade, tampouco alterações morfológicas nos peixes expostos por 96 h a formulação 3.

3.8 Persistência da formulação 3 em aplicação de campo simulado

Para avaliar os efeitos residuais da formulação 3, foi analisada a persistência da ação fotolarvicida ao longo dos dias, utilizando a concentração (25 mg.L^{-1}). Na Figura 3.13, observou-se que a eficácia permaneceu em 80% até o 6º dia para as duas condições de iluminação.

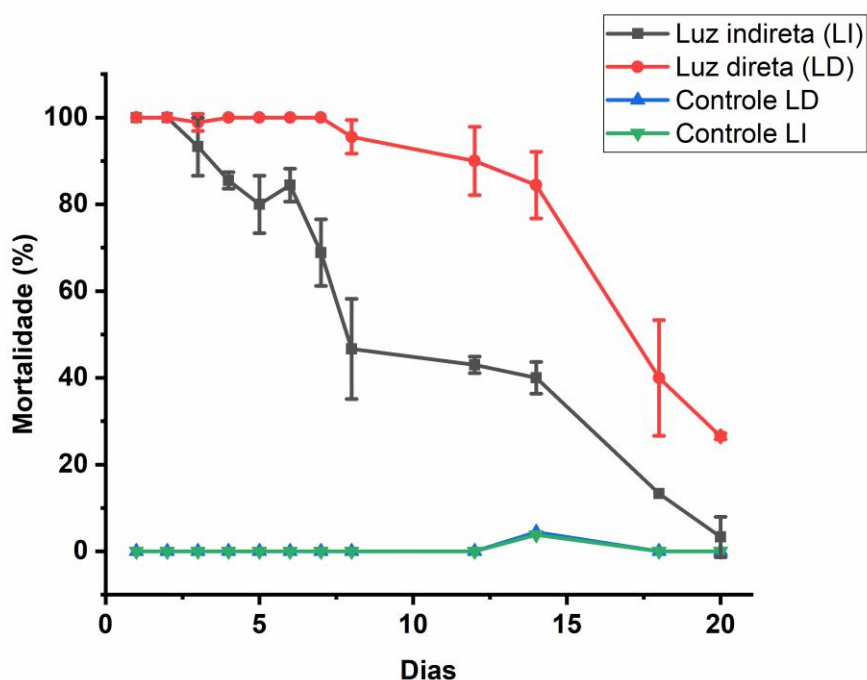


Figura 3.13 Atividade larvicida da curcumina em caixas d'água expostas à luz solar direta e indireta.

A partir do 8º dia, a persistência da formulação que permaneceu na sombra diminuiu cerca de 45%, enquanto a que permaneceu ao sol manteve a eficácia em 80%. A persistência da formulação que permaneceu ao sol começou a diminuir a partir do 14º dia, sendo praticamente eliminada em 20 dias (26% de eficácia). Por outro lado, a formulação mantida na sombra teve o menor tempo de persistência, sendo praticamente eliminada em 18 dias (13% de persistência). Nos grupos controle não observamos mortalidade.

Recentemente, há registros na literatura da persistência de compostos à base de plantas, como os compostos derivados da casca de castanha de caju natural (*Occidentale anacardium*). Na mesma metodologia aplicada aqui, esses compostos apresentaram um

tempo médio de atividade residual de 3,5 dias em 100 mg.L^{-1} contra larvas de *Ae. aegypti* (DE CARVALHO, 2019).

Mezzacappo e seus colaboradores (2021) utilizaram uma composição de 99% de curcumina e 1% de D-manitol, apresentando uma eficácia de 55% no 9º dia (em condições de laboratório). A formulação do presente trabalho aplicada em LD (em condições de campo simulado), manteve sua eficácia a 80% apresentando uma melhora no tempo de persistência. Isso mostra que a técnica de co-cristalização pode ter contribuído para o melhoramento da estabilidade da formulação, prolongando sua atividade residual em condições de maiores variações de temperatura e iluminância. Em comparação a outros fotolarvicidas, como por exemplo a porfirina, o efeito residual da formulação é considerado relativamente bom, uma vez que essas moléculas em exposição direta a luz não possuem ação residual, perdendo completamente a atividade em 48h e 72h (FABRIS et al., 2012).

3.9 Avaliação do crescimento bacteriano após o uso da formulação 3 em aplicação de campo simulado

Um aumento na proliferação microbiana é observado em todas as caixas no 2º dia de experimento (Figura 3.14).

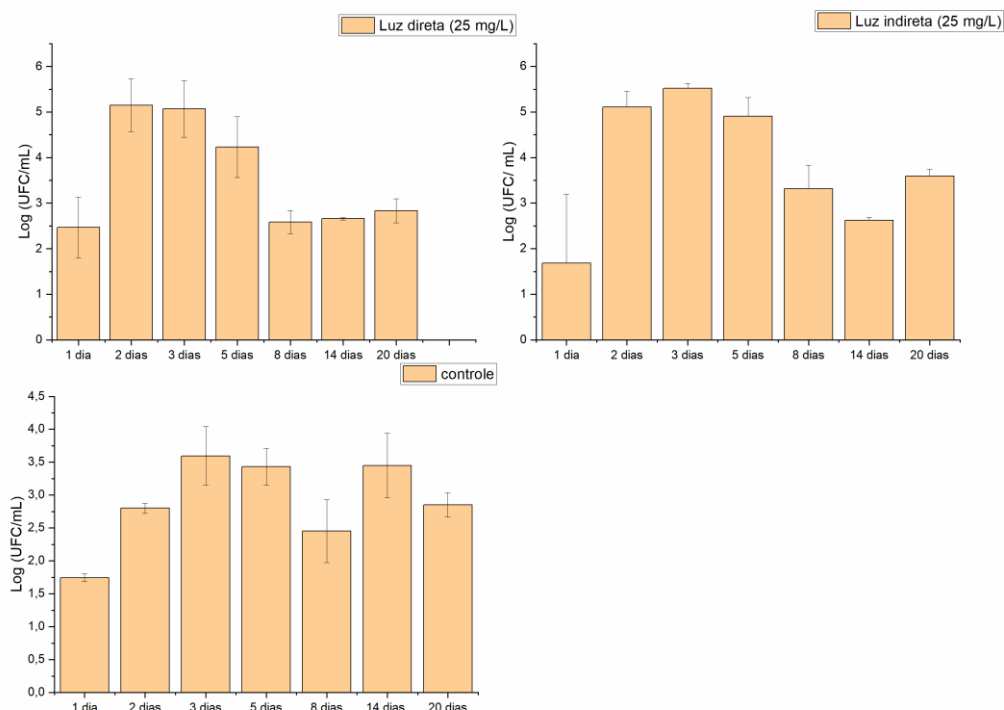


Figura 3.14 Avaliação da carga microbiológica da água dos criadouros tratados com curcumina (25 mg.L⁻¹). A) Caixas expostas a luz direta, B) Caixas expostas a luz indireta e C) Controle.

Um crescimento também foi observado nas caixas controle após o 2º dia. O pico de crescimento microbiano pode ser justificado pela presença de D-manitol na água, uma vez que este açúcar é um dos principais nutrientes utilizados no metabolismo microbiano, sendo, portanto, uma fonte de carbono. No entanto, após o 8º dia houve uma diminuição na carga microbiológica atingindo as condições iniciais encontradas antes da aplicação das formulações, reestabelecendo o ambiente original. Não houve diferença significativa entre o 1º e 20º nos grupos tratados ($p > 0,05$).

Capítulo 4 – Conclusões

As formulações (1-4) apresentam absorção máxima em 450 nm, excitadas a 450 nm, exibiram a fluorescência máxima 541 e 542 nm. Ao comparar os espectros de FTIR, a maioria dos picos de absorção da CUR e o D-manitol puderam ser observados nas formulações. O

enfraquecimento nas vibrações do D-manitol e da CUR foram observadas conforme a proporção dos mesmos diminuía nas formulações e vice-versa.

Em comparação entre as formulações foi possível observar que a formulação 1 apresentou maior solubilidade, este motivo deve estar relacionado com a quantidade. Além disso, conforme a proporção de D-manitol diminuía nas formulações a solubilidade também era menor.

A formulação 3 foi que apresentou melhor atividade larvicida, com o valor de CL_{50-24h} (0,01 mg.L⁻¹) para a mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*. Além disso, apresentou o menor TI e maior de TE, sendo estes 30 minutos e 8 dias respectivamente. Vale ressaltar que foi a única formulação possível observar a expulsão da membrana peritrófica durante a eliminação do composto. Isto pode estar relacionado por ser uma formulação pouco solúvel, apresentando uma digestão e eliminação mais lenta. Além de retardar o desenvolvimento das larvas.

No processo ensaio de degradação, a formulação 3 apresentou após 24 horas pouco mais de 49%. Essa degradação é de grande importância, considerando a aplicação da formulação no meio ambiente, porém ainda é necessário estudar o efeito residual para as larvas.

Os testes de segurança ambiental, não apresentaram mortalidade em *Danio rerio*, expostos por 96 h a uma concentração de 100 mg m.L¹ para formulação 3.

Nos estudos de campo simulado, a formulação 3 apresentou maior ação residual na LD, cuja perda de eficácia foi observada no 14º dia e na LI, o tempo de persistência foi mantido apenas até o 6º dia.

As formulações não estimularam crescimento microbiano anormal nos criadouros após a aplicação, tampouco no teste de campo simulado, portanto essas formulações são opções interessantes para serem usadas em locais com água, tanto para eliminar larvas de *Ae. Aegypti*, quanto para controlar a proliferação de microrganismos indesejados.

Referências

- ABOUDIAB, B; TEHRANI-BAGHA, A R.; PATRA, D. Curcumin degradation kinetics in micellar solutions: Enhanced stability in the presence of cationic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 592, p. 124602, 2020.
- ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2013.
- ANAHP. Dengue, Zika e chikungunya provocaram 794 mortes em 2016, segundo boletim. Disponível em <<https://www.anahp.com.br/noticias/noticias-do-mercado/dengue-zika-e-chikungunya-provocaram-794-mortes-em-2016-segundo-boletim/>>. Acesso em: 20 de abril de 2020.
- AMOR, T. BEN; BORTOLOTTI, L.; JORI, G. Porphyrins and related compounds as photoactivatable insecticides. 3. laboratory and field studies. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 2, p. 124, 2000.
- ANDRADE, C. F. S., & SANTOS, L. (2004). O uso de predadores no controle biológico de mosquitos, com destaque aos Aedes. *Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas–UNICAMP. SP.*
- ARAÚJO, H. R. C. et al. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576–594, 2015.
- ARRUDA, CL et al. CdTe-GSH as luminescent biomarker for labeling the larvicidal action of WSMoL lectin in *Aedes aegypti* larvae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 187, p. 110672, 2020.
- B MYTHRI, R.; M SRINIVAS BHARATH, M. Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 1, p. 91-99, 2012.
- BARBIERI, A. Sensibilizadores fluorescentes como larvicidas: action fotodinamica de la luz. **Rivista di Malariologia**, v. 7, n. 4, 1928.
- BARRETO, C. F. et al. Estudos das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) submetidas ao extrato etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). Goiânia: **Revista de Patologia Tropical**. v.35, n.1, p.37-57, jan.-abr., 2006.
- BOVERIS, A., et al. The concept of oxidative stress in pathology. In: Álvarez, S.; Evelson, P. (ed.), Free Radical Pathophysiology. 1-17, **Transworld Research Network**: Kerala, India, 2008.
- BRAGA, I. A., & VALLE, D. (2007a). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.16, n.4, p.279-293, out-dez, 2007.
- BRAGA, I. A., & VALLE, D. (2007b). *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 16(4), 295-302.
- CALIN, M. A.; PARASCA, S. V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 453-460, May 2009.
- CARVALHO, F.D.; MOREIRA, L.A. 2017. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species?. **Neotropical Entomology** 46: 243-55.
- CHIGNELL, C. F. et al. Spectral and photochemical properties of curcumin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p. 295–302, 1994.
- CHRISTOPHERS, S 1960. *Aedes aegypti* (L) The Yellow Fever Mosquito. Its Life History, Bionomics and Structure, Cambridge at the University Press, Cambridge.

- CLEMENTS, A.N. 1992. The Biology of Mosquitoes: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall, London, 1: 509.
- CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fio Cruz, 228p.
- CONTI, B et al. Mosquitocidal essential oils: are they safe against non-target aquatic organisms?. **Parasitology research**, v. 113, n. 1, p. 251-259, 2014.
- COSTA, I. M. P.; CALADO, Daniela Cristina. Incidência dos casos de Dengue (2007-2013) e distribuição sazonal de culicídeos (2012-2013) em Barreiras, Bahia. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, v. 25, n. 4, p. 735-744, 2016.
- COSTA, E. M. S.; CUNHA, R. V.; COSTA, E. A. Avaliação da implantação do Programa de controle da dengue em dois municípios fronteiriços do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 4, p. e2017478, 2018.
- DE CARVALHO, G. H. F. et al. Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nutshell against arbovirus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5514-5523, 2019.
- DE OLIVEIRA, P. S. M. et al. Synthesis of aminoalcohols from D-mannitol. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 776-780, 2008.
- DE OLIVEIRA, C. M. C. A. O fim da picada. Disponível em < <http://www.casadaciencia.com.br/o-fim-da-picada/>>. Acesso em: 20 de abril de 2020.
- DE SOUZA, L. M. et al. Evaluation of photodynamic effects of curcumin against the dengue vector – *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 346–347, 2015.
- DE SOUZA, L. M. Viabilidade da implementação em campo da atividade fotodinâmica da curcumina para o controle de larvas do *Aedes aegypti*. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019a.
- DE SOUZA, L. M. et al. Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 151-158, 2019b.
- DE SOUZA, L. M. et al. Curcumin in Formulations against *Aedes aegypti*: Mode of action, Photolarvicidal and ovicidal activity. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 101840, 2020.
- DIAS RIBEIRO, A. P. et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 391-398, Feb 2013.
- DO NASCIMENTO XAVIER, Morgana et al. Sticky BR-OVT: A Trap to Collect Culicids Eggs and Adult Mosquitoes.
- DONDJI, B., DUCHON, et. al.. (2005). Assessment of laboratory and field assays of sunlight-induced killing of mosquito larvae by photosensitizers. *Journal of medical entomology*, 42(4), 652-656.
- DOVIGO, L. N. et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 9, p. 927-934, 2011.
- DREYER, T. R. (2009). Estudo fotodinâmico da clorofila a, azul de metileno e rosa bengala como agente inseticida contra *Aedes aegypti*.

DUTTA, A. et al. Stabilization of diketo tautomer of curcumin by premicellar anionic surfactants: UV–Visible, fluorescence, tensiometric and TD-DFT evidences. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 104, p. 150-157, 2013.

FABRIS, C et al. Efficacy of sunlight-activatable porphyrin formulates on larvae of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *An. arabiensis*: A potential novel biolarvicide for integrated malaria vector control. **Acta tropica**, v. 123, n. 3, p. 239-243, 2012.

FORATTINI, O. P. *Culicidologia Médica: identificação, biologia, epidemiologia*. São Paulo: EDUSP, 2002.

FRATI, E. et al. Degradation of hyaluronic acid by photosensitized riboflavin in vitro. Modulation of the effect by transition metals, radical quenchers, and metal chelators. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 7, p. 1139-1144, 1997.

FURTADO, R. F. et al. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GERIS, R. Bioactive Natural Products as Potential Candidates to Control *Aedes aegypti*, the Vector of Dengue. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 37. p. 277–376, 2012.

GUEYMARD, C. A. The sun's total and spectral irradiance for solar energy applications and solar radiation models. **Solar energy**, v. 76, n. 4, p. 423-453, 2004.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, Sridevi; AGGARWAL, Bharat B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. **The AAPS journal**, v. 15, n. 1, p. 195-218, 2013.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: a review of its' effects on human health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

HICKMAN JR., R. C. e G. B. *Principios Intergrados de Zoologia*; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

HU, K et al. Core–shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein–pectin nanoparticles. **Food chemistry**, v. 182, p. 275-281, 2015.

HUANG, Y. Y., CHEN, A. C. H., CARROLL, J. D., & HAMBLIN, M. R. (2009). Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-response*, 7(4), dose-response.

HUANG, L. et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 490-499, Aug 2012.

IOC/Fiocruz. Zika, Chikungunya e dengue : entenda a diferença. Disponível em : <<https://rededengue.fiocruz.br/noticias/31-zika-chikungunya-e-dengue-entenda-as-diferencas>>. Acesso em: 23 de junho de 2020.

IOC/Fiocruz. O vírus da dengue. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1389&sid=8>>. Acesso em: 03 de setembro 2020.

JESUS, A. J. Lopes et al. Erythritol: Crystal growth from the melt. **International journal of pharmaceutics**, v. 388, n. 1-2, p. 129-135, 2010.

- KAUR, S. et al. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ - A structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 4209-4214, Sep 2010.
- KLIEWER, J. W., 1961. Weight and Hatchability of *Aedes aegypti* Eggs (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am* 54: 912-917
- KUNDU, M. et al. pH-responsive and targeted delivery of curcumin via phenylboronic acid-functionalized ZnO nanoparticles for breast cancer therapy. **Journal of advanced research**, v. 18, p. 161-172, 2019.
- LEUNG, M. H. M.; KEE, T. W. Effective stabilization of curcumin by association to plasma proteins: human serum albumin and fibrinogen. **Langmuir**, v. 25, n. 10, p. 5773-5777, 2009.
- LIMA, A. R. et al. Avaliação de corantes como agente fotossensibilizadores para controle fotodinâmico da população de larvas de *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae). 2016.
- LIMA, A. et al. Evaluation of Eosin-Methylene Blue as a Photosensitizer for Larval Control of *Aedes aegypti* by a Photodynamic Process. *Insects*, v. 9, n. 3, p. 109, 2018.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 2015. *Biologia e comportamento do vetor*. Valle, D.;Pimenta, D.N.; Cunha, R.V.; organizadores. *Dengue teorias e práticas*. Rio de Janeiro:Fiocruz, 76-92.
- MAHARAJAN, K. et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): a multi biomarker study. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 132-145, 2018.
- MAHDI JOWKAR, M. Water relations and microbial proliferation in vase solutions of *Narcissus tazetta* L. cv. 'Shahla-e-Shiraz' as affected by biocide compounds. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 656-660, 2006.
- MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers in Medical Science*, v. 22, n. 2, p. 83-91, Jun 2007.
- MARTINS, T. G. T. et al. Atividade larvicida do óleo essencial de Pimenta dioica Lindl. frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e151985518-e151985518, 2020.
- MAZZARINO, L., 2013. Disponível em <https://www.researchgate.net/figure/Figura-8-Estrutura-quimica-dos-curcuminoides-curcumina-A-demetoxicurcumina-B-e_fig7_278644558>.
- MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In: **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**. Springer, Boston, MA, 2007. p. 105-125.
- MEZZACAPPO, N. F. et al. Curcumin/d-mannitol as photolarvicide: induced delay in larval development time, changes in sex ratio and reduced longevity of *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 5, p. 2530-2538, 2021.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde; 2019.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde; 2020.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Vírus zika. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Jul; 29 (3): 487-524. doi: 10.1128 / CMR.00072-15.

NOORAFSHAN, A; ASHKANI-ESFAHANI, S. A review of therapeutic effects of curcumin. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 11, p. 2032-2046, 2013.

OECD Test. "203: Fish, acute toxicity test." (1992).

OMS, 2020. **Inseticidas Recomendados**. Disponível: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/microcefalia/926-saude-de-a-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/11392-inseticidas-recomendados>>. Acesso em: 27/07/2020.

ORMOND, A. e FREEMAN, H. Dye sensitizers for photodynamic therapy, *Materials (Basel)*, v. 6. p. 817, 2013.

OPAS Brasil (2020). Dengue. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=416:dengue&Itemid=463>. Acesso em: 21 de abril de 2020.

OPAS Brasil (2017b). Diretora-geral da OMS faz balanço de um ano da declaração de emergência internacional sobre zika. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5340:diretora-geral-da-oms-faz-balanco-de-um-ano-da-declaracao-de-emergencia-internacional-sobre-zika&Itemid=812>. Acesso em: 22 de abril de 2020.

OPAS Brasil (2017a). OPAS/OMS e o CDC lançam a publicação “Preparação e resposta ante a eventual introdução do vírus Chikungunya nas Américas”. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3497:opas-oms-e-o-cdc-lancam-a-publicacao-preparacao-e-resposta-ante-a-eventual-introducao-do-virus-chikungunya-nas-americas-3&Itemid=812>. Acesso em: 22 de abril de 2020.

PASCHOAL, M. A., et al. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 10, n. 3, p. 313-319, 2013.

PYRAMIDES, G; ROBINSON, J. W.; ZITO, S. William. The combined use of DSC and TGA for the thermal analysis of atenolol tablets. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 13, n. 2, p. 103-110, 1995.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, Sérgio Batista. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de saúde pública**, v. 37, p. 813-816, 2003.

PorPlanta, 2020. Curcumina como Conservantes. Disponível:<<https://www.planta.vc/utilizacao-de-curcumina-como-conservante/>>. Acesso em: 27/07/2020.

SAGNOU, M. et al. Evaluation of naturally occurring curcuminoids and related compounds against mosquito larvae. **Acta tropica**, v. 123, n. 3, p. 190-195, 2012.

SAHU, A.; KASOJU, N.; BORA, U. Fluorescence study of the curcumin– casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2905-2912, 2008.

SARI, A. et al. Erythritol tetra myristate and erythritol tetra laurate as novel phase change materials for low temperature thermal energy storage. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 35, n. 14, p. 1285-1295, 2013.

- SCHILDMACHER, H. Über Photosensibilisierung von Stechmücken- larven durch fluoreszierende Farbstoffe. **Biol. Zentralbl.**, n. 69, p. 468–477, 1950.
- SHARMA, Ricky A. et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 20, p. 6847-6854, 2004.
- SHEBIS, Y. et al. Cooperative crystallization effect in the formation of sonochemically grafted active materials based on polysaccharides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 190, p. 110931, 2020.
- SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.. Influência no período de quiescência dos ovos sobre o ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32. p. 349-355. 1999.
- SILVA, Jr.J.B., et al. Dengue in Brazil: current situation and control activities. **Epidemiological Bulletin**. v. 23. n 1. p. 3-6. 2002.
- SKELTON, E. et al. A native Wolbachia endosymbiont does not limit dengue virusinfection in the mosquito *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 2, p. 401–408, 2016.
- SNEHARANI, A. H.; SINGH, S. A.; APPU RAO, A. G. Interaction of α S1-casein with curcumin and its biological implications. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10386-10391, 2009.
- SONG, I.; CHA, J.; CHOI, M. Characterization, in vivo and in vitro evaluation of solid dispersion of curcumin containing d- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate and mannitol. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1386, 2016.
- SRIVASTAVA, G.; MEHTA, J. L. Currying do coração: curcumina e cardioproteção. **Jornal de farmacologia cardiovascular e terapêutica** , v. 14, n. 1, p. 22-27, 2009.
- TAPAL, A.; TIKU, P. K. Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 960-965, 2012.
- TISSOT, A. C.; SILVA, M. A. N. Lista das espécies de Culicidae (Diptera) depositadas na coleção de entomologia Pe. JS Moure. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 2, p. 263-268, 2008.
- TRUONG, L. et al. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. **Environmental pollution**, v. 218, p. 1089-1093, 2016.
- VALLE, D.; BELINATO, T.A.; MARTINS, A.J. 2015a. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. In: Valle D (ed) *Dengue: teorias e práticas*. Fiocruz, Rio de Janeiro, 93–126.
- VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015b.
- VILARINHOS, P.; DIAS, D. G. S.; MONNERAT, R. G. Persistência larvicida de formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2003.
- WOHLLEBE, S. RICHTER, R. e HÄDER, D. P. Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbid as photodynamic substances. **Parasitol. Res.** v. 104. p. 593, 2009.
- WONG, S. et al. Just add sugar for carbohydrate induced self-assembly of curcumin. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2019.

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

ZARA, A. L.S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.

ZHICHAO, L. QIANG, Z. GAOHUI, W. Preparation and enhanced heat capacity of nano-titania doped erythritol as phase change material. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 80, p. 653-659, 2015.