



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



**Viabilidade da implementação em campo da ação
fotodinâmica da curcumina para o controle de larvas do
*Aedes aegypti***

Larissa Marila de Souza

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

Orientador:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

bolsista CAPES nº 1538187

**São Carlos - SP
2019**

LARISSA MARILA DE SOUZA

Viabilidade da implementação em campo da atividade fotodinâmica da curcumina para o controle de larvas do *Aedes aegypti*

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:
Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

São Carlos, Julho de 2019

de Souza, Larissa Marila

Viabilidade da implementação em campo da ação fotodinâmica da curcumina para o controle de larvas do *Aedes aegypti* / Larissa Marila de Souza. -- 2019.

140 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

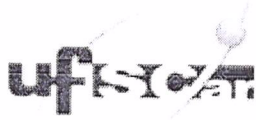
Banca examinadora: Vanderlei Salvador Bagnato, Daniel Souza Corrêa, Kate Cristina Blanco, Jaqueline Pérola de Souza, Ricardo de Oliveira Correia
Bibliografia

1. *Aedes aegypti*. 2. curcumina. 3. processos fotodinâmicos. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Larissa Marila de Souza, realizada em 23/07/2019:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
USP

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa
EMBRAPA

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Correia
USP

Profa. Dra. Kate Cristina Blanco
USP

Profa. Dra. Jaqueline Pérola de Souza
IFSC/USP

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer imensamente aos meus pais por terem caminhado ao meu lado nestes últimos anos. Por me ensinarem a andar pelo caminho do bem e seguir meu coração. Vocês são sensacionais, obrigada!!

À minha irmã pelo apoio.

Ao Dalton, meu namorado, que mesmo ao meio de tantas tempestades não desistiu de mim e nem me deixou desistir. Obrigada por tantos momentos bons.

À Paulinha, minha amiga da vida, que sempre procurou me alegrar nos momentos mais difíceis e me fez sorrir muitas vezes colocando “beatles” nas voltas da USP até em casa. Pra mim você é um exemplo de “coração gigante”.

À Kate Blanco, minha maior conselheira. Com você aprendi que na vida tudo tem jeito e se o mundo te virar as costas, melhor você virar as costas para ele também, rs!

À Amandinha, minha irmãzinha de alma, que sempre me defendeu como uma irmã mais velha.

À Shir, minha companheirinha de marmitta nesses últimos anos. Você foi um dos presentes que a vida me deu! A capricorniana mais neurótica e tão igual a mim rs!!

Aos meus grandes amigos: Didi, Hilde, Johan, Camilinha, Matheuzera, Renan, Lucas, Thaila. Não sei como será minha vida daqui pra frente, mas garanto que será muito mais difícil se não tiver todos vocês nela.

À Francine Venturini, uma das minhas grandes inspirações. Obrigada por todo apoio, por continuar comigo até o final!!! Por ler essa tese com o “Martin” na barriga.

À minha querida amiga Roana, sempre presente em todos os momentos da minha vida.

À Geisinha, que me salvou nos últimos minutos e contribuiu muito para este trabalho.

À Professora e amiga Natalia (Naty) por todo o amor que tem em ensinar e por toda a dedicação que colocou neste trabalho. Obrigada por todos os conselhos e por me escutar nos momentos de aflição.

Ao Professor Vanderlei Bagnato, que me deu uma das maiores oportunidades da minha vida e me apresentou ao mundo da ciência. Serei eternamente grata.

Ao Prof. Kleber, mais uma inspiração de vida, que todas as vezes que eu precisei, me sorriu e me deu mil possibilidades de novos caminhos.

À Denise Scatolini da Vigilância Epidemiológica de São Carlos que confiou em mim e me deu todo apoio para os ensaios de campo. Me ensinou muito!!

À Cacilda da Vigilância Epidemiológica de São Carlos, que de uma forma muito bondosa me ajudou na coleta dos criadouros. Agradeço também à toda a equipe de Agentes (Mercy, seu José e outros) que de uma forma descontraída fez o trabalho no sol escaldante ficar mais leve.

Ao Prof. Juliano Corbi, que sempre me orientou quando o assunto era “entomologia”, rs.

Às mais novas amigas, Débora, Claudinha, Cands, Rê, Pri Grandesi, Pri Di Buono, Gi, Kelinha, Pamella, Keisi. Obrigada por estarem comigo em Tulsa e por compartilharem o mesmo sonho que eu. Só sei de uma coisa meninas “you can dream it, you can do it”

À Profa. Cris Kurachi, que sempre foi tão carinhosa comigo e nunca mediu esforços para me auxiliar quando eu precisei.

Aos colegas do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, obrigada por momentos agradáveis e de muito aprendizado. Obrigada especialmente a Lili e ao pessoal da secretaria: Dri, Cris, Vagner, Benê. Vocês são incríveis e sempre me ajudaram muito!!

À banca examinadora que colaborou em todos os aspectos deste trabalho, meu muito obrigada para: Prof. Dr. Daniel Corrêa, Dra. Jaqueline Pérola, Dr. Ricardo Correia e Dra. Kate Blanco.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFSCar, muito obrigada pela oportunidade.

À Claudia Pastega (PPGbiotec) pela paciência e ajuda em todos os momentos.

À Profa. Cristina Paiva, que admiro muito como pessoa e profissional.

Ao CEPOF, CNPQ, DECIT (MINISTÉRIO DA SAÚDE) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 1538187

*"Nos demais,
todo mundo sabe,
o coração tem moradia certa,
fica bem aqui, no meio do peito...
mas comigo a anatomia ficou louca.
Sou todo coração -
em todas as partes palpita."*

Maiakovski

RESUMO

De Souza, L. M. **Viabilidade da implementação em campo da atividade fotodinâmica da curcumina para o controle de larvas do *Aedes aegypti***. 2019. 140 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

Ainda hoje, o uso de produtos inseticidas é indispensável para o controle de vetores. Desde a década de 60, compostos químicos são aplicados contra populações do *Aedes aegypti*. Com o uso indiscriminado dessas substâncias durante um longo período, ocorreu uma forte pressão de seleção, favorecendo o aparecimento de populações resistentes. Na tentativa de contornar este problema, os programas de controle de vetores têm optado pela utilização do rodízio de compostos com diferentes mecanismos de ação. Uma vez que poucos produtos estão disponíveis para o controle do *Aedes aegypti*, a busca por novas moléculas e métodos é indispensável. Com isto, o uso de substâncias com atividade fotodinâmica é fortemente encorajado, devido ao seu mecanismo de ação multialvos. Estas substâncias atuam via ação fotodinâmica, gerando espécies altamente reativas de oxigênio (EROs) na presença de luz e oxigênio molecular. Neste estudo, foi avaliada a atividade fotodinâmica da curcumina, um composto polifenólico, encontrado no turmérico de *Curcuma longa L.*, sobre linhagem Rockefeller (ensaios de campo simulado) e populações de campo de *Aedes aegypti*. A ação foto-larvicida da curcumina foi investigada na presença de dois açúcares: sacarose e o D-manitol, com o objetivo de melhorar as características de solubilidade e palatabilidade da substância. A caracterização das alterações moleculares envolvidas na atividade desses compostos sobre larvas de *Ae. aegypti* foi realizada via espectroscopia Raman. Além disso, foi verificada a toxicidade aguda da curcumina em açúcares no peixe *Danio rerio* e no microcrustáceo *Daphnia magna*, bem como a geração de EROs nestes organismos. Também foram caracterizados os efeitos biológicos da curcumina em *Ae. aegypti*, através de biomarcadores de estresse oxidativo (glutathiona reduzida (GSH) e catalase (CAT)). Este estudo também teve como objetivo analisar e caracterizar as alterações morfológicas provocadas pela curcumina no tubo digestório das larvas, através de análises histológicas. Adicionalmente, estudos da qualidade microbiológica da água dos reservatórios tratados com curcumina em sacarose e D-manitol foram conduzidos a fim de avaliar o impacto dessas formulações no micro-ambiente. Os resultados deste estudo mostraram o alto potencial foto-larvicida da curcumina sobre cepas Rockefeller de *Aedes aegypti*, em campo simulado. Os valores obtidos de LC_{50-24h} variaram entre 0,01 e 0,11 $mg.L^{-1}$, sendo muitas vezes menores que outros extratos naturais a base de plantas. A análise dos mecanismos moleculares via espectroscopia Raman mostrou que a curcumina em D-manitol é altamente permeável à membrana peritrófica do inseto, provocando danos irreversíveis ao epitélio colunar simples do tubo digestório. Ambas formulações de curcumina (em sacarose e em D-manitol) não apresentaram toxicidade em *D. magna* e *D. rerio* em até 100 $mg.L^{-1}$. EROs foram geradas em *D. magna* expostas a 50 $mg.L^{-1}$ de curcumina em D-manitol, podendo ser uma consequência dos processos de desintoxicação ou até mesmo do mecanismo de ação dessas moléculas. Quanto à resposta bioquímica em *Ae. aegypti*, a curcumina em D-manitol não alterou a atividade da CAT em nenhuma das concentrações testadas. Por outro lado, ocorreu a superprodução de GSH na concentração mais baixa (0,45 $mg.L^{-1}$), indicando esforços da desintoxicação por provável formação de EROs. Nas análises histológicas das larvas submetidas à curcumina em D-manitol, observamos uma grande desorganização celular em todas as regiões do canal alimentar, que perdeu completamente sua característica de epitélio colunar. A curcumina em sacarose também provocou sérios danos ao intestino, no entanto

essas alterações foram mais pontuais. Por fim, os estudos em cepas Rockefeller e populações de campo validaram a eficácia da curcumina como um foto-larvicida sobre o *Ae. aegypti*, evidenciando o seu alto potencial como uma alternativa ambientalmente segura, economicamente viável e racional para o controle de larvas de vetores.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Curcumina, Inativação Fotodinâmica, Atividade Larvicida, Controle de Vetores

ABSTRACT

De Souza, L. M. **Viability of implementation in the field of curcumin photodynamic activity to eliminate *Aedes aegypti* larvae.** 2019. 140 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

The use of insecticides is indispensable for the control of vectors. Since the 1960s, organophosphates are applied against populations of *Aedes aegypti*. With the indiscriminate use of these substances during a long period of time, there was a strong pressure selection, favoring the appearance of resistant populations. In an attempt to circumvent this problem, vector control programs have opted for the rotation of compounds with different mechanisms of action. Since few products are available for *Aedes aegypti* control, the search for new molecules and methods is pivotal. Taking this into account, the use of substances with photodynamic activity is strongly encouraged, due to its multi-target mechanism of action. These molecules act through photodynamic action, generating highly reactive oxygen species (ROS) in the presence of light and molecular oxygen. In this study, we evaluated the photodynamic activity of curcumin, a polyphenolic compound, found in turmeric *Curcuma longa* L. against Rockefeller strains (simulated field trials) and field populations of *Aedes aegypti*. The photolarvicidal action of curcumin was investigated in the presence of two sugars: sucrose and D-mannitol. The characterization of the molecular alterations involved in the activity of these compounds on *Aedes aegypti* was performed by Raman spectroscopy. In addition, the acute toxicity of curcumin in sugars was verified using the microcrustacean *Daphnia magna* and the fish *Danio rerio*, as well as the generation of ROS in these organisms. The biological effects of curcumin on *Aedes aegypti* were characterized by oxidative stress biomarkers (reduced glutathione (GSH) and catalase (CAT)). This study also aimed to analyze and characterize the morphological changes caused by curcumin in the larval digestive tract by histological analysis. Additionally, microbiological water quality studies of curcumin-treated reservoirs with sucrose and D-mannitol were conducted to evaluate the impact of these formulations on the micro-environment. The results of this study showed the high photolarvicidal potential of curcumin on Rockefeller strains in a simulated field. The LC_{50-24h} values ranged from 0.01 to 0.11 mg.L⁻¹, which are lower than other natural plant extracts. The analysis of the molecular mechanisms via Raman spectroscopy showed that curcumin in D-mannitol is highly permeable to the peritrophic membrane of the insect, causing irreversible damage to the simple columnar epithelium of the digestive tube. Both formulations of curcumin did not presented toxicity in *D. magna* and *D. rerio* up to 100 mg.L⁻¹. ROS were generated in *D. magna* exposed to 50 mg.L⁻¹ of curcumin in D-mannitol, and may be a consequence of detoxification processes or even the mechanism of action of these molecules. Regarding the biochemical response in *Aedes aegypti*, curcumin in D-mannitol did not alter CAT activity at any of the concentrations tested. On the other hand, GSH overproduction occurred at the lowest concentration (0.45 mg.L⁻¹), indicating detoxification efforts due to possible ROS generation. In the histological analysis of the larvae submitted to curcumin in D-mannitol, we observed a great cellular disorganization in all the regions of the alimentary canal, that completely lost its characteristic of columnar epithelium. The curcumin in sucrose also caused serious damage to the midgut, however these changes were more punctual. Finally, studies on Rockefeller strains and field populations validated the efficacy of curcumin as a photo-larvicide against *Aedes aegypti*, evincing its high potential as an environmentally safe, economically feasible and rational alternative for the control of vector larvae.

Keywords: *Aedes aegypti*, Curcumin, Photodynamic Inactivation, Larvicidal Activity, Vector Control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 2 – Circulação global dos vírus: Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) e dengue (DENV).....	26
Figura 3 – Classes de inseticidas neurotóxicos e sua atuação nos neurônios: transmissão axônica (OC, PI) e transmissão sináptica (CA, OP, SP).....	27
Figura 4 – Diagrama de Jablonski. Quando um FS absorve luz, um elétron passa de um estado fundamental de baixa energia para um estado singlete excitado de alta energia. Este estado excitado pode perder energia emitindo fluorescência ou através de conversões de energia interna. O processo denominado “cruzamento intersistema”, envolve a mudança de configuração de <i>spin</i> dos elétrons de alta energia, levando a um estado tripleto excitado de longa duração (10^{-3} a 10 segundos). Isto aumenta a possibilidade do FS interagir com moléculas vizinhas na presença de oxigênio e originar radicais superóxido e hidroxila (via mecanismo tipo I) ou oxigênio singlete (mecanismo tipo II), capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas.....	30
Figura 5 – Ilustração esquemática dos ensaios de IFD em larvas de insetos vetores. Primeiramente (quadro A), as larvas ingerem o FS que se acumula preferencialmente no intestino médio (quadro B). Após isto, o FS é ativado por luz solar provocando a morte do inseto (quadro C).....	32
Figura 6 – <i>Curcuma longa</i> L. (a) Cúrcuma com inflorescência; (b) turmerico; (c) rizoma seco moído; (d) estrutura química.....	34
Figura 7 – Espectro de absorção da curcumina em DMSO e etanol com pico máximo em 420 nm.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Moléculas com propriedades fotossensíveis com alto potencial larvicida.....	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ALA	5-Aminolevulinic acid
AChE	Acetilcolinesterase
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CA	Carbamatos
CAT	Catalase
CUR	Curcumina
CHIK	Chikungunya
CHIKV	Vírus Chikungunya
CL50	Concentração Letal Média
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DEN	Dengue
DENV	Vírus da Dengue
DM	D-mannitol
DMC	D-mannitol-curcumin
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTNB	Dinitrothiobenzoate
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Febre Amarela
FAS	Febre Amarela Silvestre
FAU	Febre Amarela Urbana
FHD	Febre Hemorrágica da dengue
FS	Fotossensibilizador
GC	Gastric caeca
GSH	Reduced glutathione
HE	Hematoxylin and eosin
HJ	Hormônio Juvenil
HpIX	Hematoporphyrin IX
IFD	Inativação Fotodinâmica
IRG's	Inseticidas Reguladores de Crescimento
IGC's	Insect growth regulators
LC ₅₀	Lethal concentration
LCL	95% Lower Confidence Limit
ME	Midgut epithelium
OC	Organoclorados
OF	Organofosforados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-HD	<i>Pinus densiflora</i> hidrodestilado
PDT	Photodynamic Therapy
PET	Polietileno tereftalato

PI	Piretróides
PM	Peritrophic membrane
PNH	Primatas não- humano
PS	Photosensitizer
ROS	Reactive oxygen species
SA	Secretive activity
SC	Sucrose-curcumin
Sinasc	Sistema de Informação de Nascidos vivos
SP	Espinosinas
TFD	Terapia Fotodinâmica
UCL	95% Upper Confidence Limit
USEPA	United States Environmental Protection Agency
Vigep	Vigilância Epidemiológica de São Carlos
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIK	Zika
ZIKV	Vírus do Zika
°C	Grau Celsius
O ₂ -	Superóxido
OH-	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
g	Grama
L	Litro
mg	Miligrama
mg.L ⁻¹	Miligrama por Litro
mg/mL	Miligrama por Mililitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por Mililitro
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µmol/L	Micromol por Litro

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Aspectos gerais do <i>Aedes aegypti</i>	21
1.2 Importância epidemiológica do <i>Aedes aegypti</i>	23
1.3 Controle do <i>Aedes aegypti</i>	26
1.4 Inativação fotodinâmica e o controle de vetores.....	29
1.5 Curcumina e suas propriedades larvicida.....	34
1.6 Justificativa.....	38
2 OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
3 RESULTADOS.....	41
3.1 ARTIGO 1: Comparison of two photoactivatable formulations containing curcumin for <i>Aedes aegypti</i> larvae control using photodynamic process.....	41
ABSTRACT.....	45
AUTHOR SUMMARY.....	46
1 INTRODUCTION.....	47
2 MATERIALS AND METHODS.....	49
2.1 Larvae.....	49
2.2 Curcumin sugars solutions preparation.....	49
2.3 Semi-field trials.....	50
2.4 Morphological analysis.....	51
2.5 Raman spectroscopy: effects of SC and DMC activity on midgut.....	51
2.6 Statistical analysis.....	52
3 RESULTS.....	52
3.1 Semi-field trials.....	52
3.1.1 Plastic beakers.....	52
3.1.2 Glass aquariums.....	54
3.2 Morphological analysis.....	55
3.3 Raman spectroscopy: effects of SC and DMC activity on midgut.....	56
4 DISCUSSION.....	59
5 CONCLUSIONS.....	63
6 REFERENCES.....	64
3.2. ARTIGO 2: Environmental safety and mode of action of a novel curcumin-based photolarvicide.....	67
ABSTRACT.....	69
1 INTRODUCTION.....	71
2 MATERIALS AND METHODS.....	73

2.1	<i>Chemicals</i>	73
2.2	<i>Photosensitizer formulations</i>	73
2.3	<i>Acute toxicity assays in non-target organisms</i>	73
2.3.1	<i>Danio rerio</i>	73
2.3.2	<i>Daphnia magna</i>	74
2.4	<i>Sub-lethal toxicity assays in non-target organisms</i>	74
2.4.1	<i>Reactive oxygen species (ROS) generation assay</i>	74
2.4.2	<i>Feeding rate</i>	75
2.5	<i>Ae. aegypti experiments</i>	76
2.5.1	<i>Histological analysis</i>	76
2.5.2	<i>Biochemical assays</i>	76
2.6	<i>Data analysis</i>	77
3	RESULTS	77
3.1	<i>Acute toxicity assays in non-target organisms</i>	77
3.1.1	<i>D. magna assays</i>	77
3.1.2	<i>D. rerio assays</i>	78
3.2	<i>Sub-lethal toxicity assays in non-target organisms</i>	79
3.2.1	<i>ROS generation</i>	79
3.2.2	<i>Feeding rates</i>	80
3.3	<i>Ae. aegypti experiments</i>	81
3.3.1	<i>Histological analysis</i>	81
3.3.2	<i>Biochemical assays</i>	84
4	DISCUSSION	85
5	REFERENCES	90
3.3	ARTIGO 3: Validação da atividade fotodinâmica da curcumina (<i>Curcuma longa</i> L) em populações de campo do <i>Aedes aegypti</i> , uma análise preliminar.....	94
	RESUMO	96
1	INTRODUÇÃO	98
2	MATERIAL E MÉTODOS	101
2.1	<i>Manutenção das larvas</i>	101
2.2	<i>Preparação da curcumina</i>	101
2.3	<i>Ensaio de campo em pequena escala</i>	101
2.3.1	<i>Campo simulado</i>	101
2.3.2	<i>Ensaio em populações de campo do <i>Aedes aegypti</i></i>	103
2.4	<i>Análise da qualidade microbiológica dos recipientes tratados com DMC</i>	105
2.5	<i>Análise estatística</i>	105

3	RESULTADOS.....	107
3.1	<i>Ensaio de campo em pequena escala.....</i>	<i>107</i>
3.1.1	<i>Campo simulado.....</i>	<i>107</i>
3.2	<i>Ensaio em populações de campo do Aedes aegypti.....</i>	<i>108</i>
3.3	<i>Análise da qualidade microbiológica dos recipientes tratados com DMC.....</i>	<i>110</i>
4	DISCUSSÃO.....	111
5	REFERÊNCIAS.....	116
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	121
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
6	ANEXOS.....	132

APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese apresenta o estudo da fotoeficácia da curcumina (CUR), um curcuminóide derivado da *Curcuma longa* Linn, sobre cepas Rockefeller e populações de campo de *Aedes aegypti* em várias condições experimentais. Na introdução será apresentada um breve relato dos aspectos gerais e comportamentais do *Ae. aegypti*, bem como sua importância em saúde pública e todas as doenças relacionadas a este importante vetor. Métodos tradicionais de controle, classes de inseticidas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), propriedades biológicas da CUR e os mecanismos da inativação fotodinâmica (IFD) também foram apresentados.

A seção de resultados foi dividida em três capítulos, em forma de manuscritos, sendo o primeiro já revisado e submetido à revista internacional “PLOS Neglected Tropical Diseases”. O segundo manuscrito está em fase de revisão e será submetido a revista “Ecotoxicology and Environmental Safety”, e o último se encontra em preparação.

O primeiro capítulo apresenta o potencial foto-larvicida de duas formulações de CUR sobre larvas de *Ae. aegypti*, em condições de campo simulado. Dois açúcares (sacarose e D-manitol) foram adicionados à CUR para o melhoramento da palatabilidade da formulação e solubilidade em água, a fim de substituir o uso de solventes orgânicos tóxicos. A avaliação da foto-toxicidade da CUR neste capítulo foi realizada considerando diferentes parâmetros ambientais (tais como temperatura, iluminância solar e pH) e dois diferentes materiais de recipientes-teste (vidro e plástico). Além disso, foi possível discutir e compreender os mecanismos de ação dessas formulações e caracterizar as alterações morfológicas ocorridas nas larvas durante e após o tratamento com a CUR. O segundo capítulo mostra a segurança ambiental da CUR para o uso como um foto-inseticida. Assim, foram realizados ensaios de toxicidade aguda em organismos como *Danio rerio* (peixe-zebra) e *Daphnia magna* (um microcrustáceo de água doce), possibilitando a estimativa dos possíveis impactos ambientais da CUR no ambiente aquático. A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) pela exposição de CUR em *D. rerio* e *D. magna* também foi investigada. Adicionalmente, foram apresentadas as alterações morfo-histológicas e bioquímicas (através de biomarcadores de alterações metabólicas) provocadas pela atividade foto-larvicida da CUR sobre as larvas de *Ae. aegypti*, com o objetivo de elucidar seu mecanismo de ação. Por fim, o capítulo três, mostra os ensaios de ação foto-larvicida da CUR em criadouros reais de *Ae. aegypti* (validação da sua atividade em campo) localizados na cidade de São Carlos- SP, Brasil,

incluindo uma breve discussão sobre as possibilidades da CUR ser introduzida ao atual cenário de larvicidas, encerrando-se com o capítulo de conclusões gerais que resumem este trabalho durante os quatro anos de doutorado. Vale ressaltar que o projeto que originou esta tese foi contemplado em chamada pública pelo CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e Decit/SCTIE/MS (Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde), visando contribuir para o desenvolvimento de novas tecnologias e métodos para o controle de doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti*.

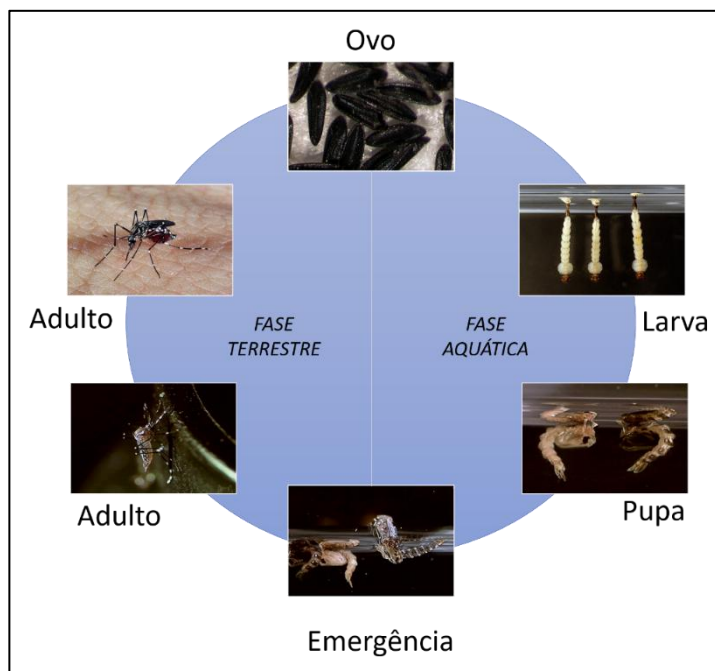
1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* (**Diptera: Culicidae**) é responsável pela transmissão de arboviroses como a Dengue (DEN), Zika (ZIK), Chikungunya (CHIK) e a febre amarela (FA). A distribuição geográfica do *Ae. aegypti* envolve regiões tropicais e semitropicais (1), incluindo a Ásia, a África, as Américas e a Oceania. É considerada a espécie de mosquito com maior grau de sinantropia (habilidade de certos animais silvestres de frequentar habitações humanas), se instalando quase que exclusivamente em regiões domiciliares e peridomiciliares. Desta forma, beneficia-se dos povoados humanos para repasto sanguíneo e, conseqüentemente para sua proliferação. No Brasil, acredita-se que sua introdução tenha acontecido durante o período colonial, através da circulação de navios negreiros entre as costas africanas e brasileiras (2,3).

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* é curto e dura em média de 30-35 dias podendo variar de acordo com fatores ambientais, tais como, temperatura, umidade e pluviosidade. Sabe-se que a população desse mosquito tende a crescer substancialmente com o aumento da pluviosidade (4,5,6). Basicamente, seu ciclo é composto por quatro fases bem definidas: ovos, quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupas e formas adultas (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Aedes aegypti*.



Fonte: Fotos de Genilton Vieira IOF/Fiocruz. Adaptado de <https://portal.fiocruz.br/>

As fêmeas ovadas depositam seus ovos nas laterais úmidas de recipientes artificiais e naturais (pneus, pingadeiras, garrafas, latas, sucatas, bromélias e outros materiais passíveis de acumular água), que permanecem ali aderidos por toda fase da embriogênese e eclosão das formas imaturas. A fase da embriogênese se completa no terceiro dia após a oviposição, mas pode se prolongar caso a temperatura esteja abaixo de 20°C (7). Curiosamente, o *Ae. aegypti* possui duas estratégias ecológicas de sobrevivência: a “oviposição em saltos” e ovos “super-resistentes” à dessecação, as quais auxiliam na expansão geográfica da espécie. Estudos genéticos e comportamentais mostraram que a “oviposição em saltos”, ou seja, o espalhamento dos ovos em diferentes pontos estratégicos, aumenta as taxas de sobrevivência e dispersão (8). Ademais, os ovos resistentes podem permanecer viáveis em estado de latência por até 450 dias em caso de condições ambientais adversas (9). Essas características biológicas podem dificultar as ações de controle e tentativa de erradicação, aumentando ainda mais os problemas de saúde pública provocados pelo *Ae. aegypti* (10).

Particularmente, as larvas do *Ae. aegypti* são aquáticas e se alimentam de detritos orgânicos e microrganismos depositados nos criadouros. Com uma dieta abundante e temperatura favorável (26-28°C) levam entre 7 e 10 dias para pupar. Dois tipos de comportamento alimentar são descritos para esta espécie: o tipo coletor-filtrador (traduzido do inglês *collecting-filtering*) e a coleta-reunidora (*collecting-gathering*). O primeiro tipo consiste em um mecanismo de filtração bem desenvolvido, cuja obtenção do alimento é mediada através de correntes aquáticas geradas por escovas bucais ricas em cerdas que carregam

partículas alimentares até a abertura bucal. Com isto, as larvas conseguem obter com facilidade as partículas soltas na coluna d'água. Já o modo de alimentação coleta-reunidora pode ser definido como a ressuspensão de partículas aderidas em superfícies através da ação das escovas bucais (11). Essa característica é pouco seletiva e despreza as propriedades qualitativas das partículas, o que favorece a ingestão de larvicidas químicos ou biológicos.

As formas pupais também habitam os ambientes aquáticos e marcam a transição entre o meio hídrico e o terrestre. É nesta forma que irá ocorrer as profundas metamorfoses, eliminando os órgãos larvais para a preparação da emergência do adulto. Nesta fase, as pupas não se alimentam e vivem cerca de 2 dias basicamente se locomovendo e respirando. A face dorsal do tórax permanece constantemente em contato com a superfície da água, enquanto o abdômen mantém-se submerso, o que facilita as trocas gasosas entre o organismo e o meio. A flutuação corporal na coluna d'água é possível devido à presença de uma bolha gasosa similar a uma "bóia", localizada entre os apêndices cefalotorácicos e abdominais (3).

Enquanto as larvas passam parte da vida se alimentando e crescendo, a função mais importante dos adultos é a reprodução e a dispersão da espécie. Após emergirem, os mosquitos procuram uma superfície para repousar enquanto ocorre o endurecimento das asas e do exoesqueleto. Os machos precisam repousar por até 24 h para que aconteça a rotação da genitália em 180° ao redor do eixo longitudinal do corpo. Após endurecer o tegumento corporal, as duas formas maduras estão prontas para a cópula, que acontece comumente durante o voo. A atração sexual ocorre pela frequência no batimento das asas, cujo macho possui o tom dos batimentos alares maior que o das fêmeas. Em relação a nutrição, os machos se alimentam basicamente de substâncias energéticas, como néctar de flores e de outras fontes de nectários. As fêmeas, por sua vez, praticam a hematofagia, para que haja a maturação dos ovos (3).

1.2 Importância epidemiológica do *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* é um importante vetor e reservatório de arbovírus, como o vírus da febre amarela (YFV), vírus da dengue (DENV), vírus ZIKA (ZIKV) e vírus Chikungunya (CHIKV). Esses vírus são derivados da Família Flaviviridae, gênero Flavivírus, com exceção do CHIKV, pertencente à Família Togaviridae, gênero Alphavírus (12). Atualmente, YFV, DENV, CHIKV e ZIKV são encontrados circulando em regiões tropicais e sub-tropicais, com destaque para Costa do Marfim e Sri Lanka (registrados DENV 1, 2 e 3), França (YFV),

Suriname (YFV), Índia (ZIKV) e Brasil (YFV, DENV, CHIKV e ZIKV) (13). Em 2015, o Brasil, registrou a maior epidemia de DEN da história, com 1.621.797 casos prováveis, onde a região Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo), apresentou 62% dos casos com relação ao total do país. Neste mesmo ano, foram identificados sequencialmente os seguintes sorotipos virais: DENV1 (93,8%), DENV4 (5,1%), DENV2 (0,7%) e DENV3 (0,4%) (14).

A febre amarela (FA) foi uma das primeiras doenças atribuídas ao *Ae. aegypti*, cuja primeira epidemia relatada no Brasil ocorreu em 1685 no Recife, Pernambuco, levando mais de 600 pessoas a óbito (15). A FA, por sua vez é uma doença viral aguda, não contagiosa, de gravidade variável, existindo em dois tipos: febre amarela silvestre (FAS), com transmissão em área rural ou florestas por *Haemagogus sp* e *Sabethis sp* e febre amarela urbana (FAU), que tem a transmissão pelo *Ae. aegypti*. A forma grave da doença caracteriza-se por quadros de insuficiência hepatorenal e coagulação intravascular disseminada, cuja letalidade é em torno de 50%, uma vez que não existe tratamento etiológico específico. Nas áreas endêmicas, a sintomatologia é leve ou moderada, apresentando manifestações como febre, mialgia, cefaleia, náuseas e alguns quadros hemorrágicos (16,17). De tempos em tempos, a FA reemerge no país, provocando surtos de magnitudes imprevisíveis. No último informativo epidemiológico, lançado pelo Ministério da Saúde, essa re-emergência ocorreu no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. Neste período, foram registrados cerca de 3.500 casos suspeitos de FAS, no entanto apenas 22% dos casos foram confirmados e 6% continuaram sob investigação. Estes registros foram realizados nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste. Neste mesmo período, um total de 7.064 primatas não humanos foram afetados pela FA. Os casos de FAU não são registrados no país desde 1942 (18).

O *Ae. aegypti* também é vetor da DEN, a mais importante arbovirose da atualidade. O homem é o único hospedeiro a desenvolver as formas clínicas da doença, sendo elas, a DEN clássica e a febre hemorrágica da DEN (FHD). A DEN clássica apresenta sintomas como febre alta, mialgia, cefaleia, artralgia e hemorragias leves, porém benigna. Por outro lado, a FHD pode ser fatal, começando com um quadro semelhante a DEN clássica e evoluindo rapidamente para manifestações hemorrágicas, derrames cavitários, instabilidade hemodinâmica e choque (19). Algumas teorias são descritas para a susceptibilidade em relação à FHD e, uma delas, é a teoria de infecções sequenciais de Halstead. Essa teoria sugere que a resposta imunológica de um indivíduo que contrair uma segunda infecção por DENV, após um período de 3 meses a 5 anos, é mais acentuada, resultando na forma mais

grave da doença. Por outro lado, a teoria de Rosen, relaciona os casos de FHD com a existência de cepas mais agressivas (virulentas). Hoje, são bem descritos na literatura quatro sorotipos virais de DEN, como mencionado acima. No entanto, há relatos da circulação de um mais recente sorotipo (DENV5) de transmissão silvestre, relacionado a casos mais graves da doença. O quinto sorotipo foi descrito por Normile *et al* (2013) e isolado pela primeira vez em Sarawak, na Malásia (20).

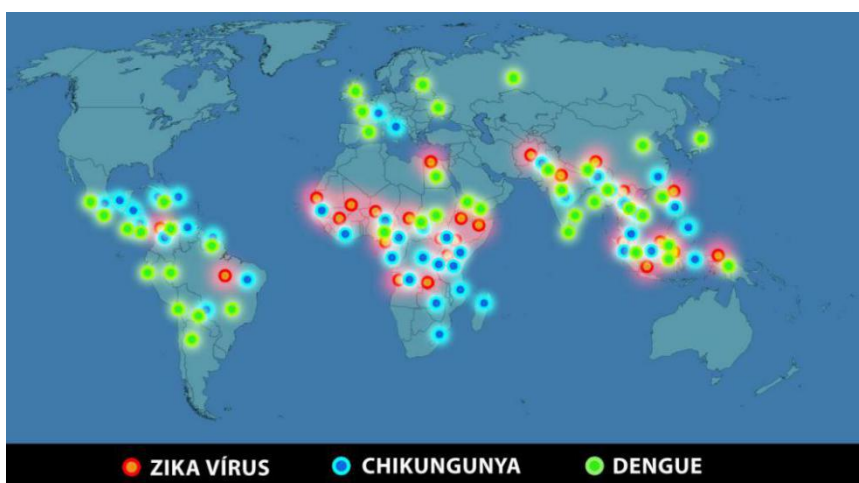
O ZIKV, também relacionado ao mosquito *Ae. aegypti*, foi isolado pela primeira vez em 1947, na floresta de Zika, localizada próximo a cidade de Entebbe na Uganda. O vírus foi isolado a partir de amostras de macacos Rhesus contaminados, que serviam de sentinelas para pesquisas sobre a FA. No ano seguinte, o mesmo vírus foi isolado de mosquitos *Ae. africanus* (21). Entre 1977 e 1978, foram registrados os primeiros casos da doença fora do continente africano, quando cerca de 30 pessoas foram internadas num hospital da Indonésia com sintomas de doença febril aguda (22). Nas Américas, a introdução do vírus ocorreu em 2014, com o relato de casos registrados na Ilha de Páscoa no Chile e, logo no ano seguinte, foram reportados os primeiros casos no Brasil (23). Neste último, de 2015 até o presente momento (março de 2019) foram reportados mais de 200 mil casos prováveis de febre pelo ZIKV. Apesar de parecer uma doença benigna, com sintomas gerais, tais como cefaleia, febre baixa, conjuntivite, mialgia e dores articulares, a doença pode evoluir para quadros mais graves, comprometendo totalmente o sistema nervoso central, ocorrendo síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa e meningite (24). Além disto, concomitantemente ao surto de ZIKV sucedido no Brasil em 2015, ocorreu um aumento substancial do número de recém-nascidos com microcefalia registrados pelo Sistema de Informação de Nascidos Vivos (Sinasc). O Ministério da Saúde confirmou a associação entre a infecção por ZIKV na gravidez e anormalidades fetais (25).

No Brasil, a circulação do CHIKV foi identificada quase que simultaneamente a circulação do ZIKV. A febre CHIK é uma doença febril aguda causada por um arbovírus do gênero *Alphavirus* e transmitida pelo *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Diferentemente do DENV, o CHIKV apresenta apenas um sorotipo viral, no entanto, no decorrer dos anos foram descritos três genótipos: Asiático; Leste-Centro-Sul Africano e Oeste Africano (26). O espectro clínico da doença apresenta similaridades com a DEN, cujos indivíduos infectados desenvolvem sintomas como febre, dores nas costas, cefaleia, fadiga, manifestações cutâneas, dor retro-ocular, calafrios, conjuntivite, faringite, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal e neurite. Muitas vezes, a doença pode evoluir para casos neurológicos mais graves, levando a

incapacitação articular e óbito. Em 2016 foram confirmados cerca de 150 óbitos por CHIK, afetando principalmente indivíduos com comorbidades e idade avançada (27).

A Figura 2 apresenta um mapa da distribuição global dos principais vírus transmitidos pelo *Ae. aegypti*.

Figura 2 – Circulação global dos vírus: Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) e dengue (DENV).



Fonte: Portal IOC/Fiocruz. Adaptado de <https://portal.fiocruz.br/>

1.3 Controle do *Aedes aegypti*

O controle do *Ae. aegypti* se tornou um dos maiores desafios em Saúde Pública, principalmente em regiões mais pobres e, conseqüentemente, mais afetadas. Mesmo com os esforços e verbas atribuídas ao controle deste vetor, alguns sistemas ainda são precários e contribuem para o aumento dos índices de organismos imaturos (larvas e pupas). Tais sistemas, como o de saneamento básico, abastecimento de água, coleta de lixo e infraestrutura das cidades, interferem frequentemente nestes índices, comprometendo os métodos tradicionais de controle (28,29). A falta de comprometimento da sociedade na eliminação de possíveis criadouros, também influencia no aumento da população de vetores.

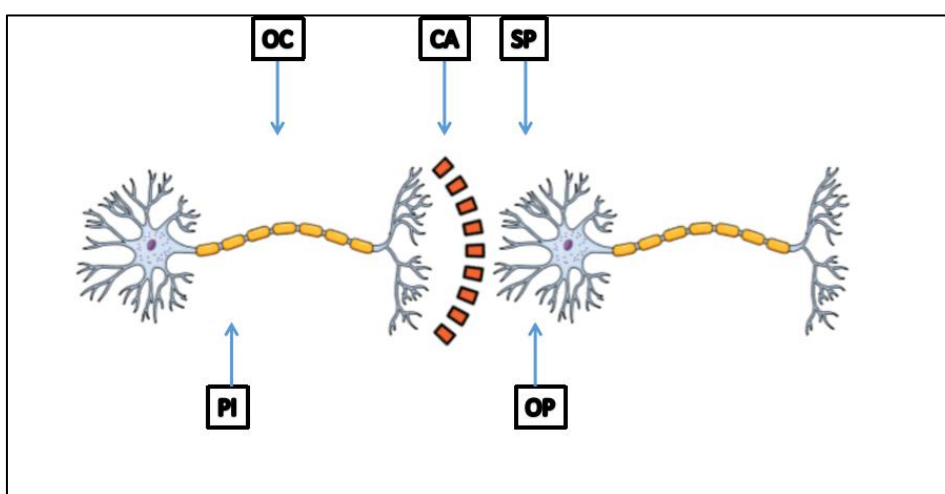
Os métodos tradicionais de controle, por sua vez, consistem na aplicação de inseticidas químicos em locais de reprodução dos mosquitos e na eliminação mecânica dos mesmos. O controle químico com inseticidas (orgânicos ou inorgânicos) é uma das estratégias mais adotadas no mundo e, até o momento, quatro classes são recomendadas pela OMS, sendo elas: organoclorados (OC), piretróides (PI), carbamatos (CA), organofosforados (OP) e, mais recentemente as espinosinas (SP) (30). Na década de 40, os OC's (inseticidas que contêm

carbono, hidrogênio e cloro) como, por exemplo, o dicloro-difenil-tricloroetano, conhecido como DDT, foram amplamente utilizados em programas que visavam a erradicação da FA. No entanto, logo foram substituídos pelos OP's (inseticidas que contém fósforo), devido ao aparecimento de mosquitos resistentes. Outro fator que levou à substituição do DDT foi a sua longa persistência no meio ambiente, causando grandes problemas de impacto ambiental e acumulando-se nos tecidos animais (3). O modo de ação do OC's e PI's são similares e atuam no canal de sódio, mantendo-o aberto e interferindo na transmissão axônica (desequilíbrio entre íons sódio e potássio) (30,31).

Os CA's são inseticidas derivados do ácido carbâmico e, assim como os OP's atuam na transmissão sináptica (Figura 3). Ambos, são responsáveis pela inibição da acetilcolinesterase (AChE), importante enzima do sistema nervoso central. O resultado da inibição de AChE é a acumulação de acetilcolina na fenda sináptica, impedindo a transmissão do impulso elétrico. A diferença entre o modo de ação entre CA's e OP's é que essa descompensação de impulsos elétricos é reversível sob ação dos CA's (30, 31).

As SP's, por sua vez, também são inseticidas neurotóxicos e apresentam ação sobre os receptores nicotínicos da acetilcolina, abrindo os canais de sódio e, conseqüentemente, levando a uma hiper-excitação do sistema nervoso, provocando a morte do inseto (32).

Figura 3 – Classes de inseticidas neurotóxicos e sua atuação nos neurônios: transmissão axônica (OC, PI) e transmissão sináptica (CA, OP, SP).



Fonte: Adaptado de Valle *et al* (2015) (31), utilizando a plataforma Mind the Graph.

Além da área da Saúde, inseticidas químicos são utilizados com frequência na agricultura e na agropecuária contra insetos pragas. Com o uso contínuo e indiscriminado de todas as classes citadas, hoje temos registros do aparecimento de populações resistentes em

todas elas, facilitando assim a re-emergência de doenças transmitidas por vetores (33). Resumidamente, podemos dizer que indivíduos resistentes, mesmo que em baixa proporção, já existem naturalmente no ambiente e o inseticida apenas exerce uma forte pressão seletiva sobre esses indivíduos. O uso contínuo dessas substâncias irá eliminar toda a população de susceptíveis, sobrando apenas organismos resistentes. Se não ocorrer a migração entre essas populações (resistentes e susceptíveis), o inseticida irá perder a eficácia de forma irreversível (34). Alguns mecanismos envolvidos na resistência são bem descritos na literatura e envolvem: a baixa taxa de penetrabilidade pelo exoesqueleto (ou cutícula), detoxificação metabólica aumentada e diminuição da compatibilidade do sítio-alvo (35). De acordo com Valle *et al* (2015), a solução para isto é usar a integração de inseticidas com diferentes mecanismos de ação e, acima de tudo, dar prioridade às ações de eliminação mecânica dos criadouros (31).

Além da pressão seletiva, outras desvantagens são observadas para os inseticidas neurotóxicos, como o acúmulo em tecidos animais, associação com a ocorrência de câncer em humanos, alta toxicidade em organismos não-alvos e elevada ação desalojante (31). Devido a isto, novas classes de inseticidas começaram a ser exploradas na tentativa de minimizar esses efeitos adversos. Cronologicamente, podemos citar a introdução de bactérias entomopatogênicas, como o *Bacillus thuringiensis var israelenses* (Bti) e a bactéria *Wolbachia pipientis*, alguns inseticidas reguladores de crescimento (IRC's) e, mais recentemente, princípios ativos derivados de produtos vegetais. O Brasil é um forte aliado na busca por compostos ativos naturais, apresentando uma das floras mais ricas em biodiversidade do mundo.

O Bti, por exemplo, apresenta ação larvicida contra um amplo espectro de insetos, tais como o *Aedes sp*, *Anopheles sp*, *Culex sp*, *Simulium sp* e *Chironomídeos sp* (36,37). Seu mecanismo de ação consiste na produção, por esporulação, de cristais sólidos compostos por toxinas inseticidas pertencentes a Família Cry e Cyt. Após as larvas ingerirem esses cristais, eles serão solubilizados e clivados em meio alcalino do intestino, ocorrendo a liberação e a ativação de toxinas. As toxinas por sua vez irão se ligar seletivamente a receptores celulares provocando um desequilíbrio osmótico das células, resultando na degradação do epitélio intestinal (38,39). No Brasil, larvicidas biológicos como o Bti, foram empregados pela primeira vez em 1982 no Rio Grande do Sul contra simulídeos, insetos conhecidos popularmente como “borrachudos” (40). Hoje, são amplamente utilizados em várias regiões para controle de criadouros do *Ae. aegypti*. Apesar do Bti apresentar um bom perfil tóxico e

baixo risco de pressão seletiva, possuem maior sensibilidade a radiação solar e a ambientes com alta carga de matéria orgânica (37). Isto faz com que formulações a base de Bti apresentem baixa persistência, exigindo um número alto de reaplicações.

Por último, podemos citar os IRC's como uma das alternativas empregadas hoje contra larvas do *Ae. aegypti*. Os mais utilizados e recomendados pela OMS são: o diflubenzuron, o novaluron (inibidores da síntese de quitina) e o Piriproxifeno (análogo de hormônio juvenil). Estes compostos, diferente dos inseticidas neurotóxicos, não provocam a morte imediata do inseto e atuam especialmente na fase imatura (larvas) (41). No entanto, há relatos na literatura da sua ação em mosquitos adultos, que sobreviveram a doses subletais e emergiram com depreciação no *fitness* (42,43,44).

Normalmente os IRC's são empregados na fase de desenvolvimento larval dos insetos, pois interferem diretamente no processo de ecdise, ou seja, na troca de estádios larvais. Neste processo, há a produção de dois hormônios envolvidos no crescimento: o hormônio juvenil (HJ) e o ecdisteróide 20-hidroxiecdisonio (20-E). O 20-E induz processos metabólicos que atuam na ecdise, enquanto o HJ, regula a formação de estruturas típicas da fase jovem, impedindo a diferenciação para a fase adulta (45). Com isto, a aplicação de IRC's irá interferir nestes processos, provocando danos morfológicos irreversíveis, levando o inseto a morte (46).

Desde 2009, no Brasil, é feito o uso dos IRC's para o controle de larvas do *Ae. aegypti*, no entanto, grupos de pesquisas que monitoram o aparecimento de cepas resistentes, recomendam urgentemente o rodízio de produtos alternativos com diferentes mecanismos de ação (31). Com isto, a comunidade científica vem intensificando os esforços para descobrir novos compostos e métodos para a eliminação de larvas do *Ae. aegypti*, como por exemplo, o uso da inativação fotodinâmica.

1.4 Inativação fotodinâmica e o controle de vetores

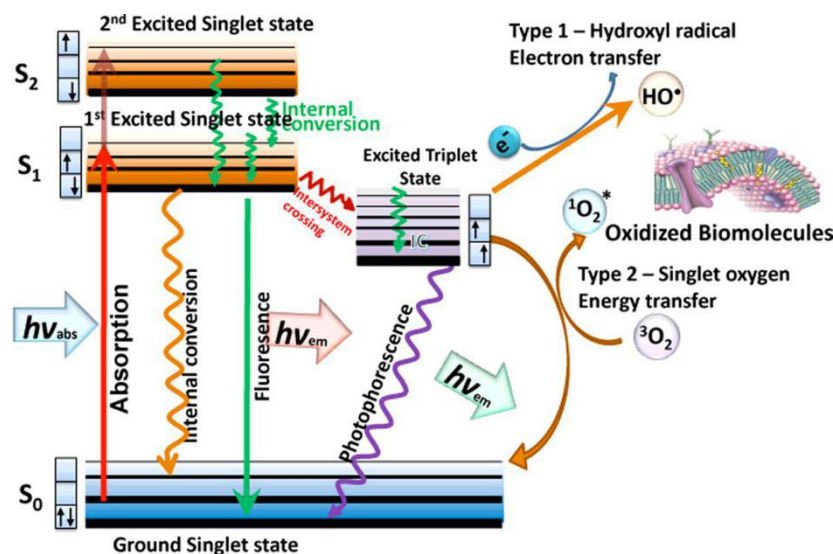
A Inativação Fotodinâmica (IFD) é uma técnica promissora para eliminação de microrganismos patogênicos, como bactérias, fungos, leveduras e vírus. Podemos nomeá-la também como Terapia Fotodinâmica (TFD), quando seu uso é voltado para o tratamento de diferentes doenças, como o câncer e outras aplicações clínicas (47). A IFD caracteriza-se pela administração de uma fonte de luz (visível e de comprimento de onda específico), um agente intermediário, como fotossensibilizadores (FSs), e oxigênio molecular (O_2) - o agente oxidante. Quando o FS é irradiado com luz, um elétron é excitado, passando do estado

fundamental (configuração de menor energia) para o estado excitado (estado eletrônico de maior energia e de curto tempo de vida). Com isto, ele pode retornar ao seu estado fundamental, emitindo fluorescência, ou ir para um estado metaestável. A partir daí, a molécula pode transferir energia para outros constituintes do meio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas (48,49).

A produção de EROs pode ocorrer via dois mecanismos: mecanismo tipo I e mecanismo tipo II. O **mecanismo tipo I**, também chamado de via de transferência de carga, é um mecanismo onde ocorre a transferência de elétrons ou prótons entre as moléculas do meio (FS e substrato), formando radicais livres, que por sua vez reagem com oxigênio, originando espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH). Por outro lado, o **mecanismo tipo II**, ocorre quando o FS no estado tripleto metaestável transfere energia ao oxigênio molecular no estado fundamental, originando um estado excitado singleto (1O_2) (50).

Os processos fotofísicos envolvidos na IFD e seu mecanismo de ação é apresentado na Figura 4, através da representação esquemática do diagrama de Jablonski.

Figura 4 – Diagrama de Jablonski. Quando um FS absorve luz, um elétron passa de um estado fundamental de baixa energia para um estado singleto excitado de alta energia. Este estado excitado pode perder energia emitindo fluorescência ou através de conversões de energia interna. O processo denominado “cruzamento intersistema”, envolve a mudança de configuração de spin dos elétrons de alta energia, levando a um estado tripleto excitado de longa duração (10⁻³ a 10 segundos). Isto aumenta a possibilidade do FS interagir com moléculas vizinhas na presença de oxigênio e originar radicais superóxido e hidroxila (via mecanismo tipo I) ou oxigênio singleto (mecanismo tipo II), capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas.



Fonte: Silva *et al* (2015) (51)

O uso de processos fotoquímicos para a eliminação de larvas de mosquitos começou a ser explorado na década de 20, por Barbieri *et al* (1928) (52). Este autor, avaliou os efeitos tóxicos de derivados de xanteno sobre larvas de *Anopheles sp* e *Aedes sp*, mostrando sua alta atividade biocida na presença de luz. Em 1987, estudos envolvendo essas moléculas continuaram a ser desenvolvidos por Heitz *et al* (1987) (53), entretanto, sua aplicação foi bastante questionada devido à sua baixa estabilidade na presença de luz. Entre os anos de 1987 e 1995, a “*American Chemical Society*” publicou três volumes em simpósio sobre a atividade de pesticidas ativados por luz. Desde então, as investigações de novas moléculas passaram a ser esporádicas e com foco maior no desenvolvimento daquelas derivadas de porfirina. A multiplicidade de bandas de absorção no espectro UV-visível das porfirinas permite que sejam eficientemente ativadas por luz branca ou em faixas de comprimento de onda selecionadas (54,55).

A Tabela 1, mostra uma lista de moléculas avaliadas quanto ao seu potencial foto-inseticida ao longo dos últimos anos.

Tabela 1 – Moléculas com propriedades fotossensíveis com alto potencial larvicida.

Tipo de FS	Mosquitos	Referências
Clorina e-6 (em nanopartícula de γ - FE_2O_3)	<i>Aedes aegypti</i>	Magro <i>et al</i> (2019) (56)
α - terthiophene	<i>Aedes aegypti</i>	Zhang <i>et al</i> (2019) (57)

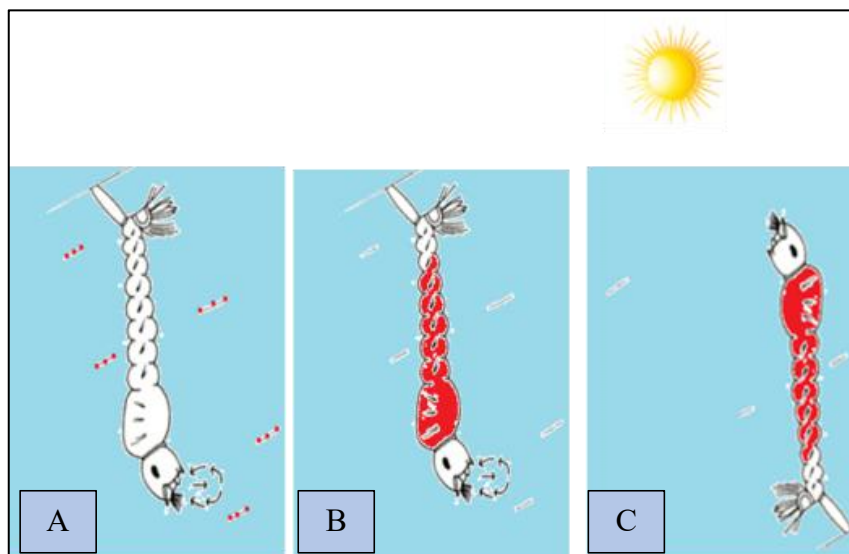
Curcuminóides	<i>Aedes aegypti</i>	de Souza <i>et al</i> (2019) (58)
Ftalocianinas e fluoresceínas halogenadas	<i>Aedes aegypti</i>	Shin-Hong <i>et al</i> (2018) (59)
Eosina azul de metileno	<i>Aedes aegypti</i>	Lima <i>et al</i> (2018) (60)
Rosa Bengala, Floxina B e Rodamina B	<i>Culex pipiens</i>	El- shourbagy <i>et al</i> (2018) (61)
Derivado de hematoporfirina (Photogem®)	<i>Aedes aegypti</i>	de Souza <i>et al</i> (2017) (62)
Porfirina	<i>Anopheles arabiensis</i>	Fabris <i>et al</i> (2012) (63)
Clorofilina e Feoforbid	<i>Culex spp</i>	Wohllebe <i>et al</i> (2009) (64)
Hematoporfirina	<i>Culex pipiens</i>	Awad <i>et al</i> (2008) (65)
Clorofilina	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Dondji <i>et al</i> (2005) (66)

Fonte: elaborado pela autora

De acordo com a literatura, podemos descrever em alguns passos um breve resumo dos protocolos aplicados à inativação fotodinâmica sobre larvas de vetores (Figura 5):

- (i) Larvas de diferentes espécies de mosquitos são criadas em laboratórios ou coletadas em campo;
- (ii) Ao atingirem o terceiro estágio são expostas aos FS's e deixadas no escuro para internalizarem essas moléculas;
- (iii) Após a ingestão dos FS's (em solução ou incorporados a iscas como açúcares, leveduras ou rações), as larvas são irradiadas com fontes de luz natural ou artificial (com comprimento de onda específico para a ativação do FS utilizado);
- (iv) A seguir, são monitoradas as taxas de mortalidades ou calculada a concentração letal média (LC_{50-24h}), ou seja, a concentração ideal para matar 50% dos organismos expostos ao FS em 24 horas (67).

Figura 5 – Ilustração esquemática dos ensaios de IFD em larvas de insetos vetores. Primeiramente (quadro A), as larvas ingerem o FS que se acumula preferencialmente no intestino médio (quadro B). Após isto, o FS é ativado por luz solar provocando a morte do inseto (quadro C).



Fonte: Adaptado de Clements (1992).

Apesar das grandes diferenças nos protocolos experimentais encontrados na literatura, podemos dizer que todos esses trabalhos deram suporte para um melhor entendimento dos mecanismos de ação de um agente foto-larvicida. Assim, há o interesse em relação ao sítio-alvo envolvido na ação fotodinâmica. Estes estudos, por sua vez, mostraram que as membranas do intestino médio são os principais alvos afetados pela fotodegradação e, à medida em que o FS se difunde para outras regiões, ele pode afetar também outras membranas, como por exemplo, a bainha neuromuscular. Outros relatos foram feitos em relação às alterações na permeabilidade das membranas, cuja ação do FS provocou um desequilíbrio nos níveis de potássio na hemolinfa. Além disso, a exposição à essas moléculas também ocasionou a depreciação do *fitness* do mosquito adulto, comprometendo principalmente a fecundidade dos ovos e as taxas de oviposições por fêmeas (68).

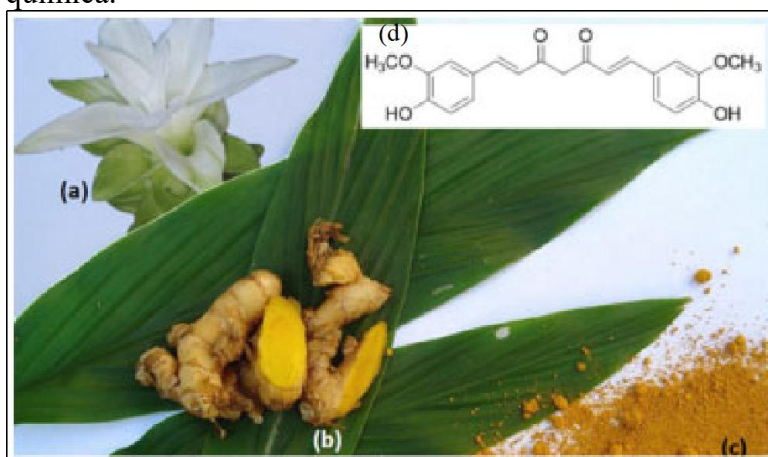
Inseticidas que atuam através de vias fotodinâmicas, parecem claramente possuir várias características favoráveis em relação aos inseticidas convencionais. Podemos citar como principal vantagem, a baixa ou nenhuma toxicidade no escuro para a maioria dos sistemas biológicos. A baixa persistência ambiental também pode ser considerada um ponto positivo: uma vez que essas moléculas entram em contato com altas doses de luz, elas sofrem rápida degradação, o que minimiza o impacto no meio ambiente. Outra vantagem para o uso desses compostos é, que até o momento, não foi registrado a foto-indução de resistência (68). Quando o FS é ativado por luz, irá desencadear a formação de poderosos radicais oxidativos capaz de inativar várias moléculas vitais simultaneamente, favorecendo consideravelmente a

diminuição de pressão seletiva para resistência. Essas vantagens, portanto, agregam ainda mais valor ao uso desses compostos para o controle de vetores no mundo real.

1.5 Curcumina e suas propriedades larvicida

A curcumina é um pigmento curcuminóide de coloração amarela presente no turmérico da *Curcuma longa* Linn, um arbusto perene representante da Família Zingiberacea (Figura 6). Sua estrutura química foi descrita pela primeira vez em 1910 por Lampe e Milobedeska, apresentando a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$ e peso molecular de 368,4 g. A curcumina é considerada um composto polifenólico, com características hidrofóbicas, porém solúvel em etanol e DMSO (dimetilsufóxido) (69).

Figura 6 – *Curcuma longa* L. (a) Cúrcuma com inflorescência; (b) turmérico; (c) rizoma seco moído; (d) estrutura química.



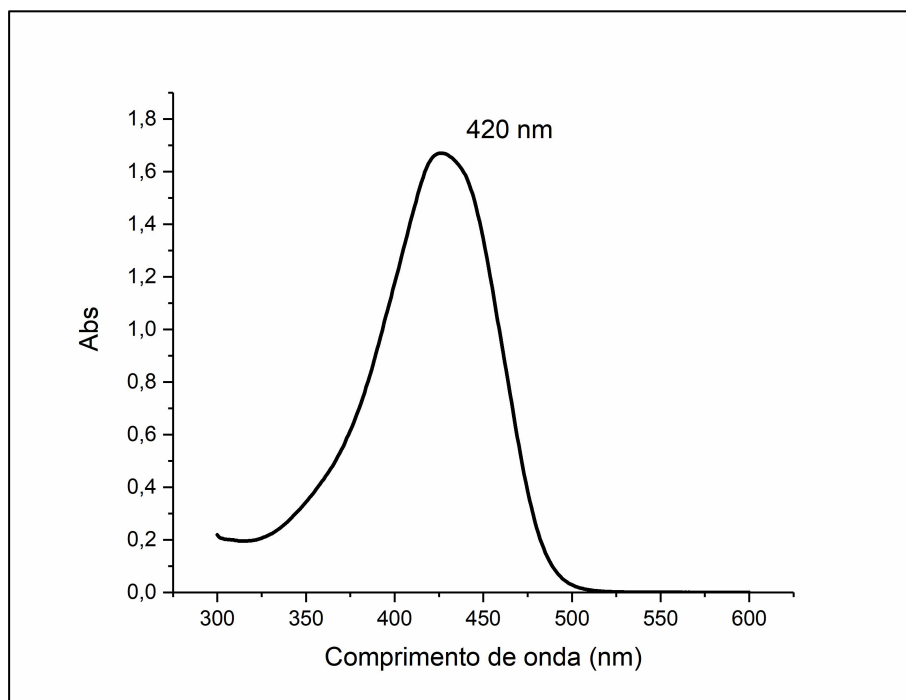
Fonte: Vitor Sueth-Santiago, 2015 (69)

Na Índia, a *C. longa* L, ou simplesmente cúrcuma, foi amplamente difundida e cultivada para o uso em medicina e culinária. Apesar da cúrcuma apresentar outros pigmentos curcuminóides em sua composição, como a demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina, a curcumina é o principal constituinte ativo da planta, apresentando fortes propriedades biológicas como: atividade anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, antibacteriana e antifúngica (70, 71). Um turmérico de *C. longa* pode conter até 8 mg/100 g de pigmentos curcuminóides, no entanto, essa concentração pode variar de acordo com as características do solo e da região em que a herbácea foi plantada. No Brasil, a *C. longa* é facilmente cultivada devido às condições tropicais do país. O desenvolvimento ótimo geralmente se dá em altitude

média de 1500 metros e condições de temperatura entre 20 a 30° C. Nessas condições é possível chegar a uma produtividade entre 30 e 50 toneladas por hectare de cúrcuma (72). Hoje, é possível encontrar com frequência nos mercados, o extrato seco da planta, constituído em quase sua totalidade por curcuminóides, numa proporção de: 77% de curcumina, 17% de demetoxicurcumina e apenas 3% de bis-demetoxicurcumina.

Além de todas as propriedades terapêuticas e biológicas, a curcumina atualmente é associada ao uso da luz para potencializar seus efeitos via inativação fotodinâmica (IFD). Por ser considerada um agente fotossensibilizador (FS), esta molécula é capaz de absorver luz e, na presença de oxigênio, originar espécies reativas capazes de destruir um amplo espectro de microrganismos patogênicos, tais como *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras (73,74). Nesta abordagem, a curcumina também tem se mostrado promissora no tratamento de faringotonsilites, onicomicose, desinfecção bucal, descontaminação de biofilmes e, mais recentemente, na eliminação de larvas do *Ae. aegypti*. Em IFD, a curcumina é geralmente irradiada com luz azul num comprimento de onda de 420 nm, por apresentar um pico máximo nesta região (Figura 7) (75,76).

Figura 7 – Espectro de absorção da curcumina em DMSO e etanol com pico máximo em 420 nm.



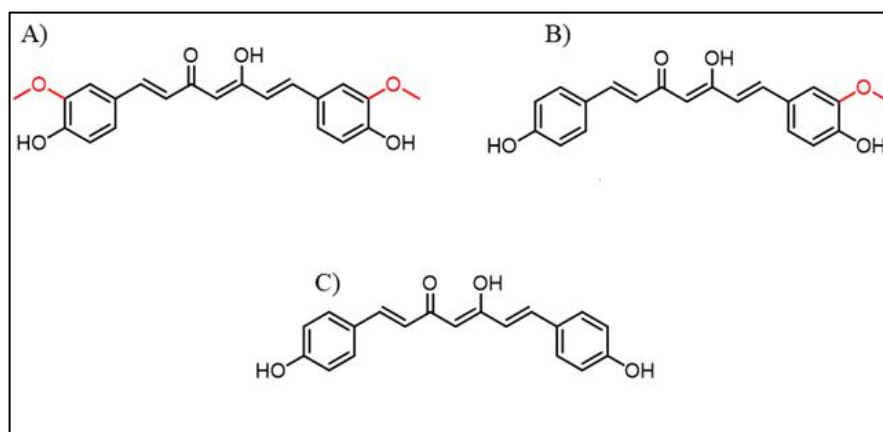
Fonte: Elaborado pelo autor

Até o momento não há relatos de toxicidade da curcumina ao homem e animais, mesmo quando ela é utilizada em doses de até 12 g ao dia. Estudos realizados em roedores mostraram que a curcumina administrada via oral possui baixa biodisponibilidade. A sua rápida glucorização hepática, uma fase importante dos mecanismos de desintoxicação, melhora as propriedades hidrofílicas da molécula, fazendo com que ela seja rapidamente metabolizada e eliminada (77). A ausência de toxicidade pode ser um grande diferencial em relação ao uso clínico. No entanto, a curcumina ainda apresenta alguns entraves para ser implementada como FS nesta área, como por exemplo, sua baixa solubilidade em meio hidrofílico e alta instabilidade na presença de luz (78).

Por outro lado, o uso da curcumina se mostrou promissor em aplicações não-clínicas, se destacando principalmente na área de controle ambiental de vetores. Sagnou *et al* (2012) foram os pioneiros nos estudos de atividade larvicida com pigmentos curcuminóides isolados de *C. longa L.* Os três pigmentos curcuminóides foram isolados e separados de um extrato de cúrcuma comercial e avaliados sobre larvas de *Culex pipiens*, principal vetor da filariose. Dentre eles, a curcumina foi quem apresentou melhor potencial larvicida, com valor de LC_{50-24h} de 19.07 mg.L^{-1} , enquanto os demais curcuminóides, apresentaram valores de LC_{50-24h}

superiores a 150 mg.L^{-1} . Os autores sugerem que o padrão de substituição no anel aromático dos três curcuminóides influenciou a ação larvicida (Figura 8). Além disso, mostraram também a importância da presença de grupos hidroxila e metoxila para um bom desempenho da molécula (79).

Figura 8 – Estruturas químicas dos três pigmentos curcuminóides (análogos estruturalmente). (A) Curcumina, dois grupos metoxila, (B) Desmetoxicurcumina, um grupo metoxila e (C) bis-desmetoxicurcumina, nenhum grupo metoxila.



Fonte: Adaptado de Souza e colaboradores, 2019 (58).

Outros extratos de plantas pertencente à Família Zingiberaceae também foram testados contra o *Ae. aegypti*, como os extratos de *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma heyneana* e *Curcuma mangga*. No entanto, nenhum deles apresentou atividade larvicida superior à curcumina. Dentre eles, o extrato hexano de *C. xanthorrhiza* foi o que mostrou melhor atividade, com valor de LC_{50-24h} de $26,4 \mu\text{g/mL}$, seguido do éter de petróleo de *C. heyneana*, com valor de LC_{50-24h} de $34,9 \mu\text{g/mL}$. O extrato de *C. mangga* mostrou-se pouco tóxico em relação aos demais extratos, com valor de LC_{50-24h} superior a $100 \mu\text{g/mL}$ (80).

Diante das propriedades altamente tóxicas da curcumina sobre larvas de importantes vetores de arboviroses para o homem, o grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, vêm trabalhando através da inativação fotodinâmica para o aprimoramento e disponibilidade desta substância aos programas de controle de endemias. Em 2015, o projeto que originou esta tese, que engloba estudos da foto-atividade da curcumina sobre larvas do *Aedes aegypti* foi contemplado em chamada do CNPq, em conjunto com a CAPES e o Decit/SCTIE/MS (Anexo A). O objetivo da chamada foi apoiar e financiar projetos que poderiam contribuir significativamente para o desenvolvimento científico e tecnológico do Brasil, com foco na

prevenção e combate ao vírus ZIK. Com isto, toda a elaboração, execução e o potencial dos resultados gerados neste projeto serão apresentados e discutidos aqui.

1.6 Justificativa

Dentro da temática da “entomologia médica”, os mosquitos pertencentes à Família Culicidae, como o *Aedes aegypti*, têm atraído com frequência à atenção dos órgãos de Saúde Pública. Esses artrópodes, são responsáveis por transmitir graves doenças como a FA, CHIK, DEN e ZIK. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 390 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus da DEN anualmente e que mais de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, o que coloca quase 1/3 da população mundial sob o risco de contrair a doença. Hoje, um dos principais métodos de controle deste vetor é através da aplicação de inseticidas químicos, como os organofosforados (OP), piretróides (PI) e carbamatos (CA). No entanto, o uso intenso desses compostos ao longo dos anos resultou em forte pressão de seleção em várias fases do ciclo de vida do inseto, minimizando ou anulando a eficácia destes inseticidas. Assim fica claro que as estratégias adotadas pelos órgãos públicos, até o momento, não são capazes de atender às necessidades de um controle eficaz, fazendo-se necessário e urgente a adoção de novas medidas, incluindo a investigação de novos compostos contra populações do *Ae. aegypti*. Além disso, possíveis riscos ambientais provocados por novas moléculas devem ser investigados previamente a fim de garantir a segurança de um novo produto.

Dentro deste contexto, o presente estudo avaliou a foto-eficácia da curcumina, sobre populações do *Ae. aegypti* como uma alternativa eficaz e segura ao uso dos inseticidas convencionais. A avaliação da atividade desta molécula foi realizada em condições de semi-campo em cepas Rockefeller e validada em populações de campo da cidade de São Carlos, SP-Brasil. Adicionalmente, foram investigados os mecanismos de ação dessas moléculas como foto-larvicida através de estudos das alterações morfo-histológicas e outras análises por espectroscopia Raman. Componentes do metabolismo oxidativo de larvas expostas a doses parcialmente letais de curcumina também foram avaliados, bem como o efeito dessas moléculas em organismos não-alvos (peixes e microcrustáceos). Assim, esperamos que estes resultados possam apresentar aos órgãos públicos uma nova modalidade de larvicidas altamente eficaz para o uso integrado, segura e principalmente interessante às questões socioeconômicas, considerando-se o baixo custo de síntese da molécula em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos fototóxicos da curcumina (*Curcuma longa L.*) sobre larvas de *Aedes aegypti* em condições de campo simulado e validar sua atividade em populações de campo da cidade de São Carlos, SP- Brasil, indicando a inativação fotodinâmica (IFD) como uma modalidade eficaz e segura para o controle de doenças transmitidas por vetores.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as propriedades foto-larvicida da curcumina conjugada à dois diferentes tipos de açúcares (sacarose e D-manitol) sobre larvas de *Ae. aegypti*;
- b) Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na ação fotodinâmica sobre o intestino médio de larvas de *Ae. aegypti* por Espectroscopia Raman;
- c) Estimar a toxicidade aguda da curcumina em diferentes meios (etanol + DMSO, sacarose e D-manitol) e avaliar biomarcadores de toxicidade em *Daphnia magna* e *Danio rerio*;
- d) Caracterizar a atividade biológica da curcumina em larvas de *Ae. aegypti*, utilizando biomarcadores de alterações metabólicas, como a enzima catalase (CAT) e a glutathiona reduzida (GSH);
- e) Identificar e caracterizar as possíveis alterações morfológicas das larvas expostas à curcumina, visando elucidar o mecanismo de ação dessa molécula sobre as larvas de *Ae. aegypti*;
- f) Validar a eficácia da curcumina em D-manitol em populações de campo do *Ae. aegypti* da cidade de São Carlos, SP- Brasil.

g) Avaliar a carga microbológica encontrada nos criadouros de campo após o tratamento com curcumina em D-manitol, a fim de prever o impacto dessa formulação no micro-ambiente.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1: Comparison of two photoactivatable formulations containing curcumin for *Aedes aegypti* larvae control using photodynamic process

Comparison of two photoactivatable formulations containing curcumin for *Aedes aegypti* larvae control using photodynamic process

Larissa Marila de Souza^{1,2}, Francine Perri Venturini², Natalia Mayumi Inada², Matheus Garbuio^{1,2}, Ievgeniia Iermak², Kleber Thiago de Oliveira³, and Vanderlei Salvador Bagnato²

¹ Federal University of São Carlos, PPG Biotec, São Carlos 13565-905, São Paulo, Brazil

² São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos 13560-970, São Paulo, Brazil

³ Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos 13565-905, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

E-mail: larissamarila@hotmail.com (LMS)

ABSTRACT

Combating the *Aedes aegypti* vector is one of the most appropriate manners to control various diseases mediated by it. Dengue, Zika, chikungunya, among others, are diseases considered as very serious due to the impact in the public health system and the after-effects present in affected people. Despite several initiatives are in progress effective vector fighting is still a big challenge. Herein we show the new achievements of our studies in semi-field with the use of curcumin in two different formulations for wide use and larvae control by using photodynamic process. The combination of sucrose or D-mannitol together with curcumin, shows a very good efficiency for this purpose compared to the previous studies using no formulation. The formulation developed here works allied to sunlight and the photodynamic action on larvae with improved mortality. Different formulations were developed showing very low LC_{50-24h} values (0.01-0.11 mg.L⁻¹) and the use of Raman microscopy as a primary technique for molecular investigation in order to understand better the mechanism of larval mortality. The use of formulations with sucrose and D-mannitol is discussed, as well as the superiority of the use of D-mannitol formulations.

Keywords: Curcumin; Curcuma longa; Photolarvicidal; *Aedes aegypti*; Vector control; Raman analyzes

Financial Support: This work was funded by CAPES/MEC-, CNPq/MCTI e Decit/SCTIE/MoH (Grant No.: 44058520163), São Paulo Research Foundation – FAPESP-VSB (Grants Nos.:2009/54035-4 (Confocal Microscope),2013/07276-1 (Optics and Photonics Research Center – CePOF-VSB, 2018/00106-7 - KTO), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES – LMS

AUTHOR SUMMARY

Mosquitoes are the main responsible for disease dissemination in the world. *Aedes aegypti*, e.g, is a species of major medical importance, transmitting diseases such as Zika, Dengue, Chikungunya and Yellow Fever. Dengue is one of the vector-borne diseases that is still growing, making more than 390 million victims a year. Unfortunately, vector control is neglected, and the continued use of chemical insecticides has selected resistant insect populations. Taking this into account, our research group proposes the use of photosensitive substances, known to present a mechanism of action differentiated in relation to traditional larvicides, in an attempt to reduce the transmission of diseases through photodynamic control of *Ae. aegypti*. Here we present the high photo-larvicidal potential of curcumin, a pigment extracted from roots of *Curcuma*, under semi-field conditions, in high and low sun exposure. In addition, through photonic techniques, we revealed the target sites of this molecule in the presence of two sugary attractive and reported great destruction of the larvae midgut after their ingestion. It can be said that a new class of larvicides is on the rise and represents an alternative to traditional methods, presenting as main advantage the reduction of resistant populations and environmental toxicity.

1 INTRODUCTION

Dengue (DEN), Zika (ZIK) and Chikungunya (CHIK) are diseases sharing the same main vector: the *Aedes aegypti* mosquito. Dengue is the most relevant arboviruses, leading to high morbidity and mortalities rates, especially in the tropical and sub-tropical regions. In 2015, Brazil presented the highest levels of DEN cases, when around 1.5 million people were infected, and 839 died [1]. In 2016, an emergency state was settled due to ZIK virus spread, causing high impacts on the public health system in Brazil and around the world, since it is closely related to newborn microcephaly and Guillain-Barré syndrome [2,3].

Prior to 1930, mechanical removal of mosquitoes breeding sites was effective [4], considering the low density of urban areas; however, seeing the exponential world population increase, this method has become inefficient. In order to overcome this issue, the use of synthetic insecticides was pivotal to fight these serious multiple diseases vectors. Despite all the benefits brought by these chemicals, their indiscriminate use lead to severe consequences to human health and non-target biota [5,6]. Including in such effects, there is the selection of resistant organisms, significantly reduced the efficacy of conventional insecticides [7]. As a consequence, the increase of these diseases incidence, together with the restrictions for the use of larvicides, place an important challenge for this problem.

Considering the unsuccessful strategies employed in the battle against ZIK, DEN and CHICK vector, combined with the absence of vaccines, the development of novel protocols is of great interest aiming *Ae. aegypti* control. One of these original approaches is the use of photoactivatable molecules, or photo-larvicides. Recent studies present their potential in vector control [8], besides being environmentally friendly and diminishing the raise of resistant mosquito populations. To the best of our knowledge, there are no reports on photo-resistance induced by photo- activatable molecules, and the oxidative reactions caused by them.

Briefly, these photo-larvicides absorb visible light, producing highly reactive singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which drastically affects biological systems, killing cells, microorganisms and larvae [10]. In insects, the first photo-damaged target is the membranes of the midgut [11,12,13], preventing feeding and often leading to the organism death [14]. A variety of biological molecules (proteins, lipids, steroids) are also important targets of the photoinduced oxidations [9].

There are many literature reports on photosensitizer molecules tested for vector control, ranging from food additives (curcuminoids [8], chlorophyll, chlorophyllin and derivatives [15]) to those employed on photodynamic therapy: hematoporphyrin IX (HpIX), hematoporphyrin derivatives (Photogem[®]) and 5-aminolevulinic acid (5-ALA) [13,16,17,18]. Usually, phototoxicity of these compounds is directly related to their hydrophobic potential, and molecules presenting this characteristic are good candidates to become photo-insecticides. Amphiphilic or hydrophobic compounds favor the interaction with lipid membranes, efficiently transposing the hydrophobic matrix. Hydrophilic photosensitizers must be bio-engineered to be effective in this area and easily diffuse through cellular tissues [9]. However, not all adequate photosensitizers in PDT are good for vector control, since they must match a few environmental requests.

Curcuminoid pigments, especially curcumin (derived from *Curcuma longa* L. rhizomes) are notably useful in killing *Ae. aegypti*, *Culex pipiens* (common Japanese encephalitis vector) and *Anopheles quadrimaculatus* larvae (common malaria vector) [19,20]. Larvicide action of this pigment is considerably large when in the sunlight, since it absorbs photons in the range of 300-500 nm, being the absorption maximum at 420 nm - blue region of sunlight spectra [8]. Besides the insecticide properties, *C. longa* derivatives are also known as a good therapeutically efficient compound in India, China and Southeast Asia for their anticancer [21], anti-inflammatory [22, 23], antiseptic and antibacterial action [24].

In the present study, the photodynamic processes of curcumin prepared with two sugar additives (sucrose and D-mannitol) on *Ae. aegypti* larvae was evaluated. This work shows unprecedented the photolarvicidal potential of curcumin evaluated in semi-field conditions considering different exposure containers, such as glass and plastic. Here, we also report for the first time the use of micro-Raman microscopy as an innovative tool for the characterization of the molecular alterations caused by larvicidal activity on targets such as midgut. This approach allowed a better comprehension of curcumin mechanisms of action and its additives in *Ae. aegypti* larvae.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *Larvae*

Ae. aegypti eggs (Rockefeller strains) were provided by Mérieux NutriSciences Company (Charqueada-SP, Brazil) and maintained in laboratory conditions at $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ under 12:12-h light to dark photoperiod. After egg hatching, the larvae were fed once a day with a mixture of powdered fish food AlconBASIC® MEP 200 Complex (Alcon, Camboriú-SC, Brazil) and dry yeast, in a 3:1 proportion, until reaching the third-instar larval stage (L3).

2.2 *Curcumin sugars solutions preparation*

The curcumin ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$) was synthesized at Federal University of São Carlos (São Carlos-SP, Brazil) according with a protocol in both batch and continuous flow conditions [25]. Two sugars were incorporated in curcumin for the photolarvicidal activity tests: Sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) and D-mannitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$), both purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). These sugars were used to improve the solubility and palatability characteristics of curcumin. The physical mixtures of Sucrose-curcumin (namely, SC) and D-mannitol-curcumin (DMC) were prepared by mechanical mixture through triturating both powders in a pestle mortar, in 1% curcumin and 99% sugar (m/m). After that, the powdered materials (SC and DMC) were dissolved in distilled water and placed in an ultrasonic bath for 5 minutes, at 27°C . The concentration of homogenized samples was determined by absorbance at 420 nm using a Cary UV-VIS spectrophotometer (Varian, Australia), since curcumin exhibits maximum absorption in this region. The SC and DMC spectra are shown in Figure 1A, along with the stock solution (Figure 1B).

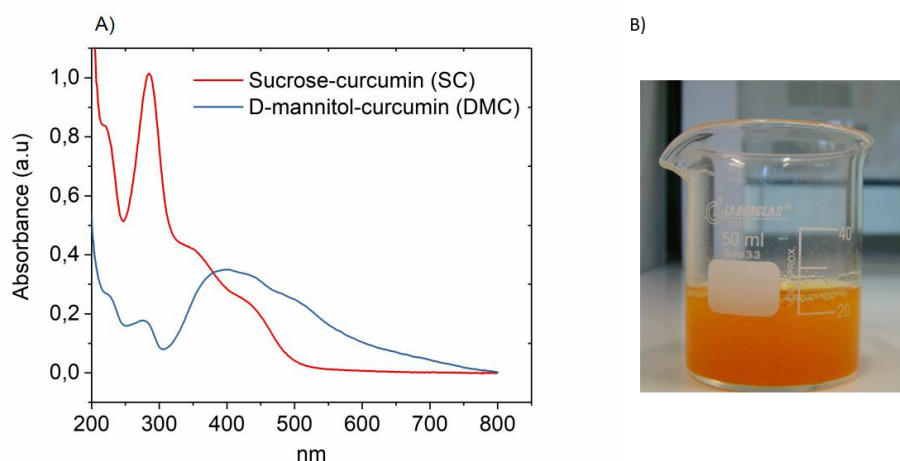


Figure 1. A) Sucrose-curcumin (SC) (in red) and D-mannitol-curcumin (DMC) (in blue) absorption spectra, B) stock solution with strong yellow-red coloration.

2.3 *Semi-field trials*

The experiments were conducted at the external environmental under natural condition specially prepared at the Sao Carlos Institute of Physics (University of Sao Paulo, Sao Carlos-SP, Brazil) from January to May 2018. In the local, the climate is Tropical, with wet summer (temperature range of 17-28°C from Dec-March) and dry winter (temperature range from 12-28°C from June-Sep.). The photolarvicidal activity of curcumin sugars (SC and DMC) on *Ae. aegypti* larvae was analyzed according to the World Health Organization (2005) with modifications [26]. The bioassays were performed in two different types of containers: plastic beakers containing 200 mL (water column of 5.0 cm), for both SC and DMC. After that, glass aquariums containing 2 L of chlorine-free water (water column of 4.6 cm) for DMC were used. DMC was the only one sugar selected for this last study since it presented the best performance in the bioassays in plastic beakers as it will be reported. Homogenous populations of 20-25 larvae at the late third-instar stage (L3) were exposed to five concentrations ranging between 0.005, 0.05, 0.11, 0.22 and 0.45 mg.L⁻¹ (w/v) for plastic beakers, and 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 and 0.16 mg.L⁻¹ for glass aquariums. Three replicates were maintained for each concentration, with controls consisting of dark condition, clean chlorine-free water and the sugar (sucrose or D-mannitol) in the highest concentration tested. There was a control group kept at the darkness for 24 h. Two conditions regarding photolarvicidal activity were evaluated: direct and indirect (shadow) exposure to sunlight. Experiments began at 9:30 AM and after 0.5 h (10:00 AM), 1h (10:30 AM), 3h (12:30 PM), 8 h (5:30 PM) of exposure to sunlight, larval mortality was evaluated. After 8 h of sunlight

exposure, containers were withdrawn from the light and kept in the dark (16 hours of dark) for a further evaluation after 24h (9:30AM of the next day). The larvae that presented low mobility and were unable to rise to the surface were considered dead [27]. Water temperature and luminance (lux) were evaluated during the experiment.

2.4 *Morphological analysis*

Larvae were exposed to SC and DMC solutions (LC50 values), according to the methodology previously presented (semi-field trials) and collected for morphological studies. The morphological changes were photographed and recorded using a binocular stereomicroscope at 32x of magnification (Zeiss Stemi DV4, Carl Zeiss, Germany) connected to a Sony Cyber-shot DSC-H50 camera (Sony Brazil Ltda. São Paulo/SP, Brazil).

2.5 *Raman spectroscopy: effects of SC and DMC activity on midgut*

Micro-Raman measurements were performed to evaluate the molecular alterations caused by SC and DMC on larvae midgut using a WITec Alpha 300 RAS microscope (WITec, Ulm, Germany) was used. The excitation wavelength was 785 nm and the detection range was 100-3200 cm^{-1} from the central line. The spectra were collected with 20x and 50x magnification objectives (Zeiss, Jena, Germany). Spectra were recorded with an integration time of 120 s and 3 accumulations for each spectrum. Obtained spectra were processed using WITec ProjectFOUR and Origin 2016 software.

Larvae were submitted to the same procedures described in section 2.3 and collected in high level of lethargy. Then, were passed through a 70% ethanol bath, and the midgut was removed using entomological tweezers under a magnifying glass.

The midgut were transferred to microscope glass slide covered with aluminum to remove the fluorescence of the glass. Raman spectra were taken from the peritrophic membrane (PM) and midgut epithelium (ME). Spectra were taken from PM and ME before exposure to any carbohydrate or curcumin (control), after exposure to a sucrose or D-mannitol only solution (control), after exposure to a SC or DMC (control) and after sunlight application to kill the larva exposed to SC or DMC (treatment). More than 10 gut from control and treated groups were used for analysis.

2.6 Statistical analysis

Probit regression model [28] was used to evaluate the lethal concentrations (LC_{50-24h} and LC_{90-24h}) and the corresponding 95% confidence intervals (l.c.l.: lower control limit, u.c.l.: upper control limit), chi square (χ^2) and degrees of freedom (df). Mortality data for the simulated field trials were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$) was used to determine significance between control and treated groups. Mortality data was corrected by Abbott's formula [29].

3 RESULTS

3.1 Semi-field trials

3.1.1 Plastic beakers

Toxicity of SC and DMC was evaluated in two irradiance conditions: direct and indirect sunlight. Figure 2 presents larvae mortality rates for SC and DMC, exposed for 8h to direct and indirect sunlight, and after 16h in the dark (mortality evaluation after 24h). Control groups did not exhibit significant mortalities (dark and sugars control).

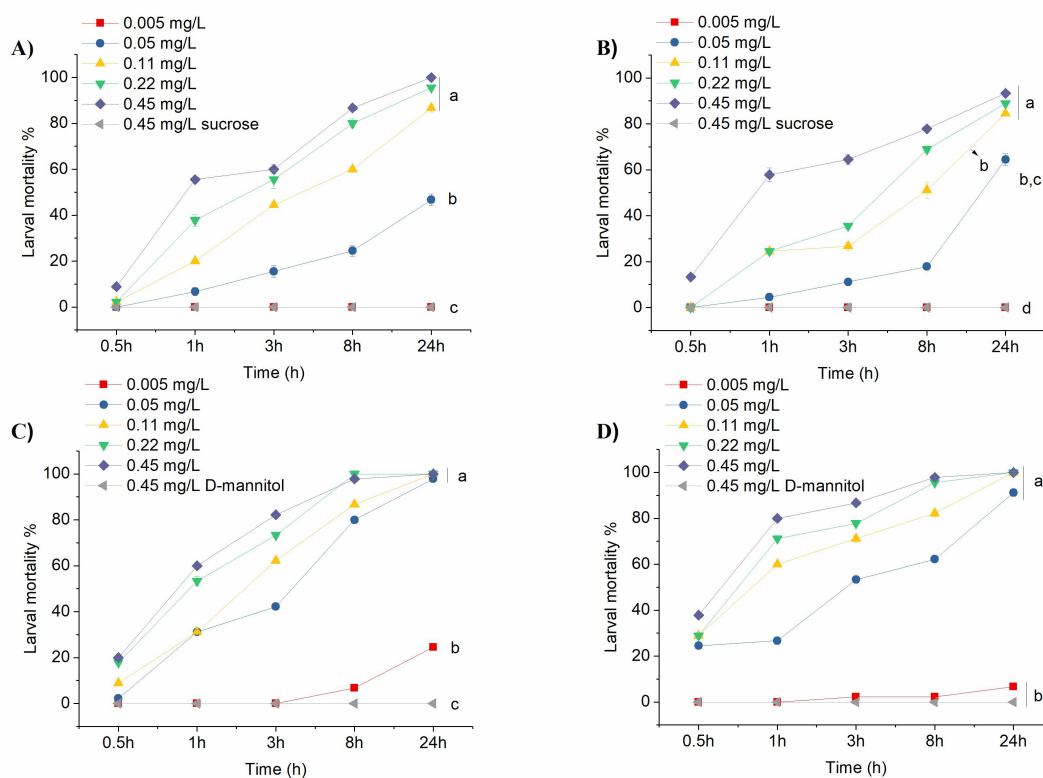


Figure 2. Larval mortality after 0.5, 1, 3 and 8h of sunlight exposure and after 16 hours in the dark experiments performed with plastic beakers. (A) SC- direct exposure, (B) SC- indirect exposure, (C) DMC- direct exposure and (D) DMC- indirect exposure. No mortality was observed in the control group (0.45 mg.L⁻¹ D-mannitol or sucrose). Lowercase letters on each figure distinguish survival rates that are significant ($p < 0.05$).

Considering both formulations (SC and DMC), raises in toxicity were proportional to photolarvicidal concentrations and sunlight exposure span. The highest larvicidal activity was observed at direct sunlight exposure, in both SC and DMC. Table 1 and 2 brings the LC_{50-24h} and LC_{90-24h} values obtained for this study (SC: LC_{50-24h} of 0.04 mg.L⁻¹, LC_{90-24h} of 0.13 mg.L⁻¹; DMC: LC_{50-24h} of 0.01 mg.L⁻¹ and LC_{90-24h} of 0.03 mg.L⁻¹) under direct and indirect sunlight exposure (shadow).

Table 1. Lethal concentrations of SC and DMC (LC_{50-24h} and LC_{90-24h}) on 3th instar *Ae. aegypti* evaluated in plastic beakers under direct sunlight exposure.

	LC _{50-24h} (mg.L ⁻¹) (LCL-UCL)	LC _{90-24h} (mg.L ⁻¹) (LCL-UCL)	Chi square
Sucrose-curcumin (SC)	0.04 (0.01-0.10)	0.13 (0.04-0.32)	0.09
D-mannitol-curcumin (DMC)	0.01 (0.0-0.12)	0.03 (0.0-0.36)	0.37

LCL, lower confidential limit; UCL, upper confidential limit, degrees of freedom $df = 3$. Significant at $p < 0.05$ level.

Table 2. Lethal concentrations of SC and DMC (LC_{50-24h} and LC_{90-24h}) on 3th instar *Ae. aegypti* evaluated in plastic beakers under indirect sunlight exposure (shadow).

	LC _{50-24h} (mg.L ⁻¹) (LCL-UCL)	LC _{90-24h} (mg.L ⁻¹) (LCL-UCL)	Chi square
Sucrose-curcumin (SC)	0.05 (0.0-0.30)	0.22 (0.03-1.38)	0.19
D-mannitol-curcumin (DMC)	0.02 (0.0-0.14)	0.05 (0.0-0.38)	0.44

LCL, lower confidential limit; UCL, upper confidential limit, degrees of freedom $df = 3$. Significant at $p < 0.05$ level.

Considering DMC, the two mortality curves presented the same behavior during the sunlight exposure span (direct and indirect exposures), reaching very similar mortality levels in 24h (>80%), for 0.45, 0.22, 0.11 and 0.05 mg.L⁻¹. It is worth to highlight that for the lowest concentration (0.005 mg.L⁻¹), direct sunlight exposure induced the highest mortality in 24h (>20%), while no mortalities were observed under indirect sunlight exposure. Illuminance parameters were steady in both irradiance conditions, until 3h of exposure. Illuminance in the containers exposed to direct sunlight was 50-60 times higher than in the ones exposed to indirect sunlight after 0.5, 1 and 3 h. The peak illuminance value registered was 101,8 lx, after 0.5h. After 8h (end of the experimental span), both irradiance conditions converged to similar values (1,360 lx for direct sunlight and 1,000 lx for indirect sunlight). Considering water temperature in test containers, those exposed to direct sunlight exhibited an average temperature of 26°C±2, while at indirect sunlight exhibited 22°C ±1.

3.1.2 Glass aquariums

Considering the superior results obtained with DMC, this formulation was the chosen for further experiments. The photolarvicidal activity of DMC was assessed at 5 concentrations (0.01, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 and 0.16 mg.L⁻¹) in the glass aquariums. The higher DMC concentration (0.16 mg.L⁻¹) was significantly ($p < 0.05$) more toxic under direct sunlight, after 3h of exposure. After 24h of the beginning of the experiment, there were no significant differences between direct and indirect sunlight exposure in this high concentration. DMC toxicity was greater under direct sunlight after 24h in all doses below 0.16 mg.L⁻¹ (Figure 3).

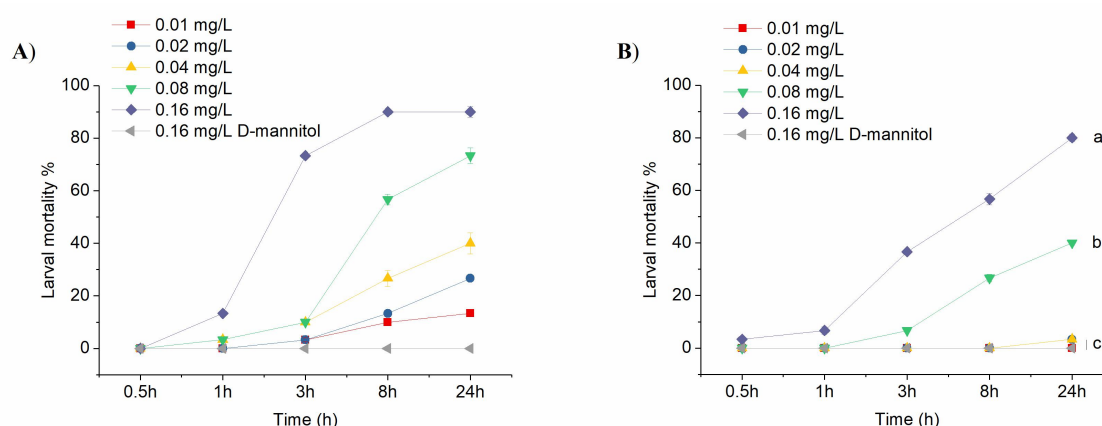


Figure 3. Larval mortality after 0.5, 1, 3 and 8h of sunlight exposure, and after 16 hours in the dark experiment performed with glass aquariums. (A) DMC- direct exposure and (B) DMC- indirect exposure. No mortality was observed in the control group (0.16 mg.L⁻¹ D-mannitol). Lowercase letters on each figure distinguish survival rates that are significant ($p < 0.05$).

LC50 values demonstrated DMC photolarvicidal potential under direct sunlight exposure, since those were about three times lower (0.04 mg.L^{-1}) than the indirect sunlight ones (0.11 mg.L^{-1}) (Table 3). Control groups did not depict significant mortalities. Illuminance was 10-20 times greater at direct sunlight at 0.5, 1 and 3h of exposure. The higher recorded luminance was 118,200 lx at 0.5 h. At 8h, illuminance at both exposure conditions (direct and indirect sunlight) did not present significant differences. Water average temperature at aquariums was $26^{\circ}\text{C} \pm 4$ at direct sunlight and $21.5^{\circ}\text{C} \pm 3$ at indirect sunlight.

Table 3. Lethal concentrations of DMC (LC50-24h and LC90-24h) on 3th instar *Ae. aegypti* evaluated in glass aquariums containing 2 L, under direct and indirect sunlight exposure.

	LC _{50-24h} (mg.L ⁻¹) (LCL-UCL)	LC _{90-24h} (mg.L ⁻¹) (LCL-UCL)	Chi square
Direct exposure	0.04 (0.01- 0.08)	0.15 (0.06- 0.37)	0.04
Indirect exposure	0.11 (0.01- 0.73)	0.36 (0.02- 4.67)	0.29

LCL, lower confidential limit; UCL, upper confidential limit, degrees of freedom $df = 3$. Significant at $p < 0.05$ level.

3.2 Morphological analysis

Control larvae (exposed to sugars only or just sunlight in clean water) depicted regular morphology (vermiform), with three well-defined regions: head, thorax and abdomen (Figure 4, in A). Larvae exposed to SC and DMC at both sunlight conditions, after 0.5h, presented a strong yellow color throughout the alimentary canal, highlighting the gastric ceca and midgut as the photolarvicidal main targets (Figure 4B). A remarkably feature on larvae treated with SC and DMC was the partial intestine extrusion, completely coated with the peritrophic membrane (Figure 4C and E). Other changes observed on DMC treated larvae were feeding channel rupture (Figure 4C) and darkening (Figure 4D), and medium intestine shortening (Figure 4F).

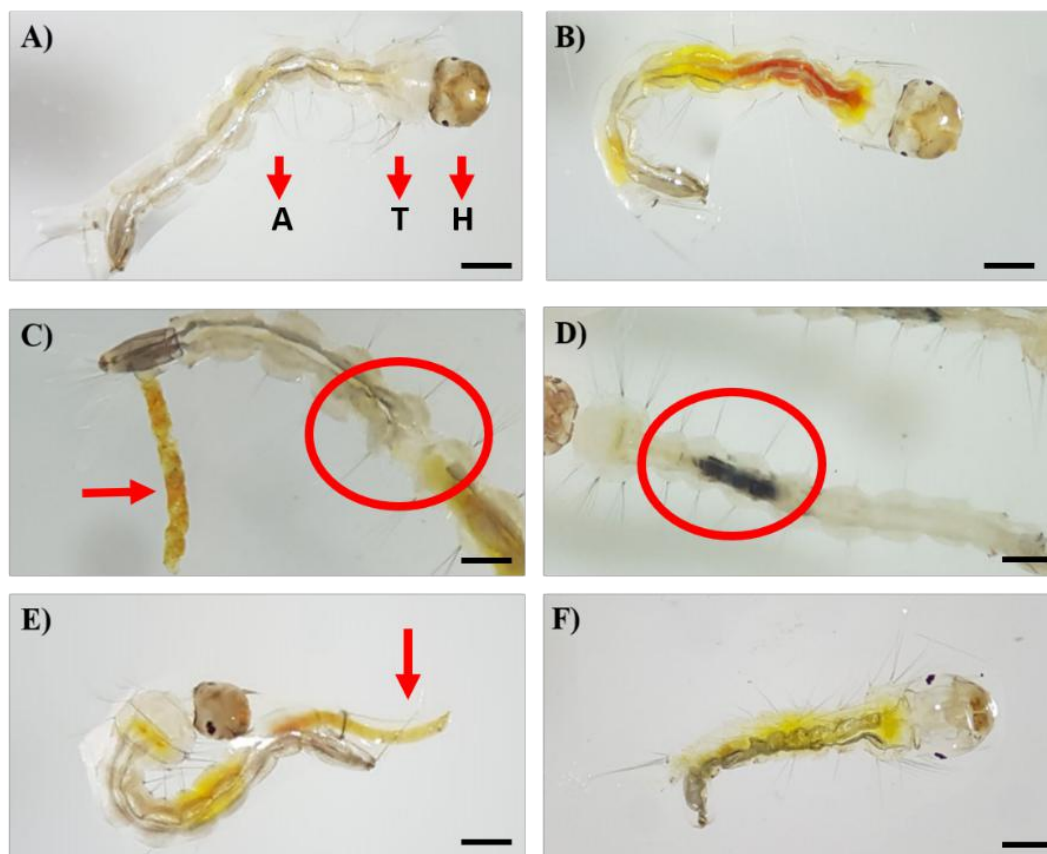


Figure 4. (A) Control larvae (H: head, T: thorax and A: abdomen); (B) SC or DMC distribution after exposure; (C) intestine rupture (circle) and extrusion after DMC exposure (arrow), (D) midgut darkening after DMC exposure (circle), (E) gut extrusion after SC exposure (arrow) and intestine shortening after DMC exposure (F). 32x, magnification.

3.3 Raman spectroscopy: effects of SC and DMC activity on midgut

The micro-Raman analysis of the larval digestive tract was performed to evaluate the molecular possible mechanisms of curcumin action as a photosensitizer and to explain the difference in the efficacy between SC and DMC. Figure 5 brings images of the larvae midgut without curcumin (in A) and after exposure to SC (in B) and DMC (in D). It is possible to see a clearance of SC and DMC after sunlight exposure (Figure 5C and E), indicating the occurrence of bleaching and consequently the photodynamic processes.

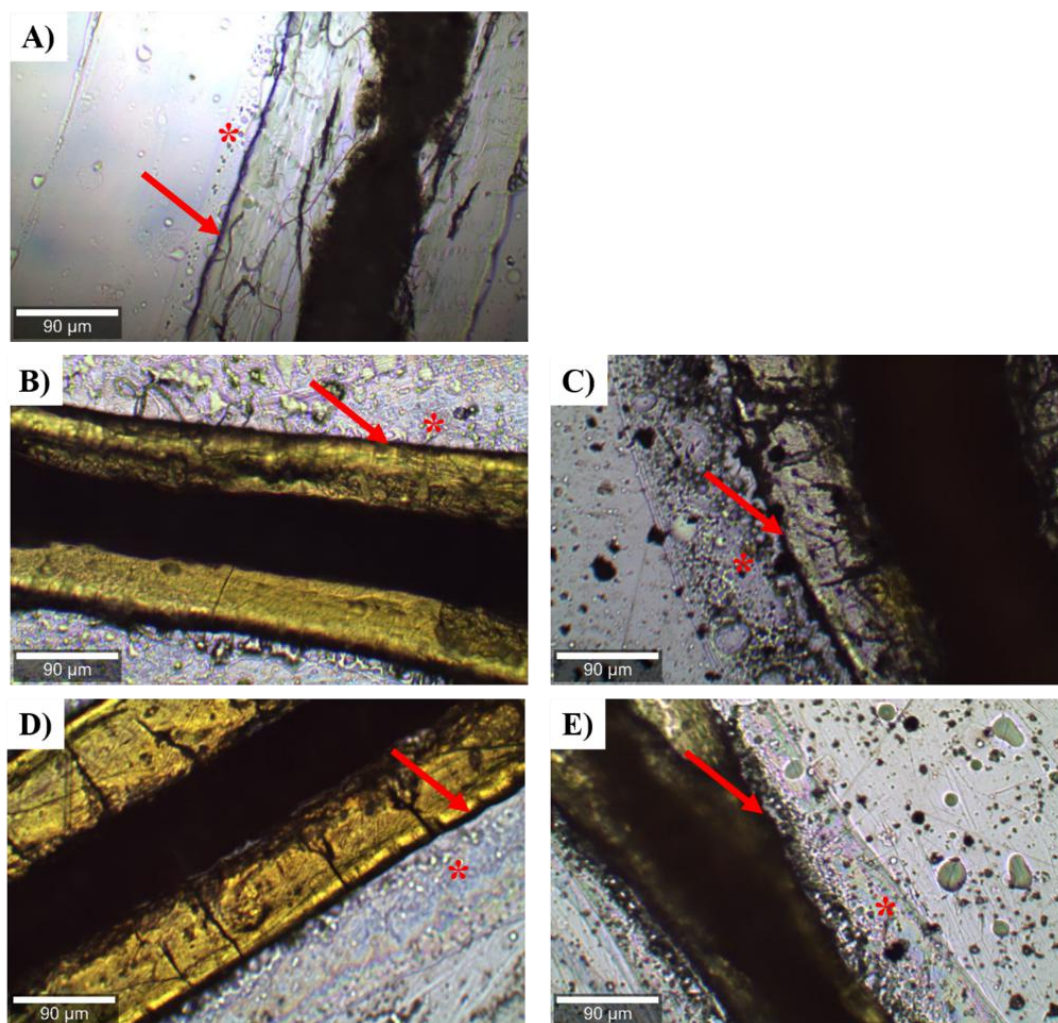


Figure 5. Larvae gut control (A), larvae gut exposed to DMC before sunlight exposure (B), larvae gut exposed to DMC after sunlight exposure (C), larvae gut exposed to SC before sunlight exposure (D), larvae gut exposed to SC after sunlight exposure (E). Arrow: peritrophic membrane and asterisk: midgut epithelium. Scale: 90 μm .

Figure 6 (in A) shows Raman spectra of the midgut epithelium without DMC (control) and exposed to DMC (before and after sunlight exposure). Arrows indicate all Raman peaks which seems to appear after larva ingested DMC or disappeared after the sunlight exposure. Figure 6B shows Raman spectra of the peritrophic membrane without DMC (control) and exposed to DMC (before and after sunlight exposure). Many changes occur in the midgut epithelium spectra after the DMC internalization and the sunlight exposure, which then can be seen by the changes in the fluorescence of the samples (fluorescence comprises the spectra baseline). However, only a few changes occur in the Raman spectra of the peritrophic membrane.

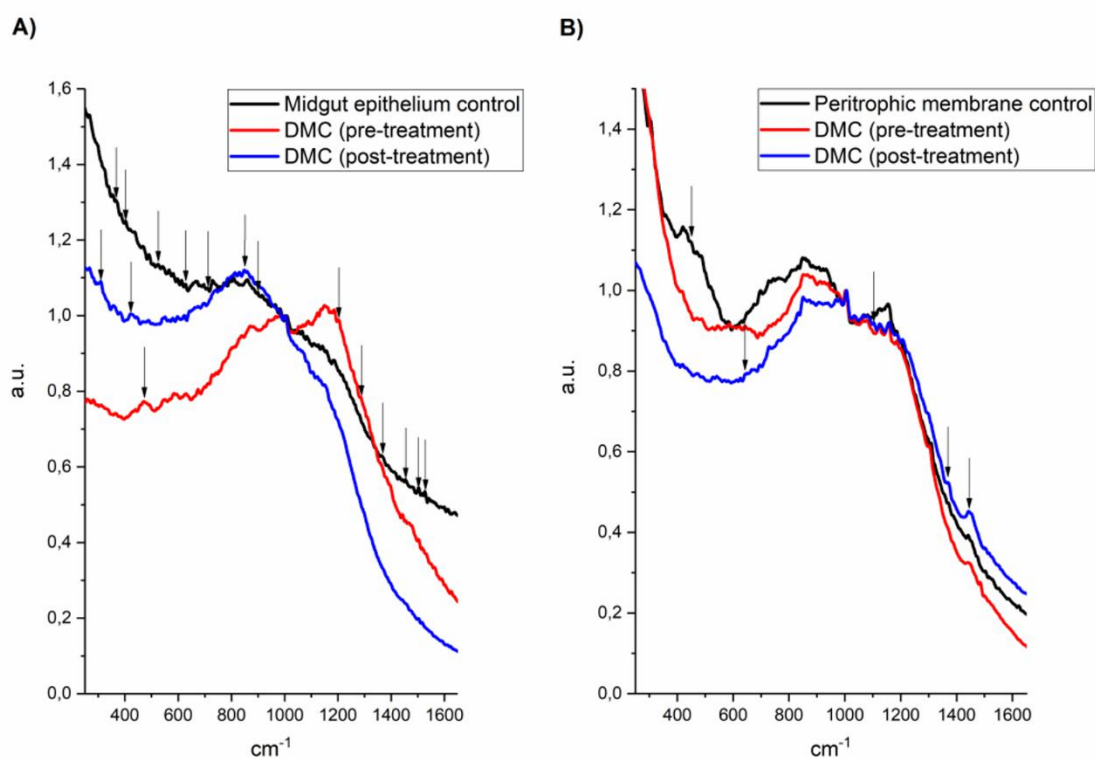


Figure 6. Raman spectra of midgut epithelium (A) and peritrophic membrane (B) without DMC (in black) and exposed to DMC before (in red) and after (in blue) sunlight exposure. Arrows indicate the peaks in spectra which appear after larvae internalize the DMC and peaks which disappeared after the sunlight exposure.

Figure 7 (in A) shows the Raman spectra of larval midgut epithelium after SC internalization before and after the sunlight exposure compared with control. Significant changes occur in the Raman peaks of aminoacids from midgut epithelium (300-1300 cm⁻¹), though the number of changes is significantly lower than in the case of DMC. Figure 7B shows the Raman spectra of larvae peritrophic membrane after SC internalization before and after the sunlight exposure in comparison with control. As it can be seen, in the peritrophic membrane there are more changes in the spectra than in the case of DMC, and changes occur in different peaks, indicating that the interaction of photosensitizer with the peritrophic membrane is different in both cases.

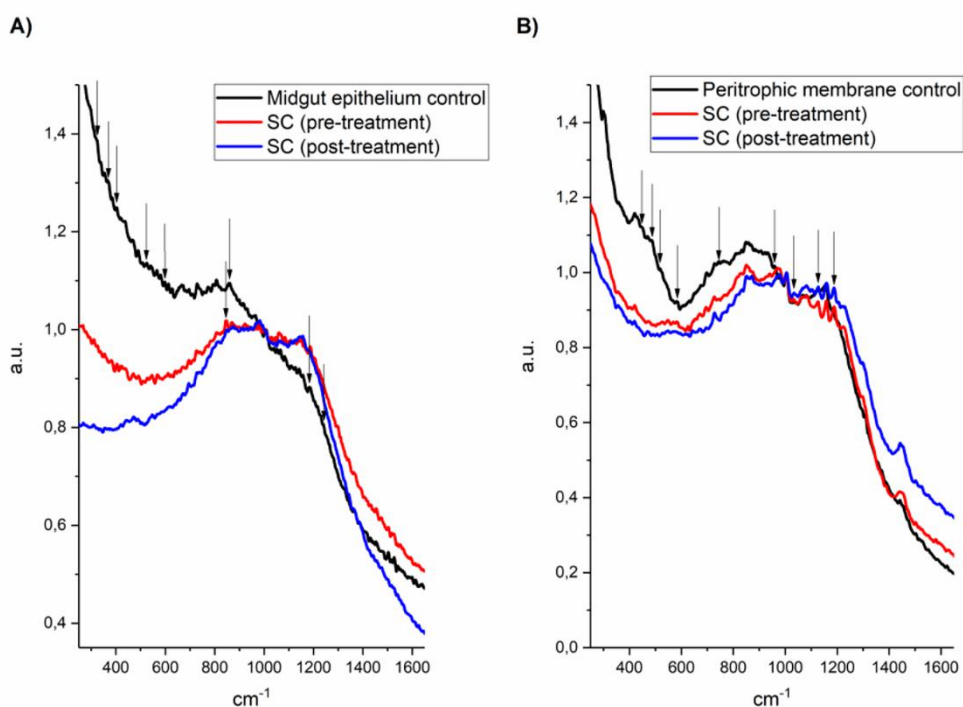


Figure 7. Raman spectra of midgut epithelium (A) and peritrophic membrane (B) without SC (in black) and exposed to SC before (in red) and after (in blue) sunlight exposure. Arrows indicate the peaks in spectra which appear after larvae internalize the photosensitizer and peaks which disappeared after the sunlight exposure.

4 DISCUSSION

Our discussion should be placed considering many aspects obtained from the experiments and the results. First, it is clear the potential application of curcumin in either formulation as a photoinsecticide for the larvae.

In an overall aspect of the discussion, botanical insecticides present advantages over chemical ones, since there is a wide array of molecules effective against various vectors and other undesirable arthropods [30]. These plant-based compounds are quickly degraded, especially under high levels of solar irradiance, humidity and rainfall. These characteristics favor the use of these pesticides as seen the lower persistence, leading to reduced bioaccumulation and pollution in general (have a minimal effect on non-target organisms) [31,32,33,34]. Some authors still believe this is a downside of botanical insecticides employment, arguing that they demand a larger number of applications, making the product economically unfeasible. However, this could be bypassed by high throughput production of low-cost synthetic molecules, which is the case of the curcumin used in this study [25]. Taking into account the high phototoxicity of curcumin (incorporated in sugars) against *Ae.*

aegypti larvae [8], its environmental safety and the reasonable low costs of production, we can assume that this is a novel and promising approach in battling such important vector.

Discussions on the high impacts of pesticides and their byproducts on the aquatic environment and human health are frequent on literature [35]. Insecticides that inhibit insect's chitin synthesis, such as diflubenzuron, often present an antagonistic role on endemics combat: while they prevent DEN raises by stopping mosquitoes spread, they can cause hormone disruptions [36,37], cancer [38], infertility [39], skin allergies [40], amongst other pathologic cases. Lajmanovich and colleagues (2019) reported the deleterious effects of pyriproxyfen (PPF) in the amphibian *Odontophrynus americanus*: alterations on the antioxidant defense system, on heart rate and on thyroid hormones [40]. According to OMS, these pesticides should be carefully used, and the allowed concentration in drinking water is very low (≤ 0.01 mg.L⁻¹) [41].

Recently, Souza and co-workers (2019) described curcumin photolarvicide activity against *Ae. aegypti* larvae. It was shown that the larvicide potential is about 10 times higher in the presence of sunlight. Moreover, it was observed that curcumin association with sucrose increases curcumin palatability, besides improving its solubility, dismissing toxic solvents need [8].

In light of these experiments, our findings unequivocally present the photolarvicide action of SC and DMC on third instar *Ae. aegypti* larvae. Concerning both irradiance conditions (direct and indirect sunlight), LC50-24h values were significantly lower or close to other phenolic compounds. The higher efficacy was observed for DMC in plastic beakers, under direct sunlight, with an LC50-24h of 0.01 mg.L⁻¹. Compounds derived from cashew nuts (*Anacardium occidentale*) presented an LC50-24h of 5.93 mg.L⁻¹ to *Ae. aegypti*; according to our results, curcumin is about 600 times more toxic to the same mosquito. Other isolated from *A. occidentale*, such as cardol and cardanol are also potential larvicides against *Ae. aegypti*, with LC50 of 6.14 and 20.32 mg.L⁻¹, respectively [42]. *Curcuma zedoaria* essential oil combined to silver nanoparticles showed an LC50 of 0.57 and 0.64 mg.L⁻¹ against deltamethrin susceptible and resistant strains of *Culex quinquefasciatus*, respectively [43].

Natural larvicides evaluated under field conditions, where environmental conditions fluctuate, usually exhibit a weakened potential. On the other hand, compounds owning photodynamic activity, such as SC and DMC, might increase their performance under these conditions, featuring lower LC50 values. SC and DMC presented higher larvicide activity

under higher luminance conditions, in both containers evaluated (plastic beakers and glass aquaria). Notwithstanding the higher LC50 values found for indirect sunlight conditions, those were still far lower than other *C. longa* derivatives; Ar turmerone, bis-demethoxycurcumin and demethoxycurcumin display LC50 values of 2.5, 8.7 and 6 mg.L⁻¹ to first instar *Ae. aegypti* larvae [19].

The superiority of DMC compared to SC can find an explanation in many hypotheses. The attraction for the larvae is certainly a fact, but the localization within the digestive tract of the larvae as well as the possibility of chemical adhesion to the larvae internal substracts may also contribute. In Fig 2 we can clearly observe that below a minimum threshold quantity (0.005 mg.L⁻¹) in both cases the photolarvicide toxicity is not reached, demonstrating an unequivocal necessity for minimum concentration use. On the other hand, above 0.05 mg.L⁻¹ for direct sunlight exposure, the almost total larval mortality is always achieved in 24 h period. Lower concentration progress in time at different rates but seem to catch up on the 24h period. For indirect illumination, the concentration needed to reach complete larval mortality in 24 h using SC increases to 0.11 mg.L⁻¹. In all cases presented in Fig 2, the absence of light results in basically zero mortality.

Considering the different containers evaluated (plastic beakers and glass aquaria), it is safe to say that the kind of material employed had a direct action on DMC larvicide potential. DMC was more efficient in plastic (direct sunlight: LC50 0.01 mg.L⁻¹; indirect sunlight: LC50 0.02 mg.L⁻¹) than in glass (direct sunlight: LC50 0.04 mg.L⁻¹; indirect sunlight: LC50 0.11 mg.L⁻¹), under both studied irradiation conditions. Our data corroborate those from da Silva (2003), which evaluated *Magonia pubescens* ethanol extract activity against *Ae. aegypti* larvae in artificial breeding places [44]. In general, the larvicide activity was significantly more effective in ceramic and plastic than tire, glass, foil and asbestos containers. Considering DMC, we hypothesize that it was strongly bonded to the plastic, originating a yellow film in the container wall. Thoroughly the experimental span, it was possible to observe the larvae actively feeding on this film, by rasping it, resulting in an efficient DMC internalization. Since larvae guts were fulfilled with this curcumin sugar, sunlight irradiation yielded better results.

A great deal of information is presented in the observations of Fig 4. While it seems clear the defense mechanism placed by the larvae to eliminate the SC or DMC of digestive canal, there are always remaining substance that seem enough to cause the phototoxicity

necessary for mortality. The severe damage caused by DMC represent a permanent irreversible process, resulting in higher mortality.

Usually, morphological and behavioral alterations are the first signs of toxicity of photolarvicides in *Ae. aegypti*. At the initial irradiation time, both for SC and DMC, it was observed larvae mobility reduction and partial and/or total intestine content extrusion, this last wrapped by the peritrophic membrane (PM). This extrusion is well known as an attempt of avoiding contact with pathogens or toxic substance, which is the first approach of larvae's defense mechanisms [45, 46, 47]. The morphological found alterations agree with those from Fugiwara et al (2017), whose studies were on linalool, methyl and cinnamate larvicide activity against *Ae. aegypti* larvae [48].

Interestingly, DMC treated larvae presented a darker coloration on feeding duct, highlighting oxidative damages caused by photodynamic activity on the midgut region (Fig 5D). This darkening area is usually associated with epithelial cells destruction and/or to substantial modifications on the peritrophic membrane. Other authors suggest that this phenomenon is due to an important invertebrate defense mechanism, the prophenoloxidase system (poPO). Briefly, this is a system activated by damaged tissues, leading to the phenoloxidase cascade development, which cleaves the prophenoloxidase (inactive form) in phenoloxidase (active form). This enzyme is closely related to melanization reactions, contributing to the encapsulating and healing of the injured tissue [49,50,51].

To the best of our knowledge, this is the first time that micro-Raman microscopic observations have supported the understanding of mechanisms of action of a larvicide. In the current study, many changes in the Raman spectra are observed in the gut epithelium and the peritrophic membrane after larva ingest photosensitizer, and many changes in the spectra are seen after the sunlight exposure. These changes occur mainly in the spectral region where aminoacids which compose proteins of the gut epithelium and nucleic acids have peaks ($360-1550\text{ cm}^{-1}$), which means that curcumin strongly interacts with the epithelium and damages them during sunlight exposure. The peaks of aromatic aminoacid phenylalanine (366 and 1215 cm^{-1}) and disulfide bridges ($500-530\text{ cm}^{-1}$) are disappearing after the sunlight exposure of larva, which indicates that proteins of the epithelium denatured as the result of DMC photoactivity (Fig 6A). On the other hand, the spectrum in Fig 6B, implicates that DMC mostly acts in the midgut epithelium, causing few changes in the in the peritrophic membrane (few spectral changes were observed in this region in relation to the gut epithelium). Most of the changes occurring in the peritrophic membrane involve changes in the Raman spectrum of

chitin, with peaks at 643, 1103, 1370 and 1446 cm^{-1} , becoming more visible after the light treatment, probably indicating the denaturation of chitin.

Another difference with the DMC samples is that Raman peaks, which appear or disappear after the larvae internalize SC and after the sunlight exposure, are not the same as in the case of DMC, with only the peak around 520 cm^{-1} being common for both. This means that the mechanism of interaction of SC and DMC with the midgut epithelium is not the same, even though the peaks appearing and disappearing in this case also belong to aminoacids (385, 404, 523, 860, 1185, 1204 and 1241 cm^{-1}) and nucleic acids (404, 565, 597, 860, and 1185 cm^{-1}).

Raman microscopy analysis clarified the different interactions of DMC and SC with intestine epithelium and peritrophic membrane. In DMC treated larvae, there was higher peritrophic membrane permeability and intestine epithelium destruction, though important peritrophic membrane damage was also seen, evinced by chitin denaturation. Considering SC, lower levels of disturbances were observed in the gut epithelium, while significant damages were seen on the peritrophic membrane, which lead to differences in larval mortality. Since the peritrophic membrane is responsible for epithelium protection, it can be expelled and regenerated, whereas epithelium does not exhibit such plasticity. Taking these analyses into account, it is safe to state that DMC penetrated more easily through the peritrophic membrane, provoking irreversible damages to the intestine epithelium.

5 CONCLUSIONS

In conclusion, the present study showed the high potential for the use of curcumin in two formulations (SC and DMC) against today's most challenging public health *Aedes aegypti* vector. Studies have shown that the determination of LC50 resulted in values substantially lower than other larvicides discussed in the literature. Due to the fact that the photolarvicidal molecules used here are totally degraded by light, preserving any aggression to the environment, the use of such molecules is of great advantage. In particular, the D-mannitol formulation was shown to be more efficient in curcumin bioavailability. This formulation was able to be carried beyond the peritrophic membrane, invading and injuring the intestinal epithelium of the larvae. One of the advantages of using curcumin in these applications is in full accordance with safety regimens, since doses of up to 12 g per day for human use is established as safe. This will prevent any possibility of accidents or undesirable effects when the process is applied in a domestic environment, with children or animals. In addition, curcumin is not toxic in water environments, as demonstrated by our studies that are

currently under preparation. With this investigation we intend to establish a new front for the use of curcumin in the fight against vectors, since the first field trials are already organized.

Author Contributions: Conceptualization, L.M.S.; F.P.V.; N.M.I.; K.T.O.; V.S.B.; Bioassay preparation, L.M.S.; F.P.V.; M.G.; I.I.; Data collection, L.M.S.; F.P.V.; M.G.; I.I.; Data analysis, L.M.S.; F.P.V.; N.M.I.; I.I.; K.T.O.; V.S.B.; writing—review and editing, L.M.S.; F.P.V.; I.I.; N.M.I.; K.T.O.; V.S.B.

Funding: This research was funded by CAPES/MEC-, CNPq/MCTI e Decit/SCTIE/MoH (Grant No.: 44058520163), São Paulo Research Foundation – FAPESP- VSB (Grants Nos.:2009/54035-4 (Confocal Microscope), 2013/07276-1 (Optics and Photonics Research Center – CePOF-VSB, 2018/00106-7 - KTO), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES (Grant No. 1538187) – LMS and INCT Basic Optics and Applied to Life Sciences (Grant No. 465360/2014-9).

Acknowledgments: We thank all Merieux team for making available the Rockefeller strain used in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6 REFERENCES

1. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico [Internet]. 2015 [cited 2019 April 29]; 46 (44). Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/07/2015-svs-be-pncd-se48.pdf>
2. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly-Brazil. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65: 59-62.
3. World Health Organization. Situation report. Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré syndrome—20 October 2016. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250590/1/zikasitrep20Oct16-eng.pdf>.
4. Franco O. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Superintendência de Campanhas de Saúde Pública; 1976.
5. Margulis-Goshen K, Magdassi S, Ishaaya I, Palli S, Horowitz A. *Advanced Technologies for Managing Insect Pests.* Springer. 2013; 295-314.
6. Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2006;2: 141-149.
7. Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2008;2: 540-551.
8. de Souza LM, Mayumi N, Perri F, Carmona-vargas CC, Pratavieira S, de Oliveira TK, Kurachi C, Salvador V. Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae. *J. Asia. Pac. Entomol.* 2019;22(1): 151-158.
9. Ben Amor T, Jori G. Sunlight-Activated Insecticides: Historical Background and Mechanisms of Phototoxic Activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2000; 30: 915–925.
10. Jori G, Reddi E (1991) Second generation photosensitizers for the photodynamic therapy of tumors. In: Douglas R, Moan J, Ronto G, editors. *Light in biology and medicine.* London: Plenum Press. pp. 253–266.
11. Schildmacher H. Über Photosensibilisierung von Stechmückenlarven durch fluoreszierende Farbstoffe. *Biol. Zentralbl.* 1950;69: 468-477.
12. Robinson JR. Photodynamic insecticides: a review of studies on photosensitizing dyes as insect control agents, their practical application, hazards and residues. Springer-Verlag.1983;88: 69-100.
13. Ben Amor T, Tronchin M, Bortolotto L, Verdiglione R, Jori G. Porphyrins and related compounds as photoactivatable insecticides. 1. Phototoxic activity of haematoporphyrin toward *Ceratitis capitata* and *Bactrocera oleae*. *Photochem. Photobiol.* 1998;67(2): 206-211.
14. Fondren JE, Heitz JR. Xanthene dyes induced toxicity in the adult face fly, *Musca autumnalis*. *Environ. Entomol.* 1978;7: 843-846.

15. Rebeiz CA., Reddy KN, Nandihalli UB, Velu J. Tetrapyrrole-dependent photodynamic herbicides. *Photochem. Photobiol* 1990;52:1099–1117.
16. Ben Amor T, Bortolotto L, Jori G. Porphyrins and related compounds as photoactivatable insecticides. 2. Phototoxic activity of meso-substituted porphyrins. *Photochem. Photobiol.* 1998;68: 314-318.
17. de Souza LM, et al. Efficacy of photogem® (Hematoporphyrin Derivative) as a photoactivatable larvicide against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *J. Life Sci.* 2017;11: 74-81.
18. Luksiene Z, Kurilčik N, Juršėnas S, Radžiutė S, Būda V. Towards environmentally and human friendly insect pest control technologies: photosensitization of leafminer flies *Liriomyza bryoniae*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2007;89(1): 15-21.
19. Ali A, Wang YH, Khan IA. Larvicidal and biting deterrent activity of essential oils of *Curcuma longa*, ar-turmerone, and curcuminoids against *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* (Culicidae: Diptera). *J. Med. Entomol.* 2015;52: 979– 986.
20. Sagnou M, et al. Evaluation of naturally occurring curcuminoids and related compounds against mosquito larvae. *Acta Trop.* 2012;123(3): 190-195.
21. Gescher AJ, Sharma RA, Steward WP. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. *Lancet Oncol.* 2001;2: 371-379.
22. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005; 41:1955-1968.
23. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7: 1894-1900.
24. Ramaprasad C, Sirsi M. Indian medicinal plants: *Curcuma longa*; in vitro antibacterial activity of curcumin and the essential oil. *J Sci Ind Res.* 1956;15C: 239-241.
25. Carmona-vargas CC, Alves LC, Brocksom TJ, de Oliveira KT. Combining batch and continuous flow setups in the end-to-end synthesis of naturally occurring curcuminoids. *React. Chem. Eng.* 2017;2: 366-374.
26. WHO. (2005) Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. WHO, Geneva.
27. Langat BK, Siele DK, Wainaina C, Mwandawiro C, Ondich o J, Tonui WK, Anjili C, Ireru LN, Mutai CK. Larvicidal effect of *Mundulea sericea* (Leguminosae) plant extract against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Afr J Pharm Pharmacol* 2012; 1(3):106-109.
28. Finney DJ. 1971. Probit analysis, 3rd ed. University Press, Cambridge, England.
29. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 1925; 18: 265–267.
30. Ryan MF, Byrne O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J Chem Ecol* 1988; 14:1965–1975. doi:10.1007/BF01013489.
31. Isman MB. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot* 1988; 19:603–8
32. Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol* 2006. 51:45–66
33. Pavela R, Zabka M, Vrchotova N, Triska J, Kazda J. Selective effects of the extract from *Angelica archangelica* L. against *Harmonia axyridis* (Pallas)—an important predator of aphids. *Ind Crop Prod* 2013; 51:87–92
34. Pavela R Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *J Asia Pac Entomol* 2014a; 17:287–293
35. Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A: Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicol.* 2009, 2: 1-12.
36. Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, Aguilar-Garduño C, Blanco-Muñoz J, Pérez-Méndez O, et al. Interaction between organophosphate pesticide exposure and PON1 activity on thyroid function. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;249(1):16-24.
37. Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Thyroid hormones in relation to urinary metabolites of non-persistent insecticides in men of reproductive age. *Reprod. Toxicol* 2006a; 22:437–442
38. Meeker JD, Singh NP, Ryan L, Duty SM., Barr DB, Herrick RF, Bennett DH, Hauser R. Urinary levels of insecticide metabolites and DNA damage in human sperm. *Hum. Reprod* 2004b; 19:2573–2580.
39. Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T et al. Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. *Toxicology* 2009; 261:152-161

40. Lajmanovich RC, Peltzer PM, Martinuzzi CS, Attademo AM, Bassó A, Colussi, C. L. Insecticide pyriproxyfen (Dragón®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. *Chemosphere* 2019; 220: 714–722. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.181
41. World Health Organization (WHO). Pyriproxyfen in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers [Internet]. 2007 [cited 2019 April 29] Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/pyriproxyfenvector.pdf (25/08/2016).
42. Carvalho GHF, Andrade MA, Araújo CN, Santos ML, Castro NA, Charneau S, Monnerat R, Santana JM, Bastos IMD. Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nutshell against arbovirus vectors. *Environ Sci Pollut Res* 2019; 26(6): 5514–5523 <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3905-y>
43. Sutthanont N, Attrapadung S, Nuchprayoon S. Larvicidal Activity of Synthesized Silver Nanoparticles from *Curcuma zedoaria* Essential Oil against *Culex quinquefasciatus*. *Insects* 2019; 10(1), 27. doi:10.3390/insects10010027
44. Silva IG, Guimarães VP, Lima CG, Silva HHG, Elias CN, Mady CM, Silva VVM, Nery AP, Rocha KR, Rocha C, Isac E. Efeito larvicida e toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em criadouros artificiais. *Rev Pat Trop* 2003; 32:73–86.
45. Chaithong U, Choochote W, Kamsuk K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Chaiyasit D, et al. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) *J Vector Ecol.* 2006; 31:138–44.
46. Zhang YE, Ma HJ, Feng DD, Lai XF, Chen ZM, Xu MY, et al. Induction of detoxification enzymes by quercetin in the silkworm. *J Econ Entomol.* 2012;105: 1034–1042. pmid:22812145
47. Procópio TF, Fernandes KM, Pontual EV, Ximenes RM, Oliveira ARC, de Souza CS, et al. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *Plos One* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126612>.
48. Fujiwara GM, Annies V, de Oliveira CF, Lara RA, Gabriel MM, Betim FCM, Zanin SMW. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. *Ecotox Environ Safe* 2017; 139, 238–244. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.046
49. Shao Q, Yang B, Xu Q, Li X, Lu Z, Wang C, et al. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *J Biol Chem.* 2012;287: 14270–14279. pmid:22375003
50. Wittkopp PJ, Beldade P. Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Semin. Cell Dev Biol* 2009. Biol. 20, 65–71
51. Hiruma K, Riddiford LM. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol* 2009; 39, 245–253

3.2. ARTIGO 2: Environmental safety and mode of action of a novel curcumin-based photolarvicide

Environmental safety and mode of action of a novel curcumin-based photolarvicide

ABSTRACT

Aedes aegypti is the vector of some important diseases caused by arboviruses, including dengue, Zika, Chikungunya, and yellow fever. Vector control is pivotal in combating these mosquito-borne illnesses spread. A photoactivable larvicide obtained from curcumin (*Curcuma longa*) has shown high potential for *Ae. aegypti* larvae control. However, the toxicity of this photosensitizer (PS) might jeopardize non-target aquatic organisms. Along these lines and in order to ensure the environmental safety of this larvicide use in aquatic environments, the aim of this study was to evaluate the toxicity of PS to cladoceran *Daphnia magna* and the fish *Danio rerio*, besides its mode of action through larvae biochemical responses and morpho-histological studies. Therefore, three PS formulations were tested: PS in ethanol+DMSO, PS in sucrose and PS in D-mannitol. The LC₅₀ of PS in ethanol+DMSO to *D. rerio* was 5.9 mg L⁻¹, while in *D. magna* the solvents were extremely toxic, and LC₅₀ were not estimated. The other two formulations (PS in sucrose and in D-mannitol) were not toxic to neither of the organisms. Reactive oxygen species (ROS) were generated in *D. magna* exposed to 50 mg L⁻¹ of PS in D-mannitol, and *D. rerio* did not elicit this kind of response. *D. magna* feeding rates were not affected by the PS in D-mannitol. Concerning *Ae. aegypti* larvae, there were changes in reduced glutathione and protein levels, while catalase activity remained unchanged after exposure to PS in D-mannitol and sunlight. Morphological changes were observed in larvae exposed to PS in sucrose and D-mannitol, most of them irreversible and deleterious. Our results show the feasibility of this photolarvicide use in *Ae. aegypti* larvae control, since it is safe to non-target organisms and it provokes unrecoverable morphological changes in larvae. These data are crucial to this original approach implementation in public health politics.

Keywords: Curcumin; *Curcuma longa*; Photolarvicial; *Aedes aegypti*; Vector control; ecotoxicity; mode of action

1 INTRODUCTION

Arboviruses are one of the main public health concerns, especially in underdeveloped regions. Amongst these diseases, chikungunya, dengue, zika and yellow fever viruses are transferred by the cosmopolitan mosquito *Aedes aegypti*. In the last years, virus outbreaks astonished authorities and populations due to high mortality levels and deleterious effects in affected individuals. Zika virus, responsible for microcephaly in newborns, represents a severe health challenge, mainly due to the novelty of its effects and lack of studies concerning its structure and potential vaccines.

Vector control is one of the most important pathways in blocking these diseases spread. *Ae. aegypti* is responsible for high mortality rates in Brazil, where environmental and climate conditions are optimal for this species life cycle. Synthetic pesticides are often used for battling *Ae. aegypti*, besides the wide range of negative effects associated to this strategy, i.e. development of resistance; injuries to human beings and high environmental risk, affecting non-target organisms (Paiva et al. 2016; Singh et al. 2018; Abe et al. 2019).

Natural compounds arrive as a potential tool to overcome heavily usage adverse consequences. Curcuminoids, derivatives of *Curcuma longa*, are known for their anti-inflammatory, anti-angiogenic, anti-oxidant and anti-cancer effects, besides being bactericidal, fungicidal and larvicidal (Maheshwari et al. 2006; Sagnou et al. 2012; Tyagi et al. 2015; Cheng et al. 2019; Shanmugam et al. 2019). These pigments, when combined to specific light spectra (400-500 nm), act as a photolarvicide, presenting high larvicidal potential against *Ae. aegypti* (Souza et al. 2019).

Photosensitizing reactions depends on oxygen, destroying a biomolecule when the photosensitizer (PS) absorbs light. In the type I photodynamic reaction, the PS reacts with the biomolecule forming a radical species, which reacts with molecular oxygen and produces an oxidized biomolecule; while in the type II photodynamic reaction, a singlet oxygen is produced by transference of PS electrons to molecular oxygen (Dondji et al. 2005; Huang et al. 2009). These light and oxygen dependent reactions yields a quicker and more efficient response on attacking biomolecules or undesired organisms, as seen the LC50 found for curcumin as a PS against *Ae. aegypti* larvae is 10 times lower than curcumin in the dark (Souza et al. 2019).

Other natural compounds, especially essential oils have been used as larvicides, such as *Citrus aurantium*, *Menta longifolia*, *Heracleum sprengeianum* (Michaelkis et al.

2009; Pavela et al. 2014; Govindarajan and Benelli, 2016), amongst many others. After an extensive review on phytochemical larvicides, Shaalan et al. (2005) found that one of the most promising was a steam distilled extract of *Callitris glaucophylla*, with a LC50 of 0.69 mg L⁻¹ to *Ae. aegypti* larvae (Shaalan et al. 2003). In spite of their efficiency in controlling mosquito larvae, concerns on their environmental safety and effective doses still remain, since there are only a few reports on the effects of these novel on non-target organisms. Moreover, insights on the mode of action of these natural compounds are scarce, hindering these products from becoming commercially available and widely employed against disease vectors.

Water bodies are the final fate of most xenobiotics arisen from anthropogenic actions, such as biocides (Pereira et al. 2009). Consequently, non-target organisms that share the environment with target ones might be exposed to products able to cause not only individual deleterious effects, but also jeopardize entire populations fitness and survival. The appraisal of the effects of new biocides is pivotal for their safe use. Toxicity of commercially available pesticides to non-target species is extensively studied (Ernst et al. 2001; Antwi and Reddy, 2015; Pisa et al. 2015). Even natural compounds used as larvicides, seen as eco-friendly, could elicit injuries on non-target organisms: *Mammae siamensis* extract had adverse effects on the fish *Poecilia reticulata* at the LC50 value to *Ae. aegypti* (Promsiri et al. 2006); while linalool and methyl cinnamate (plant essential oils) cause lethality to *Artemia salina* (Fujiwara et al. 2017). Fabris and colleagues (2012) exposed the microcrustacean *Artemia franciscana* and *D. magna* to a photoactivatable porphyrin and found that the first organism is more resistant than the latter, evincing the need of a non-target organism toxicity screening before selecting products to be used in the aquatic environment.

Effects on non-target organisms can be evaluated through acute toxicity, but also by more subtle effects, such as behavior, enzyme activities and metabolism. Benelli and colleagues (2017) listed some assays that should be performed before implementing novel biocides to mosquito control, including chronic toxicity for target and non-target organisms and the impact of sub-lethal doses on behavioral traits of these organisms. The freshwater microcrustacean *Daphnia magna* is a standard toxicity test model organism widely used by regulatory agencies; they are easy to culture in laboratory and very sensitive to the presence of hazardous compounds in water (Barata et al. 2005; Couling et al. 2006). Zebrafish (*Danio rerio*) is extensively used as a vertebrate toxicology model, since it plays important roles in aquatic food-webs, is a sentinel for water quality, its laboratory maintenance is easy and low-

cost, and it shares wide homology with human genome (Barbazuk et al. 2000; Lammer et al. 2009). Considering the exposed, both organisms were elected for our study.

In order to assess the viability of curcumin as a photolarvicide, the aim of this study was to elucidate synthetic curcumin mode of action as a photosensitizer to combat *Ae. aegypti* larvae, and to assess this molecule environmental safety. To this end, acute toxicity and reactive oxygen species (ROS) generation were accessed in *D. rerio* and *D. magna*, and food ingestion in *D. magna* exposed to the PS formulation. Additionally, morpho-histological changes and biochemical responses in *Ae. aegypti* larvae submitted to the PS in sugars were also evaluated. To the best of our knowledge, this is the first time that the ecotoxicity of curcuminoids employed as photolarvicides is appraised, in an effort to establish a new environmental-friendly larvicidal approach.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

The photosensitizer (PS) used was synthetic curcumin, synthesized at Federal University of São Carlos as described in Carmona-Vargas et al. (2017). It consisted of high purity curcumin ($\geq 98\%$). The other chemicals, including sucrose and D-mannitol (Sigma).

2.2 Photosensitizer formulations

Three forms of PS were used in this study: a) synthetic curcumin dissolved in 1% DMSO and 99% ethanol 96°G.L. (v/v), yielding a 1.5 mg mL^{-1} (w/v) stock solution; b) synthetic curcumin physically combined to sucrose, in 1% curcumin and 99% sucrose (w/w) and c) synthetic curcumin physically combined to D-mannitol, in 1% curcumin and 99% D-mannitol (w/w). These three forms were directly dissolved in the exposure media for the tests.

2.3 Acute toxicity assays in non-target organisms

2.3.1 *Danio rerio*

Adult male and female of zebrafish (*D. rerio*; $(0.31 \pm 0.09) \text{ g}$; $(2.34 \pm 0.31) \text{ cm}$) were purchased from a local commercial store and acclimated in 50 L aquaria with dechlorinated tap water, constant aeration, and (12:12) h photoperiod for 15 days. Fish were fed twice a day with commercial food pellets. Water parameters were monitored daily and kept under optimal conditions for the species (temperature $(22.0 \pm 2.0) \text{ }^\circ\text{C}$; pH (7.0 ± 1.0) ; dissolved oxygen $(6.8 \pm 1.0) \text{ mg L}^{-1}$).

Acute toxicity experiments were performed in 5L glass aquaria, containing 2L of dechlorinated tap water, with (12:12) h photoperiod, constant aeration, in a static system. Feeding was discontinued 24h prior to the beginning of the experiments to prevent organic matter debris. Five fish were placed in each aquarium, and all concentrations were performed in triplicate (range of 1.8 to 100 mg L⁻¹). Control was performed by clean water and by solvent (ethanol+DMSO, sucrose or D-mannitol). Exposures lasted 96h in static condition, water parameters and fish mortality were evaluated every 24h. By the end of the experiments, remaining live fish were killed by anesthesia in eugenol (1:20) (Inoue et al. 2004) and discarded properly.

All the fish experiments and procedures were approved by the local ethical committee, under protocol n. CEUA 11/2016 (Anexo B).

2.3.2 *Daphnia magna*

Organisms were cultivated in reconstituted water, containing CaCl₂·2H₂O (294 mg L⁻¹); MgSO₄·7H₂O (123.25 mg L⁻¹); NaHCO₃ (64.75 mg L⁻¹) e KCl (5.74 mg L⁻¹); pH (8.1±0.2) and 3 mg L⁻¹ dissolved O₂ (OECD, 2004). Cladocerans were kept at an incubator at (20±2) °C, photoperiod of (16:8) h (light:dark) and fed with *Pseudokirchneriella subcapitata* (3x10⁵cell.mL⁻¹) once a day.

In order to perform the acute toxicity assay, five neonates of *D. magna* (< 24h old) were carefully distributed in each 10 mL well of a polycarbonate multiwell plate; 4 wells were used per concentration (n=20) (range of 2.0 to 100 mg L⁻¹). Fulfilled plates were placed in the incubator, at the same conditions of organism's culture. Tests were performed in the dark and in 16:8 light:dark photoperiod, in static condition. Control consisted of reconstituted clean water and with solvent (ethanol+DMSO, sucrose or D-mannitol). Feeding was discontinued during the experimental span. Immobilization was recorded over 24h and 48h. Sensitivity of organisms was evaluated once a month, by an acute toxicity test, at the same described conditions, with the reference chemical potassium dichromate (K₂Cr₂O₇).

2.4 *Sub-lethal toxicity assays in non-target organisms*

2.4.1 *Reactive oxygen species (ROS) generation assay*

Since the synthetic curcumin+D-mannitol form presented the greatest larvicidal potential for field-testing (as seen the gut morphological alterations), it was elected for further

investigation in non-target organisms. As a sub-lethal endpoint, ROS generation was evaluated in cladoceran and fish. Both organisms were submitted to 1, 5 and 50 mg.L⁻¹ of synthetic curcumin in D-mannitol.

In the *D. magna* experiment, 7 organisms (48h old), in 5 replicates per concentration (n=35), were exposed to the PS for 6h, at the same conditions described for the acute toxicity assay. By the end of the experimental span, each organism was transferred to a well of a 96 wells plate containing 200 µl of 10 µM 2'7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) (LeBel et al. 1992; Bae et al. 2016). *D. magna* were incubated with this label for 4h, in the dark. Afterwards, the plate was read at a microplate reader (excitation 498 nm; emission 522 nm).

For *D. rerio* assays, 10 fish per replicate (n = 20) were submitted to the same PS concentrations used in the *D. magna* experiments. After 24 h of exposure, fish were killed by anesthesia in eugenol (1:20) (Inoue et al. 2004). Gills were excised, rinsed in NaCl 0.9% solution and placed in microcentrifuge tubes containing 500 µl of phosphate buffer pH 7.2, at 1:1 (mass:volume) proportion. Tissues were homogenized in an Ultra-Turrax (T8 IKA) and centrifuged at 10,000 g for 10 min, at 4°C. Supernatant was used as ROS source, and 5µM H₂DCF-DA as the free radicals label. Samples were incubated for 30 min in the dark, and readings taken at excitation 498 nm and emission 522 nm.

Both experiments controls were comprised of organisms in exposure media; in exposure media and D-mannitol at the same quantity of the highest PS concentration tested; and a positive control of 0.1% H₂O₂.

Generated ROS are expressed as the percentage of fluorescence intensity compared to pristine control group.

2.4.2 Feeding rate

Feeding rate of *D. magna* exposed to 1, 25 and 50 mgL⁻¹ of PS in D-mannitol were evaluated. Five organisms (48h old) per replicate (n=15) were placed in plastic containers and allowed to feed with *P. subcapitata* (5 x 10⁵ cells.mL⁻¹) for 24h. The initial and final number of microalgae cells were accessed by fluorometric reading of chlorophyll-a at a microplate reader (excitation 430nm and emission (671±10) nm). A calibration curve was used to convert fluorescence values to cells.mL⁻¹. Feeding rates were calculated following Allen et al. (1995):

$$F = \frac{V}{n} (C_0 - C_{24})/t$$

Where F is the feeding rate (mL.ind-1h-1); V is the volume of medium in test containers (mL); n is the number of daphnids in volume V ; C_0 is initial the initial algal cell concentration (cells mL^{-1}); C_{24} is the final algal cell concentration (cell mL^{-1}) and t is the duration of the test (24h).

2.5 *Ae. aegypti* experiments

Eggs of *Ae. aegypti* (Rockfeller strain) were kindly donated by Mérieux Nutrisciences (Charqueada- SP, Brazil). They were maintained in plastic trays containing 1L of dechlorinated water, at (27 ± 2) °C and (12:12) h light:dark photoperiod, until hatching. After hatching, larvae were fed once a day with milled commercial fish food, until third instar (L3) was achieved.

Groups of 20-25 larvae (L3) were equally distributed in 3 transparent plastic containers with 200 mL of dechlorinated water, at pH 7.0, per concentration. The PS formulation comprised of ethanol+DMSO was highly toxic to non-target organisms, being unfeasible for field use; thus its effects were not evaluated in the mosquito larvae. The PS concentrations (with sucrose or D-mannitol) tested were 0.45; 1.8 and 5.4 mg L^{-1} . Control treatments were performed by larvae in clean water exposed to sunlight, larvae with the carrier/solvent (sucrose or D-mannitol) and also by the highest PS concentration in the dark.

Test containers with larvae and PS were exposed to natural sunlight, directly and indirectly for 8 h. After 1 h of treatment, lethargic larvae were collected and fixed in buffered formaldehyde for histological analysis or flash frozen on -80°C freezer for biochemical assays.

2.5.1 *Histological analysis*

After fixation, samples were dehydrated in ethanol and embedded in Historesin® (Leica, Heidelberg, Germany). Longitudinal sections of whole larvae, 3 μm thick, were stained with hematoxylin/eosin. Ten random microscopic fields of each section were observed at optic microscopic (Nikon H600L). Images were captured with a digital camera and analyzed with the Motic® Images Plus 2.0 software.

2.5.2 *Biochemical assays*

Catalase (CAT) activity and reduced glutathione (GSH) content was evaluated on larvae exposed to PS in D-mannitol, since this formulation was better evaluated considering larvae morphology and effects on non-target organisms. Assays were conducted

under indirect sunlight. Catalase activity was assayed in pools of 20 larvae, homogenized in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4). Homogenates were then centrifuged at 10.000 rpm, for 10 min, at 4°C. Supernatant was used as a crude enzyme source. CAT activity was quantified by reading H₂O₂ decay at 240nm, following Beers and Sizer (1952). One unit of CAT was defined as the amount of enzyme required in 1.0 μmol of H₂O₂ min⁻¹ oxidation, using $(\text{H}_2\text{O}_2)\varepsilon_{\lambda 240} = 0.071 \text{ mM cm}^{-1}$.

Reduced glutathione content was determined in the same homogenates used for CAT assay, through the anion thionitrobenzoate from dinitrothiobenzoate (DTNB) as a reagent, read at 412nm (Beutler, 1984).

Total protein was determined with Bradford reagent, using a standard solution of bovine serum albumin (BSA) (Kruger 1994).

2.6 *Data analysis*

Mean lethal concentration (LC₅₀ for fish) and mean effective concentration (EC₅₀ for cladocerans) were determined by linear regression analysis after logarithmic transformation of PS concentrations, in relation to the percentage of affected organisms, and upper and lower limits were calculated with 95% of confidence. ROS, feeding rate and biochemical data were tested for normality (Shapiro–Wilk test) and analyzed using ANOVA and Tukey test at 95% confidence. Origin® 7.8 and Prism 8.0 were used for statistical tests.

3 RESULTS

3.1 *Acute toxicity assays in non-target organisms*

3.1.1 *D. magna* assays

Cladocerans were exposed to the range of 2 mg.L⁻¹ to 26 mg.L⁻¹ of the PS in ethanol+DMSO. It was not possible to access EC₅₀;48h of this formulation, since the solvents used (ethanol+DMSO) were highly toxic to *D. magna*, causing more than 10% of mortality on the solvent control (OECD, 2004). On the other hand, the formulations comprised by PS in sucrose or PS in D-mannitol were considered non-toxic to this specie, owing to the lack of mortality/immobility even in the concentration of 100 mg.L⁻¹ (OECD, 2004). Experiments performed at dark or with photoperiod (16:8h light:dark) presented the same results. Fig 1 presents *D. magna* after exposure to PS and sugar formulations. At the

highest concentrations (100 mg L^{-1} of both formulations), it is possible to observe PS adhered to the organism's body and throughout the digestive tract, although no acute toxicity has been recorded. $\text{EC}_{50;24\text{h}}$ for the reference substance $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ was between 0.6 and 2.1 mg L^{-1} , indicating organism's suitable conditions for the experiments (OECD, 2004).

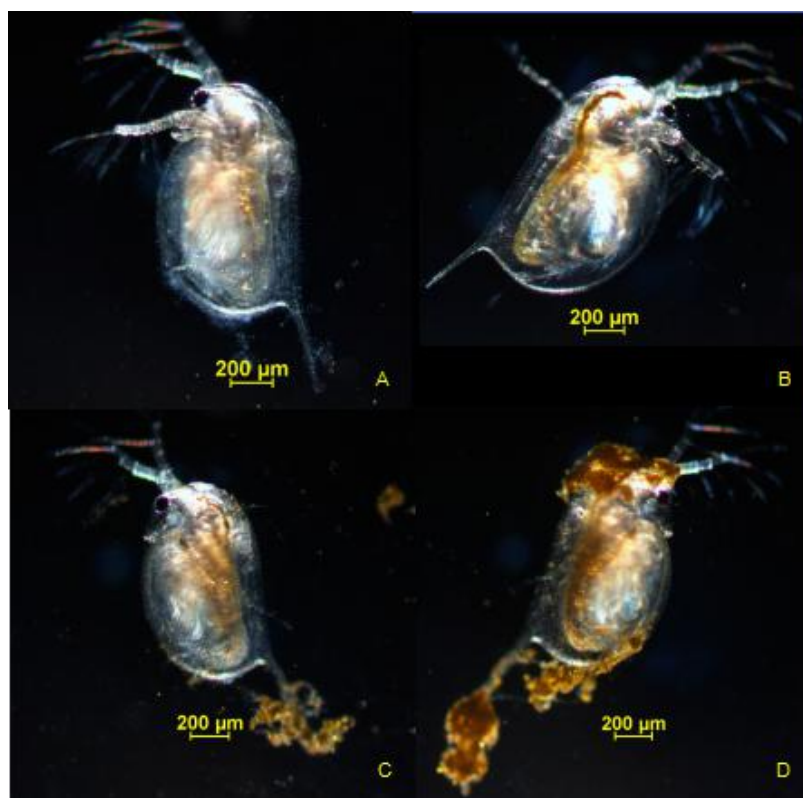


Fig 1. Light microscope images of *Daphnia magna* (40x). A) Control. B) *D. magna* after 48h exposure to 1 mg L^{-1} and 100 mg L^{-1} PS in D-mannitol (C and D).

3.1.2 *D. rerio* assays

The $\text{LC}_{50;96\text{h}}$ of the PS in ethanol + DMSO to *D. rerio* was 5.9 mg L^{-1} (lower limit: 2.55; upper limit: 13.6). Table 1 brings the mortality rates of fish exposed to the PS in ethanol + DMSO.

The other two formulations tested (v.g. PS in sucrose and PS in D-mannitol) were considered non-toxic to *D. rerio*, since no mortalities were recorded neither at 100 mg L^{-1} of PS in sugar, nor in the solvent controls (only sucrose or D-mannitol in exposure media) (OECD, 2004).

Table 1. Mortality rates of *Danio rerio* exposed to curcumin (PS) in ethanol + DMSO for 48h.

Treatment	Mortality (%)
Control	0
Solvent control	0
1.8 mg. L ⁻¹	0
3.6 mg. L ⁻¹	40
5.4 mg. L ⁻¹	40
7.2 mg. L ⁻¹	70
14.4 mg. L ⁻¹	90
28.8 mg. L ⁻¹	100

3.2 *Sub-lethal toxicity assays in non-target organisms*

3.2.1 *ROS generation*

After 24h of exposure to PS in D-mannitol, *D. magna* exposed to the higher concentration (50 mg.L⁻¹) presented a significant increase of 59% in ROS generation when compared to pristine control (Fig 2A). The other treatments evaluated did not exhibit statistical meaning. Concerning fish exposed to the photosensitizer, there were no significant differences in ROS generation in any of the treatments (Fig 2B).

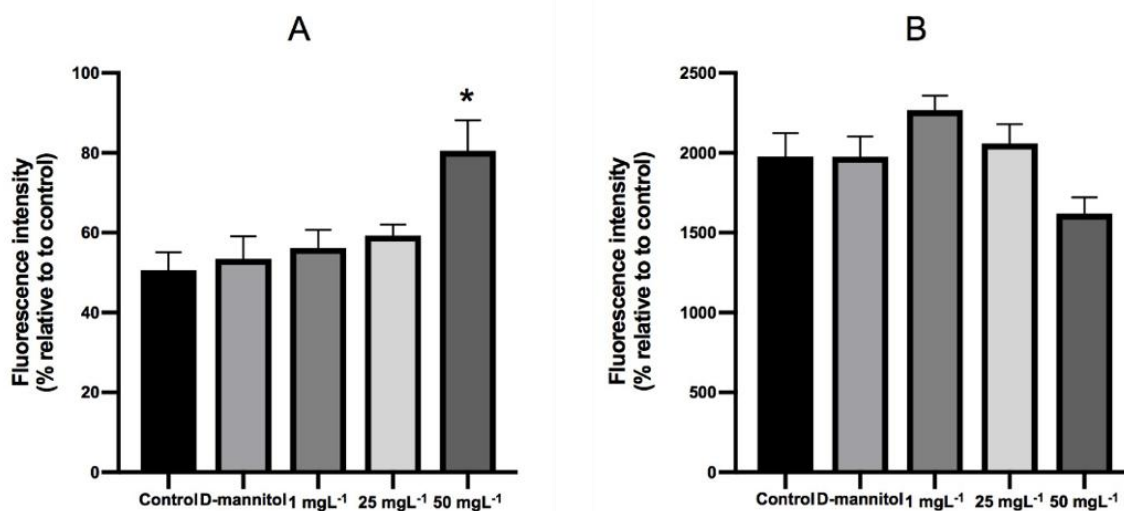


Fig 1. ROS generation expressed as the percentage of fluorescence intensity relative to the control in (A) *Daphnia magna* and (B) *Danio rerio* after exposure to the photosensitizer (PS) curcumin in D-mannitol for 24h. Data are presented as mean \pm SEM. Asterisk (*) indicates significantly different from control ($p < 0.05$)

3.2.2 Feeding rates

There were no changes on food ingestion of *D. magna* in either of the treatments evaluated. However, at the highest concentration of the PS in D-mannitol (50 mg L⁻¹), an algal growth of 117% compared to pristine control was observed (Fig 3).

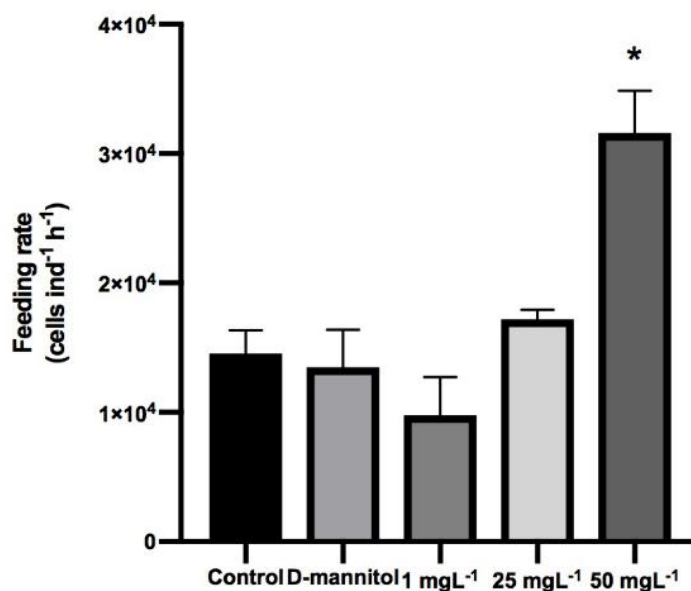


Fig 3. Feeding rate of *Daphnia magna* on *P. subcapitata* cells after 24h of exposure to the photosensitizer (PS) curcumin in D-mannitol. Data are presented as mean \pm SEM. Asterisk (*) indicates significantly different from control ($p < 0.05$).

3.3 *Ae. aegypti* experiments

3.3.1 *Histological analysis*

Larvae submitted to PS in sucrose and PS in D-mannitol presented 100% mortality in concentrations of 0.45, 1.8 and 5.4 mg.L⁻¹, after 8 hours of direct or indirect sunlight exposure. After 1h of treatment, larvae were lethargic, with low surfacing rates.

Fig 4 presents regular morphologic characteristics of the digestive tract of larvae from control group, maintained in clean water and exposed to sunlight. For didactic purposes, mesenteric was divided in three regions: anterior (Fig 4A), medium (Fig 4B) and posterior (Fig 4C). Anterior region is comprised of segment I and three gastric caeca (GC); third caecum is evinced only at superficial layers (Fig. 4A). GC is constituted of big and well-defined cells, flattened and with brush-borders, with poorly defined villosities. Intestine epithelium is structured by a single cylinder cell layer, coated by a protective membrane, named peritrophic membrane (PM) or matrix. High secretive activity (SA) was observed at the posterior region (Fig. 4C).

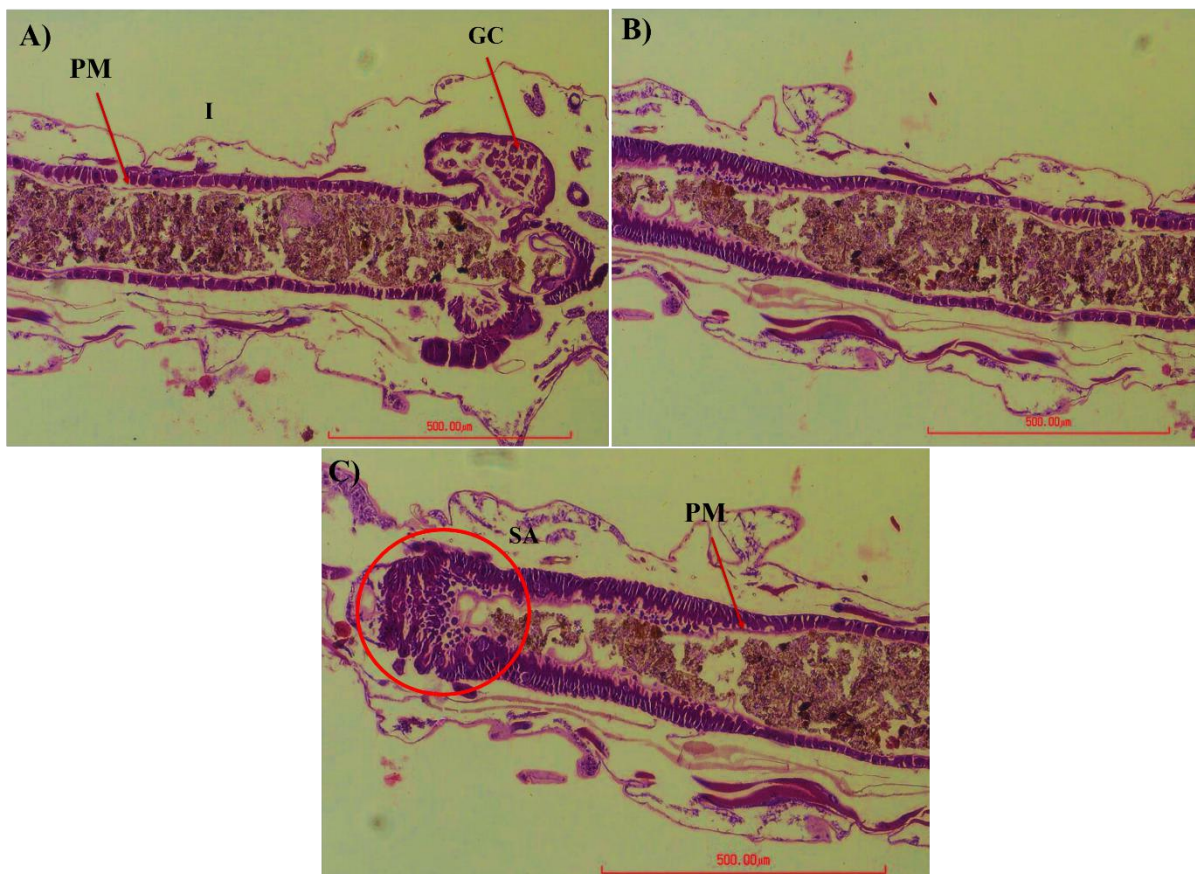


Fig 4. Control larvae (kept in clean water and exposed to sunlight) evincing the mesenteric with regular characteristics. A) The anterior region comprised of segment I and gastric caeca (GC), B) The middle region and C) Posterior region. SA, secretory activity; PM, peritrophic matrix. Stained with hematoxylin and eosin (HE). Scale bars: 500 μm

Mesenteric from larvae exposed to the highest PS concentration (both PS in sucrose and PS in D-mannitol) in the dark for longer than 3 hours presented moderate morphologic alterations, such as constriction, light epithelium stratification, cytoplasm vacuolization in GC cells and intercellular space augmentation. Larvae exposed to PS in sucrose showed cell vacuolization on GC and anterior region, while those in contact with PS in D-mannitol exhibited an onset of constriction at the anterior region. Medium region cells presented regular characteristics, with integretes BB and PM. All larvae were still alive by the end of the experimental span.

Fig 5 brings larvae submitted to PS in sucrose and PS in D-mannitol at 5.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ exposed to direct sunlight.

Considering the PS in sucrose treatment, constrictions fully dividing 2 regions of the mesenteric were observed (Fig. 5A and 5B). Other alterations found include PM thickening, GC cell alteration, apical vesicles formation, high vacuolization, cytoplasmic

content expulsion to lumen, a barely integrate BB and epithelium stratification. These injuries were seen at anterior and medium regions of the mesenteric. Some regions also presented a poorly integrate PM. Regarding PS in D-mannitol, all the mesenteric regions presented a severe cell disorganization, with the complete disappearance of the simple column epithelium characteristic (Fig 5C and 5D). The most common morphologic alterations were: shortening and collapse of digestive tract, cuticle folds formation, cytoplasmic content expulsion to lumen, complete PM destruction, BB disintegration, cell hypertrophy and epithelium stratification.

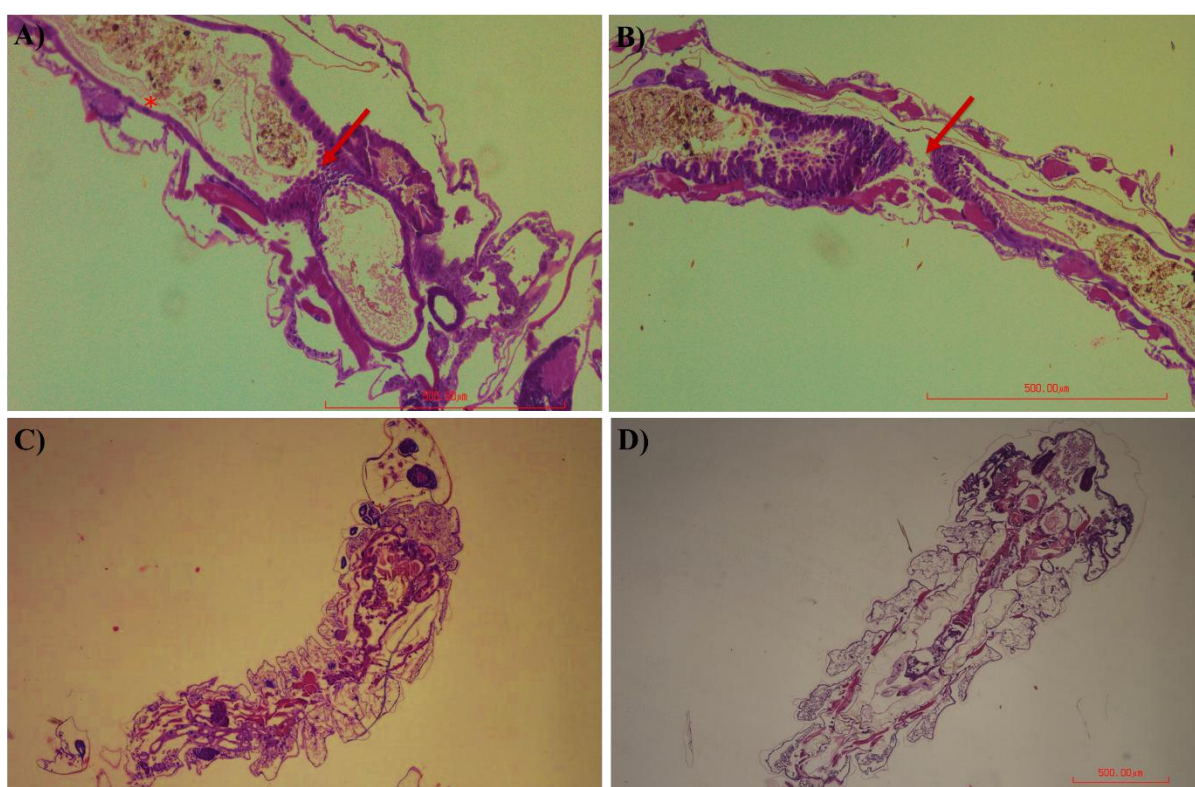


Fig 2. Larvae submitted to PS in sucrose and PS in D-mannitol at 5.4 mg. L-1, exposed to direct sunlight for 3h. A) Anterior region of larvae exposed to PS in sucrose, evincing constriction formation (arrow) and PM thickening (asterisk), B) Posterior region of larvae exposed to PS in sucrose presenting feeding channel rupture by constriction. C and D) Complete cell disorganization, cuticle folds presence and feeding channel obstruction at larvae exposed to PS in D-mannitol. Stained with hematoxylin and eosin (HE). Scale bars: 500 µm

Larvae exposed to indirect sunlight presented less severe injuries than those found in the organisms exposed to direct sunlight. The column epithelium characteristic was maintained. In despite of that, considering larvae submitted to PS in sucrose, some alterations were observed especially at the anterior region, such as intercellular space augmentation, GC cells cytoplasmic vacuolization, apical vesicle formation and integrate PM. On the other hand,

organisms in contact with PS in D-mannitol, the changes found comprise PM folds, anterior region constriction, apical vesicle formation and cytoplasmic vacuolization. These findings are brought by Fig 6 (A and B).

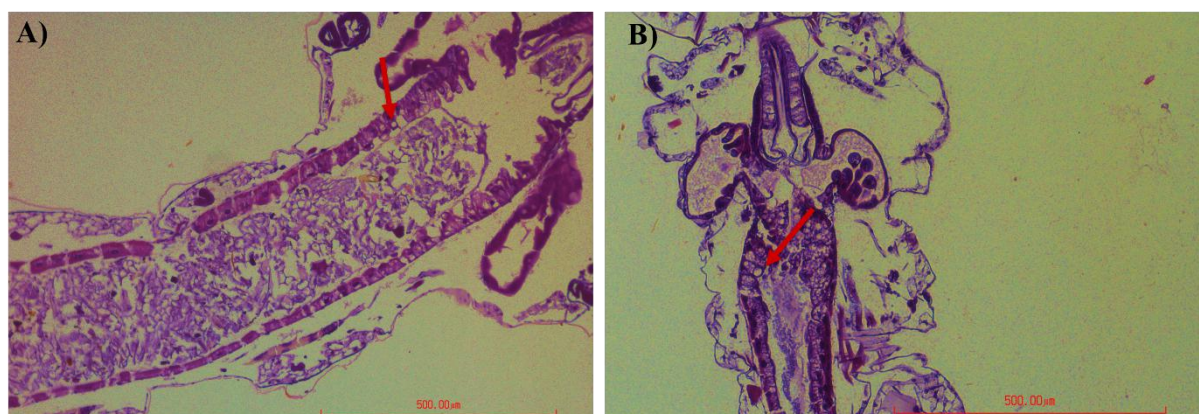


Fig 6. Larvae submitted to PS in sucrose (A) and PS in D-mannitol (B) at 5.4 mg. L⁻¹, exposed to indirect sunlight for 3h. Arrow in A: vacuolization and apical vesicle formation. Arrow in B: anterior region constriction and cytoplasmic vacuolization. Stained with hematoxylin and eosin (HE).

3.3.2 Biochemical assays

Catalase activity was not responsive to any of the PS concentrations tested. On the other hand, GSH levels depicted a 33% raise at 0.45 mg.L⁻¹ and the same reduction at 1.8 mg.L⁻¹. Total protein content was 41% higher at 1.8 mg.L⁻¹, and 19% at 5.4 mg.L⁻¹. Data are presented in Table 2.

Table 2. Catalase (CAT) activity, reduced glutathione (GSH) and total protein content in larvae of *Ae. aegypti* exposed to curcumin in D-mannitol and indirect sunlight.

	Control	Dark control	D-mannitol	0.45 mg L ⁻¹	1.8 mg L ⁻¹	5.4 mg L ⁻¹
CAT (IU mg protein ⁻¹)	4.03 ±1.0	2.85 ±0.4	3.05 ±0.9	2.9 ±0.5	2.57 ±1.1	3.12 ±0.7
GSH (µmol GSH mg protein ⁻¹)	0.03 ±0.0	0.02 ±0.0	0.03 ±0.0	0.04 ±0.0*	0.01±0.0*	0.03±0.0
Protein (mg)	0.46 ±0.06	0.43±0.04	0.52 ±0.07	0.44 ±0.05	0.65 ±0.09*	0.55 ±0.02*

* Significantly different from control (p<0.05). Data are presented as mean ± standard deviation (n=20). International Units (IU).

4 DISCUSSION

Cases of people infected by viruses sharing *Ae. aegypti* as a vector have risen sharply in the last years. Notwithstanding the importance of these arboviruses in public health, there is still a lack of actions to combat the mosquitoes while protecting non-target species from deleterious effects. The findings of our study provide a novel, feasible and eco-friendly strategy to kill *Ae. aegypti* larvae, considering the mode of action of the PS on these organisms, coupled to the absence of lethal and sub-lethal effects on non-target biota.

Ideal larvicides should exhibit some characteristics, comprising durability, low toxicity to both humans and non-target species and persistence (Morrison et al. 2008). Taking these into account, the photosensitizer curcumin in sugars fits most of them, as our results show. The larvicide activity of curcumin and its derivatives is already known (Sukari et al. 2010; Sagnou et al. 2012; Ali et al. 2015); however only recently the photolarvicidal effect of curcuminoids in *Ae. aegypti* larvae control was reported (Souza et al. 2019).

Unwanted effects of synthetic larvicides to the non-target biota are well reported in literature. Diflubenzuron and themephos, widely used larvicides worldwide, are considered highly toxic to *D. magna*, causing mortality at concentrations below those used to kill *Ae. aegypti* larvae (Abe et al. 2014). Moreover, pyriproxyfen also poses risks do this cladoceran and to *Artemia salina* at environmentally relevant concentrations (Santos et al. 2017). In opposition to these larvicides, both formulations of the PS curcumin in sugars tested in our study did not present acute toxicity to *D. magna*, even at a very high concentration (100 mgL⁻¹). On the other hand, the PS formulation in ethanol+DMSO was highly toxic to the cladocera due to the organic solvents used. Ethanol and DMSO, used as solvents, are able to lower the LC50 of other compounds to *D. magna* (Zhang et al. 2003; Haap et al. 2008); moreover, Takahashi et al (1987) reports a concentration <0.5 mg.L⁻¹ of ethanol as safe for this cladocera, but not for *Ceriodaphnia dubia*.

The PS in ethanol+DMSO yielded a LC50 of 5.9 mg.L⁻¹ to *Danio rerio*, which is classified as moderately toxic to this species accordingly to the United States Environmental Protection Agency (USEPA); the formulations in sugar (PS in sucrose and D-mannitol) are considered non-toxic to this freshwater fish. Considering the acute toxicity observed for *D. magna* and previous results on the better performance of PS in sugar in killing *Ae. aegypti* larvae, it is reasonable to use these formulations in detriment of that in organic solvents. Synthetic pesticides can be harmful for freshwater fish: pyriproxyfen is able to impair the proper development of *D. rerio* embryos, besides being neurotoxic (Truong et al. 2016); it was

also observed that this larvicide changes the antioxidant metabolism, inhibits the activity of acetylcholinesterase, damages DNA and alters the morphology of the same organisms (Maharajan et al. 2018). Other larvicides, as temephos and diflubenzuron also cause adverse effects in *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques* (Abe et al. 2019).

Although botanical larvicides can be highly effective in killing larvae and are considered environmentally safe, they can cause lethal or sublethal effects on non-target biota (Sivagnaname and Kalyanasundaram, 2004; Conti et al. 2014). Nevertheless, the lack of studies on this important subject is notorious. PS in both sugars (sucrose and D-mannitol) did not exhibit mortality for two of the most studied non-target aquatic organisms (*D. magna* and *D. rerio*), evincing the safety of this novel botanical photolarvicide. On the contrary, the essential oil of *Pimpinella anisum* and its major constituent, trans-Anethole, exhibited high efficacy against *Culex quinquefasciatus* larvae, but caused mortality and fertility decreases in *D. magna* at the concentration of 35-50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ and 48h of exposure (Pavela 2014). On the other hand, concerning the fish *Gambusia affinis*, the compounds of *Zanthoxylum monophyllum* essential oil yielded a $\text{LC}_{50} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$, and are considered non-toxic to this species, although exhibiting larvicidal activity against *Anopheles subpictus*, *Ae. albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Pavela and Govindarajan, 2017).

Pollutants effects on non-target biota are not always lethal, yet they can lead to adverse sub-lethal effects, which might compromise population's fitness and survival. ROS generation is an inherent condition of aerobic life, although its overproduction, combined to flaws in scavenging mechanisms, might cause adverse effects. Curcumin is known for its antioxidant properties (Ak and Gülçin, 2008; Akinyemi et al. 2018). However, there was an increase in ROS production in *D. magna* only at the higher concentration of PS in D-mannitol (50 mg.L^{-1}). ROS generation is one of the consequences of detoxification processes, which might have occurred in the cladoceran exposed to such a high concentration of PS in D-mannitol. Photosensitizers acts through the so called photodynamic reactions, which yields radical species that reacts with molecular oxygen or produces singlet oxygen (Dondji et al. 2005). Higher ROS generation in *D. magna* could be due to the PS mode of action, taking place only at the higher concentration tested. When organism's defenses are not able to properly fight ROS, enzyme inactivation, DNA damage and strand breaks and lipid peroxidation might occur (Kelly et al. 1998). It is important to highlight that *D. magna* exposure to this concentration for 48h is very unlikely on natural environments, since the concentration used for causing lethal effects on *Ae. aegypti* larvae is at least 40 times lower

than 50 mg.L⁻¹. Differently, *D. rerio* antioxidant metabolism did not seem to be affected by PS in D-mannitol, demonstrating both PS safety in aquatic environments and the specificity of each organism response.

Regular metabolic activity relies heavily on correct energy supplies, which is achieved by active feeding in heterotrophic organisms. Exposure to PS in D-mannitol did not affect *D. magna* food ingestion, corroborating Lekamge et al. (2019) data, where silver nanoparticles coated with curcumin did not change *D. carinata* feeding. In spite of that, there was an alga proliferation at the higher concentration tested. This could be explained by two hypotheses: the media enrichment provided by PS in D-mannitol, that could be used as macronutrients, favoring *P. subcapitata* growth; or changes in light intensity due to the color of the media modified by the PS, altering algae photosynthesis rate (Geis et al. 2000). Disruptions in primary producers, such as algae, may lead to important changes at organisms in other trophic levels (Pfleeger et al. 1991), since the first are the base of aquatic food webs. Other larvicides, such as those derived from *Bacillus thuringiensis*, can also impact these communities (Koskella et al. 2002; Duguma et al. 2017). In spite of that, as already mentioned, the concentration of PS in D-mannitol that causes algae cell proliferation is environmentally unrealistic, so it would not cause negative impacts to these organisms, reassuring the photolarvicide safety.

Notwithstanding the importance of non-target organisms' toxicity evaluation, knowledge on the mode of action of a novel larvicide is essential for the safety of a future widespread use. Regarding *Ae. aegypti* larvae biochemical responses, PS in D-mannitol did not change CAT activity in neither of the concentrations tested. On the other hand, GSH was augmented at 0.45 mg.L⁻¹ and diminished at 1.8 mg.L⁻¹, remaining unchanged at the higher concentration tested. CAT is a crucial enzyme in H₂O₂ detoxification, avoiding the deleterious effects caused by this reactive oxygen species (Di Giulio and Meyer, 2008). Along with enzymatic defenses, GSH is a molecule that acts both on pro-oxidants scavenging and on detoxification; it is also able to directly reduce ROS through its thiol group (Lushchak, 2011). The unresponsiveness of CAT activity might indicate that this is not a recruited defense to protect against the PS; furthermore, morphological injuries in the larvae's gut might have happened before CAT expression took place, since the PS action is extremely quick. Possibly, morphological injuries happened rapidly enough to prevent CAT expression from developing.

On the other hand, GSH overproduction at the lowest concentration (0.45 mg.L⁻¹) indicates detoxification efforts, which could be accompanied by other enzymatic defenses

(especially those that are part of glutathione metabolism, such as peroxidases, reductases and transferases) that were not evaluated in our study. It is likely that the lower concentration triggered GSH responses, while the medium one was already able to deplete this molecule (v.g. the drop at its content). Moreover, the higher concentration could have been so morphologically destructive that tissues lacked integrity for biochemical responses. In this way, the lower and medium concentration mobilized GSH in order to overcome PS intoxication, since glutathione-S-transferase is one of the most recruited enzyme in larvae detoxification metabolism (Le Goff et al. 2006; Riaz et al 2009).

The hyperproteinemia seen at the last two concentrations could be a result of intracellular content leakages due to serious morphological injuries. Another plausible hypothesis is that cellular machinery was engaged on producing detoxification enzymes, in order to deal with PS intoxication. However, this was not completed, since morphological changes arrived early enough to prevent these enzymes from properly functioning. Mukherjee et al. (1998) also observed higher protein content in larvae of the beetle *Tribolium castaneum* exposed to the active ingredient of neem leaves (azadirachtin), which was attributed to the increased activity of detoxifying enzymes.

Early signs of toxicity in larvae exposed to botanic larvicides comprise changes in the organism's mobility in water environment (Ruiz et al. 2004). At our study, this behavior was observed after 0.5h of exposure to the PS in sucrose and PS in D-mannitol, under direct sunlight. Our findings agree with those from Barreto and colleagues (2006), who exposed *Ae. aegypti* larvae to buthanolic extract of *Sapindus saponaria* Lin. Larvae submitted to both luminance conditions presented pivotal morphological alterations, however at indirect sunlight these were milder and limited to only one region when compared to those from direct sunlight.

The mode of action of botanical larvicides is still overlooked; there are few reports on this subject on the literature, besides its importance. Histopathological outcomes of these xenobiotics differ depending on their location along the digestive tract, the used concentration, length of exposure and species (Rey et al. 1999; David et al. 2000). Narrowing of feeding channel, combined to constrictions at anterior and posterior mesenteric regions were found on larvae treated with PS in sucrose at 5.4 mg.L⁻¹, exposed to direct sunlight for 3h. These injuries could be interpreted as a defense mechanism, preventing the xenobiotic spread all over the digestive tract (Barreto et al. 2006), possibly fully devastating it. Other important alteration observed was the thickening of peritrophic membrane (PM) at the medium region,

corroborating Arruda et al. (2003a) findings. The main role exerted by PM is epithelium protection from pathogens physical damages. This swelling would probably avoid a close contact of the PS with mesenteric cells. Injuries arisen from PS in sucrose were more punctual, (anterior and posterior regions).

Under the PS in D-mannitol exposure, at the same conditions above mentioned, serious and deleterious damages were observed in larvae mesenteric. In this treatment, the PS were not confined to few mesenteric regions, but was able to cause alterations and cell disorganization in all of the feeding channels areas, which exhibited a complete loss of the simple column epithelium. Large folds formation in cuticle was evinced, agreeing to those seen by Barreto (2006). *Culex pipiens* larvae exposed to *Carum copticum* methanolic extract exhibited destruction of midgut epithelial cells, vesicles of various sizes, destruction of microvilli and swollen cells (Al-Mekhlafi 2018). Larvae mobility is achieved by shortening and stretching of the body, which could be interpreted as a strategy to expel the toxic agent from its digestive tract. This behavior was already reported by Fujiwara et al (2017), who observed that larvae completely expelled the intestine content coated by PM.

PS in D-mannitol was more toxic than PS in sucrose under direct sunlight, evinced by feeding channel complete destruction, besides the pivotal PM disintegration. The formulation of PS in D-mannitol is a potent photolarvicide, and its main action is exerted all over the mesenteric, assuring a rapid elimination of *Ae. aegypti* larvae.

Considering the evaluations on non-target organisms, coupled with larvae biochemical and morphological responses, curcumin as a PS in D-mannitol is a novel and convenient approach against the diseases spread by *Ae. aegypti*. Besides being highly effective in killing the larvae, PS in D-mannitol is environmental friendly, surpassing crucial concerns such as ecological imbalances provided by extremely toxic larvicides and the development of resistance in target organisms.

Acknowledgements: The authors would like to thank Prof. Valtencir Zucolotto for the facilities used at GNano Lab and Merieux team for making available the Rockefeller strain used in this study. This research was funded by CAPES/MEC-, CNPq/MCTI e Decit/SCTIE/MoH (Grant No.: 44058520163), São Paulo Research Foundation – FAPESP- VSB (Grants Nos.:2009/54035-4 (Confocal Microscope), 2013/07276-1 (Optics and Photonics Research Center – CePOF-VSB, 2018/00106-7 - KTO), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES (Grant No. 1538187) – LMS and INCT Basic Optics and Applied to Life Sciences (Grant No. 465360/2014-9).

The authors declare no conflict of interest.

5 REFERENCES

- Abe FR, Coleone AC, Machado AA, Machado-Neto JG. Ecotoxicity and environmental risk assessment of larvicides used in the control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *J Toxicol Environ Health A* 77, p. 37-45, 2014.
- Abe FR, Machado AA, Coleone AC, Cruz C, Machado-Neto JG. Toxicity of diflubenzuron and temephos on freshwater fishes: ecotoxicological assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques* *Water Air Soil Pollut* 230:77 <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4128-7>, 2019.
- Ak T, Gülçin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem-Biol Interac* 174(1), p. 27-37, 2008.
- Akinyemi AJ, Oboh G, Ogunsuyi O, Abolaj AO, Udofia A. Curcumin-supplemented diets improve antioxidant enzymes and alter acetylcholinesterase genes expression level in *Drosophila melanogaster* model. *Met Brain Dis* 33(2), p. 369-375, 2018.
- Al-Mekhlafi FA. Larvicidal, ovicidal activities and histopathological alterations induced by *Carum copticum* (Apiacea) extract against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Saudi J Biol Sci* 25(1), p. 52-56, 2018.
- Ali A, Wang Y, Khan IA. Larvicidal and biting deterrent activity of essential oils of *Curcuma longa*, *Artemisone* and curcuminoids against *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* (Culicidae: Diptera). *J Medical Entomol*, 52(5), p. 979-986, 2015.
- Allen Y, Calow P, Baird DJ, 1995. A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 14(9), 1625-1630.
- Antwi FB, Reddy GVP. Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. *Environ Toxicol Pharmacol* 40(3), p. 915-923, 2015.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL, 2000. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10 p.1351-1358, [10.1101/gr.144700](https://doi.org/10.1101/gr.144700).
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* 140(2), 175-186, 2005.
- Ruiz ML, Segura C, Trujillo J, Orduz S. In vivo binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 73-79, 2004.
- C.F. Barreto, G.M. Cavasin, H.H.G. Silva, I.G. Silva. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Rev. Patol. Trop.*, 35 (2006), pp. 37-57
- Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 17-25, 2003.
- G.M. Fujiwara, V. Annies, C.F. Oliveira, R.A. Lara, M.M. Gabriel, F.C.M. Betim, J.M. Nadal, P.V. Farago, J.F.G. Dias, O.G. Miguel, M.D. Miguel, F.A. Marques, S.M.W. Zanin. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 139 (2017), pp. 238-244.
- Cheng D, Li W, Wang L, Lin T, Poiani G, Wassef A, Hudlikar R, Ondar P, Brunetti L, Kong A. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and PKPD modeling of curcumin in regulating antioxidant and epigenetic gene expression in healthy human volunteers. *Mol Pharmaceutics* DOI: [10.1021/acs.molpharmaceut.8b01246](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01246), 2019.
- Conti B, Flamini G, Cioni PL, Ceccarini L, Leonardi MM, Benelli G. Mosquitocidal essential oils: are they safe against non-target organisms? *Parasitol Res* 113, p. 251-259, 2014.

- Couling JD, Bernot RJ, Docherty KM, Dixon JK, Maginn EJ. Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure- property relationship modeling. *Green Chem* 8, p. 82-90, 2006.
- David JP, Rey D, Pautou MP, Meyran JC. Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites. *J Invertebr Pathol* 75, p. 9-18, 2000.
- Di Giulio RT, Meyer JN. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. In: Di Giulio RT, Hinton DE, (Ed.). *The Toxicology of fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor Francis Group, 2008. p. 273-326.
- Dondji B, Duchon S, Diabate A, Herve JP, Corbel V, Hougard J, Santus R, Schrevel J. Assessment of laboratory and field assays of sunlight-induced killing of mosquito larvae by photosensitizers. *J Med Entomol* 42(4), p. 652-656, 2005.
- Duguma D, Ortiz SL, Lin Y, Wilson PC, Walton WE. Effects of a larval mosquito biopesticide and *Culex* larvae on a freshwater nanophytoplankton (*Selenastrum capricornatum*) under anoxic conditions. *J Vector Ecol* 42(1), p. 51-59, 2017.
- Fabris C, Soncin M, Jori G, Habluetzel A, Lucantoni L, Sawadogo S, Guidolin L, Coppellotti O. Effects of a new photoactivatable cationic porphyrin on ciliated protozoa and branchiopod crustaceans, potential components of freshwater ecosystems polluted by pathogenic agents and their vectors. *Photochem Photobiol Sci* 11, 294-301, 2012.
- Ernst W, Jackman P, Doe K, Page F, Julien G, MacKay K, Sutherland T. Dispersion and Toxicity to Non-target Aquatic Organisms of Pesticides Used to Treat Sea Lice on Salmon in Net Pen Enclosures. *Marin Poll Bull* 42(6), p. 432-443, 2001.
- Geis SW, Fleming KL, Korthal ET, Searle G, Reynolds L, Karner DA. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ Toxicol Chem* 19(1), p. 36-41, 2000.
- Govidarajan M, Benelli G. Eco-friendly larvicides from Indian plants: Effectiveness of lavenderyl acetate and bicyclogermacrene on malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Ecotox Environ Saf* 133, p. 395-402, 2016.
- Haap T, Triebkorn R, Köhler HR. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp-70 induction. *Chemosphere*. 73(3):353-359, 2008.
- Huang YY et al. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response* 7(4), p. 358-383, 2009.
- Kelly SA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. Health Persp.* 106 (7), p. 375-385, 1998.
- Koskella J, Stotzky G. Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *morrisoni* (strain *tenebrionis*), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi, and algae in vitro. *Can J Microbiol* 48: 262–267, 2002.
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* 149(2), p. 196-209, 2009.
- Le Goff G, Hilliou BD, Siegfried BD, Boundy S, Wajnberg E, Sofer L, Audant P, Ffrench-Constant RH, Feyereisen R. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem Mol Biol* 36, p. 674-682, 2006.
- Lekamge S, Miranda AF, Ball AS, Shukla R, Nugegoda D. The toxicity of coated silver nanoparticles to *Daphnia carinata* and trophic transfer from alga *Raphidocelis subcapitata*. *PLoS ONE* 14(4), e0214398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214398>, 2019.
- Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101, p. 13-30, 2011.
- Maharajan K, Muthulakshmi S, Nataraj B, Ramesh M, Kadirvelu K. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. *Aquatic Toxicol* 196, p. 132-145, 2018.

- Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: A short review, *Life Sci* 78, p. 2081-2087, 2006.
- Michaelakis, A., Papachristos, D., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Giatropoulos, A., Polissiou, M.G., 2009. Citrus essential oils and four enantiomeric p-terpenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 105, 769–773.
- Morrison AC, Zielinski-Gutierrez E, Scott TW, Rosenberg R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Med* 5(3): e68. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050068>, 2008.
- Mukherjee SN, Rawal SK, Ghumare SS, Sharma RN. Hormetic concentrations of azadirachtin and isoesterase profiles in *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Experientia* 49(6-7), p. 557-560, 1993.
- OECD 202. GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test; Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD): Paris, Adopted 13 April 2004.
- Paiva MHS, Lovin DD, Mori A, Melo-Santos MAV, Severson DW, Ayres CFJ. Identification of a major quantitative trait locus determining resistance to the organophosphate temephos in the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. *Genomics* 107(1), p. 40-48, 2016.
- Pavela R. Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *J Asia-Pacific Entomol* 17(3), p. 287-293, 2014.
- Pavela R, Kaffkova K, Kumsta M, 2014. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from different *Mentha* L. and *Pulegium* species against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Plant Prot. Sci.* 50, 36–42.
- Pavela R, Govindarajan M. The essential oil from *Zanthoxylum monophyllum* a potential mosquito larvicide with low toxicity to the non-target fish *Gambusia affinis*. *J Pest Sci* 90(1) p. 369-378, 2017.
- Pereira JL, Antunes SC, Castro BB, Marques CR, Gonçalves AMM, Gonçalves F, Pereira R. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicol* 18(4), p. 455-463, 2009.
- Pfleeger T, McFarlane JC, Sherman R, Volk G. A short-term bioassay for whole plant toxicity. In Gorsuch JW, Lower WR, Wang W, Lewis MA eds. *Plants for toxicity assessment v.2*. STP 1115. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, p. 355-364, 1991.
- Pisa LW, Amaral-Rogers W, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Poll Res* 22(1), p. 68-102, 2015.
- Promsiri S, Naksathit A, Kruatrachue M, Thavara U. Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non target fish. *Insec Sci* 13(3), p. 179-188, 2006
- Rey D, Cuany A, Pautou M, Meyran J. Differential sensitivity of mosquito taxa to vegetable tannins. *J Chem Ecol* 25, p. 537-548, 1999.
- Riaz MA, Poupardin R, Reynayd S, Strode C, Ranson H, David JP. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquat Toxicol* 93(1), p. 61-69, 2009.
- Sagnou M, Mitsopoulou KP, Koliopoulos G, Pelecanou M, Couladouros EA, Michaelakis A. Evaluation of naturally occurring curcuminoids and related compounds against mosquito larvae. *Acta Tropica* 123, p. 190-195, 2012.
- Santos VSV, Caixeta ES, Junior EOC, Pereira BB. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: redefining the use of pyriproxyfen. *J. Toxicol Environ Health A*, 80 (3), p. 155-170, 2017.
- Shaan E, Canyon DV, Faried MW, Abdel-Wahab H, Mansour A. Efficacy of a highly active phytochemical (*Callitris glaucophylla*) against mosquito vectors of dengue and Japanese encephalitis. The annual Queensland health and scientific meeting “Making it better. Encouraging health research and innovation” 25-26 November, Brisbane, 2003.

- Shalan EA, Canyon D, Younes MWF, Abdel-Wahab H, Mansour A. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Internat* 31, p. 1149-1166, 2005.
- Shanmugam MK, Arfuso F, Sng JC, Bishayee A, Kumar AP, Sethi G. Chapter 5 - Epigenetic effects of curcumin in cancer prevention. *Epigenetics in Cancer Prevention* 8, p. 107-128, 2019.
- Singh NS, Sharma R, Parween T, Patanjali PK. Pesticide contamination and human health risk factor. In: Oves M, Zain KM, Ismail MI (eds) *Modern Age Environmental Problems and their remediation*. Springer, Cham, 2018.
- Sivagnaname N, Kalyanasundaram M. Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(1), p. 115-118, 2004.
- Souza LM, Inada NM, Venturini FP, Carmona-Vargas CC, Pratavieira S, Oliveira KT, Kurachi C, Bagnato VS. Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae. *J. Asia-Pacific Entomol*, 22(1), p. 151-158, 2019.
- Takahashi IT, Cowgill UM, Murphy PG. Comparison of ethanol toxicity to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* tested at two different temperatures: static acute toxicity test results. *Bull Environ Contam Toxicol* 39, p. 229-236, 1987.
- Truong L, Gonnerman G, Simonich MT, Tanguay RL. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environ Poll* 218, p. 1089-1093, 2016.
- Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS ONE* 10(3): e0121313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121313>, 2015.
- Zhang L, Gible R, Baer KN. The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna* *Ecotox Environ Saf* 55(3), 330-337, 2003.

3.3 ARTIGO 3: Validação da atividade fotodinâmica da curcumina (*Curcuma longa L*) em populações de campo do *Aedes aegypti*, uma análise preliminar

Validação da atividade fotodinâmica da curcumina (*Curcuma longa* L) em populações de campo do *Aedes aegypti*, uma análise preliminar

RESUMO

A Curcumina (CUR), um curcuminóide encontrado nos rizomas de *Curcuma longa* L, possui propriedades bactericida, fungicida e larvicida. Este estudo teve como principal objetivo avaliar o seu potencial foto-larvicida sobre populações de campo do *Aedes aegypti*, localizados na cidade de São Carlos, SP- Brasil. A CUR foi obtida a partir de síntese química e adicionada ao D-manitol para o melhoramento das suas características hidrofóbicas e aumento da palatabilidade da formulação. Os bioensaios em campo simulado foram realizados em tanques de polietileno com capacidade de 100 L e preenchidos com 60 L de água da torneira. As tampas dos tanques foram adaptadas com seis garrafas PET (polietileno tereftalato), previamente jateadas, para que houvesse melhor penetrabilidade da luz no interior dos tanques. Cinquenta larvas (cepa Rockefeller) foram adicionadas nos tanques e submetidas à concentrações de 0,04, 0,18 e 1,22 mg. L⁻¹ de curcumina em D-manitol (DMC). Observações pós-tratamento foram realizadas em 24 e 48 horas, onde avaliou-se a mortalidade larval (em porcentagem). O DMC, na concentração de 12,2 mg.L⁻¹ foi avaliado também em larvas de campo do *Ae. aegypti* encontradas em criadouros móveis na cidade de São Carlos, SP- Brasil. A concentração utilizada foi dez vezes maior que concentração com melhor atividade encontrada em condições de campo simulado. A partir disto, seis criadouros positivos para *Ae. aegypti* foram selecionados aleatoriamente e tratados com DMC. A avaliação da fotoatividade foi realizada em 24 e 48 horas e parâmetros, como densidade larval, pH, temperatura e iluminância foram registrados concomitantemente ao período de avaliação. Uma investigação da carga microbiológica foi realizada nos seis criadouros antes e após a aplicação de DMC. Os ensaios em condições de campo-simulado mostraram que o DMC à 1,22 mg.L⁻¹ teve forte ação larvicida sobre o *Ae. aegypti*, provocando mortalidade larval acima de 90% após 48 horas. A fotoatividade do DMC foi confirmada em populações de campo do *Ae. aegypti*, reduzindo a população em 97% a 12,2 mg.L⁻¹. Um aumento na carga microbiológica da água dos criadouros foi percebido com o uso do D-manitol, principalmente nos recipientes com maior quantidade de matéria orgânica. Os resultados deste trabalho mostram claramente o potencial da CUR para o controle de epidemias provocadas pelo *Ae.*

aegypti, servindo como uma estratégia eficaz, economicamente viável e sem prejuízo às espécies não-alvo.

1 INTRODUÇÃO

Arboviroses são doenças transmitidas por arbovírus, incluindo o vírus da dengue (DEN), Chikungunya (CHIK) e Zika (ZIK), cujo principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*. Atualmente são conhecidas mais de 540 espécies de arbovírus, dos quais cerca de 150 são causadoras de doenças em humanos. Os arbovírus possuem essa designação pois, parte do seu ciclo de replicação ocorre em artrópodes, como insetos e aracnídeos (1). Hoje, acredita-se que mais de 700 milhões de pessoas no mundo são expostas à arbovírus anualmente. O Brasil, é considerado um dos países com maior incidência de DEN e registrou a pior epidemia da história em 2015, com mais de 1,5 milhões de casos notificados e 828 óbitos (2). Outras arboviroses, como a ZIK e CHIK, estão em ascensão no país e desde 2018 já foram notificados mais de 4 mil casos de ZIK e 40 mil casos de CHIK (3). Dentre estas arboviroses, a ZIK é a que mais têm preocupado os órgãos públicos de saúde, uma vez que foi comprovada a sua relação com o aumento de casos de recém-nascidos com microcefalia e de distúrbios neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barré (4).

O cosmopolita *Ae. aegypti*, se tornou um dos mais graves problemas de saúde pública da atualidade, uma vez que seu controle está ameaçado por populações resistentes à inseticidas químicos, como os piretróides e organofosforados (5). O intenso crescimento demográfico associado à desordenada urbanização, favoreceu a ocorrência de sucessivas epidemias de DEN em países tropicais e subtropicais. A falta da participação proativa das comunidades frente à eliminação mecânica dos criadouros de larvas também contribui para a proliferação do mosquito. Sabe-se que os habitats desses vetores são preferencialmente intradomiciliares e peridomiciliares e as fêmeas depositam seus ovos em recipientes artificiais, como pneus, tanques, caixas d'água, cisternas e materiais descartáveis passíveis de acumular água. Mesmo com os programas de controle de consciencialização ao esvaziamento e eliminação desses recipientes, a população continua dependente das ações governamentais para a realização de serviços, que são na verdade de sua própria responsabilidade. O aumento dos índices larvais também está diretamente relacionado à sistemas precários de saneamento básico, coleta de lixo e abastecimento de água (6).

Hoje, muitos estudos resumem-se na integração de métodos para propor uma redução desses criadouros, envolvendo não apenas educação verbal à população, mas também operações comportamentais *in situ*, discutindo questões fundamentais de como as pessoas podem adquirir comportamento responsável em relação à manutenção desses criadouros (7). Outros estudos envolvem também métodos alternativos para a eliminação de larvas, como o

uso de produtos naturais derivados de plantas ou o controle biológico por peixes larvófagos e copépodes (8). A relação deste último é bastante questionável, devido ao longo período de aclimatação desses organismos nos reservatórios de água. Mosquitos infectados com *Wolbachia* (uma espécie de bactéria simbiote intracelular), também se tornou uma estratégia promissora para o controle de epidemias; além de reduzir o tempo de vida do mosquito pela metade, apresenta forte bloqueio da transmissão de arbovírus, incluindo dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKAV) (9,10).

O uso de moléculas fotossensíveis (ou foto-inseticidas) oferece uma abordagem segura e sustentável para a eliminação de um amplo espectro de insetos vetores. Até o momento, há registros da eficácia dessas substâncias em espécies de grande importância epidemiológica, tais como o *Aedes aegypti* (11), *Aedes caspius*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles spp* (principal vetor da malária) (12,13,14), *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* (principal vetor da filariose), entre outros (15,16). Essas moléculas atuam através de um processo nomeado “inativação fotodinâmica” (IFD) e, quando são ativadas por uma fonte de luz visível e de comprimento de onda específico, absorvem e transferem energia ao oxigênio molecular livre (O_2), levando à formação de espécies altamente reativas de oxigênio (ROS) (oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres, como superóxido [O_2^-] e radical hidroxila (OH). Esses compostos, apresentam propriedades reativas e provocam danos irreversíveis às células e tecidos, tendo como principais sítios-alvo: proteínas, ácidos nucleicos, lipídios insaturados, membranas, entre outros (17,18).

Recentemente, substâncias com propriedades fotossensibilizadoras voltaram a ser exploradas para o desenvolvimento de uma nova classe de inseticidas, como por exemplo a clorina-e6, uma forma derivada da clorofila *a*. Essas moléculas foram combinadas com nanopartículas magnéticas e avaliadas em larvas de *Ae. aegypti*, mostrando 100% de mortalidade após 3 horas (50 mg.L^{-1}) de exposição à lâmpadas de halogêneo. Os fotossensibilizadores (FS) mais utilizados nesta abordagem incluem compostos aromáticos e heterocíclicos, tais como pirenos, xantenos, fenotiazinas, porfirinas e clorinas (19). No entanto, algumas dessas moléculas ainda apresentam procedimentos de síntese química muito complexos e economicamente inviáveis, dificultando a produção em larga escala.

A curcumina (CUR), um candidato à agente foto-inseticida, é encontrada em abundância juntamente a outros curcuminóides, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, nos rizomas da herbácea *Curcuma longa L.* A CUR é um dos compostos majoritários pertencente à classe diferoluilmetano ($C_{21}H_{20}O_6$) e amplamente

conhecida por suas propriedades anti-carcinogênicas, antioxidantes, antiinflamatórias e antimicrobianas (20). Observações experimentais mostraram que a CUR pode atuar como um FS eficiente, absorvendo luz na região azul do espectro visível (~420 nm) (21). Desde então, o seu uso foi disseminado na IFD mostrando-se uma alternativa eficaz para o controle de microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (microrganismos resistentes à metilicina) (22,23). Apesar de ser considerada uma substância não-tóxica para humanos, podendo ser consumida em altas concentrações como aditivo alimentar (12g/ dia), sua utilização clínica ainda é limitada devido à sua baixa biodisponibilidade. Suas características hidrofóbicas fazem com que ela seja pouco absorvida, além de sofrer metabolismo hepático de primeira passagem, ou seja, sua concentração é significativamente reduzida antes mesmo de atingir o sistema circulatório, anulando ou minimizando o seu efeito (24).

Por outro lado, estudos recentes mostraram o grande potencial da CUR associada à IFD sobre larvas do *Ae. aegypti*, como uma abordagem inovadora e segura para o controle de doenças transmitidas por vetores. Desta forma, a substância foi formulada com açúcares para o melhoramento da sua palatabilidade e solubilidade em água, com o objetivo de excluir o uso de solventes orgânicos altamente prejudiciais à organismos não-alvos. A CUR mostrou alta eficácia em larvas de terceiro estágio, com valor de $LC_{50-30min}$ de 2,2 mg.L⁻¹; valor substancialmente menor que o encontrado por outras substâncias de origem botânica sem propriedade fotodinâmica (25). A CUR apresenta-se como uma excelente alternativa para lidar com as inúmeras desvantagens e problemas relacionados aos inseticidas convencionais; uma vez que agem rapidamente nas larvas e, são da mesma forma eliminadas do ambiente pela ação da luz solar. Além disso, essa molécula não apresenta toxicidade para organismos aquáticos, como peixes e cladóceros (Venturini *et al* 2019, em fase de submissão).

Embora as propriedades foto-larvicidas da CUR já tenham sido exploradas em condições de laboratório e campo simulado em *Ae. aegypti* (cepas Rockefeller), surge a necessidade da validação em populações de campo a fim de avaliar a eficácia de novas formulações, a viabilidade econômica e a facilidade da sua aplicação. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar de forma inédita a ação dessas moléculas em condições de campo sobre populações do *Ae. aegypti* encontradas na cidade de São Carlos, SP- Brasil. Adicionalmente, estudos da qualidade microbiológica da água dos criadouros tratados com CUR foram conduzidos a fim de avaliar o impacto dessa molécula no micro-ambiente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Manutenção das larvas*

O estabelecimento da colônia do *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) foi possível devido a doações periódicas de ovos pela empresa Mérieux NutriSciences Company localizada em Charqueada, São Paulo, Brasil. Estas colônias foram mantidas no Laboratório de Biofotônica da Universidade de São Paulo em sala climatizada a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h/12h luz:escuro. As larvas foram obtidas a partir da eclosão dos ovos submersos em água declorada, aclimatada em bandeja plástica branca de 1 L por 24 horas. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas uma vez ao dia com uma mistura de ração para peixes e levedura seca na proporção de 3: 1 (Alcon, Camboriú-SC, Brasil).

2.2 *Preparação da curcumina*

A curcumina ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$) (CUR) utilizada neste estudo foi sintetizada pelo Laboratório de Química Bio-orgânica da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos- SP, Brasil) de acordo com o processo de produção descrito por Carmona-Vargas (2017), consistindo de alta pureza ($\geq 98\%$) (26). Nos ensaios biológicos em larvas do *Ae. aegypti*, a CUR foi conjugada ao D-Manitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) para o melhoramento das características de solubilidade e palatabilidade, sendo denominada agora como DMC. A CUR a 1% foi misturada de forma física ao D-manitol (99%) com o auxílio de almofariz de pilão e, posteriormente, solubilizada diretamente em água destilada, obtendo-se uma solução estoque à 1,5 mg/mL. Para a homogeneização da solução estoque, a mesma foi levada a banho ultrassônico, por 5 minutos à 27°C . Uma vez concluído o preparo da solução, curvas de calibração foram elaboradas através de espectrofotômetro Cary 50 UV-VIS (Varian, Australia), estabelecendo uma relação entre a absorbância da solução de CUR (absorbância máxima em $\lambda=420\text{ nm}$) e suas respectivas concentrações. Os espectros de absorção da curcumina foram caracterizados numa faixa de 300-700 nm, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

2.3 *Ensaio de campo em pequena escala*

2.3.1 *Campo simulado*

A atividade foto-larvívica do DMC foi avaliada em tanques circulares de polietileno (0,51 x 0,54 m) com capacidade volumétrica de 100 L. Para otimizar a penetração da luz solar no interior dos tanques, seis garrafas de polietileno tereftalato (PET) foram previamente jateadas e adaptadas em seis tanques, como apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Tanques de polietileno utilizados nos ensaios de campo-simulado para avaliar o desempenho do DMC em três concentrações: 0,04, 0,18 e 1,22 mg.L⁻¹. A) 50 larvas de terceiro estágio foram adicionadas aos tanques B) Detalhes da adaptação de garrafas PET no interior dos tanques possibilitando a entrada de luz e C) Detalhe da parte externa dos tanques expostos à luz solar.



Todos os tanques foram preenchidos com 60 L de água proveniente da rede de abastecimento local e 50 larvas de terceiro estágio (cepa Rockfeller) foram adicionadas a cada um. Para a avaliação da eficácia do DMC foram utilizadas três concentrações (0,04, 0,18 e 1,22 mg.L⁻¹) baseadas nos valores de LC_{50-24h} encontrados por de Souza *et al* 2019 (em fase de publicação). Observações pós-tratamento foram realizadas em 24 e 48 horas, onde avaliou-se a mortalidade larval e, as larvas que não responderam ao estímulo por agulha histológica foram consideradas mortas. Cada teste foi realizado em triplicata em três dias independentes, e nove tanques de água foram usados como controle: três tanques com água livre de cloro, três tanques com D-manitol a 1,22 mg.L⁻¹ (denominado DM) e três tanques no escuro com curcumina em D-manitol à 1,22 mg.L⁻¹. A irradiância solar foi acessada dentro dos tanques (5

pontos em cada região: fundo, média e superfície) por espectrorradiômetro (Ocean Optics USB 2000 UV-VIS, Ocean Optics, EUA) e as leituras de temperatura, foram realizadas até 48 horas.

2.3.2 Ensaio em populações de campo do *Aedes aegypti*

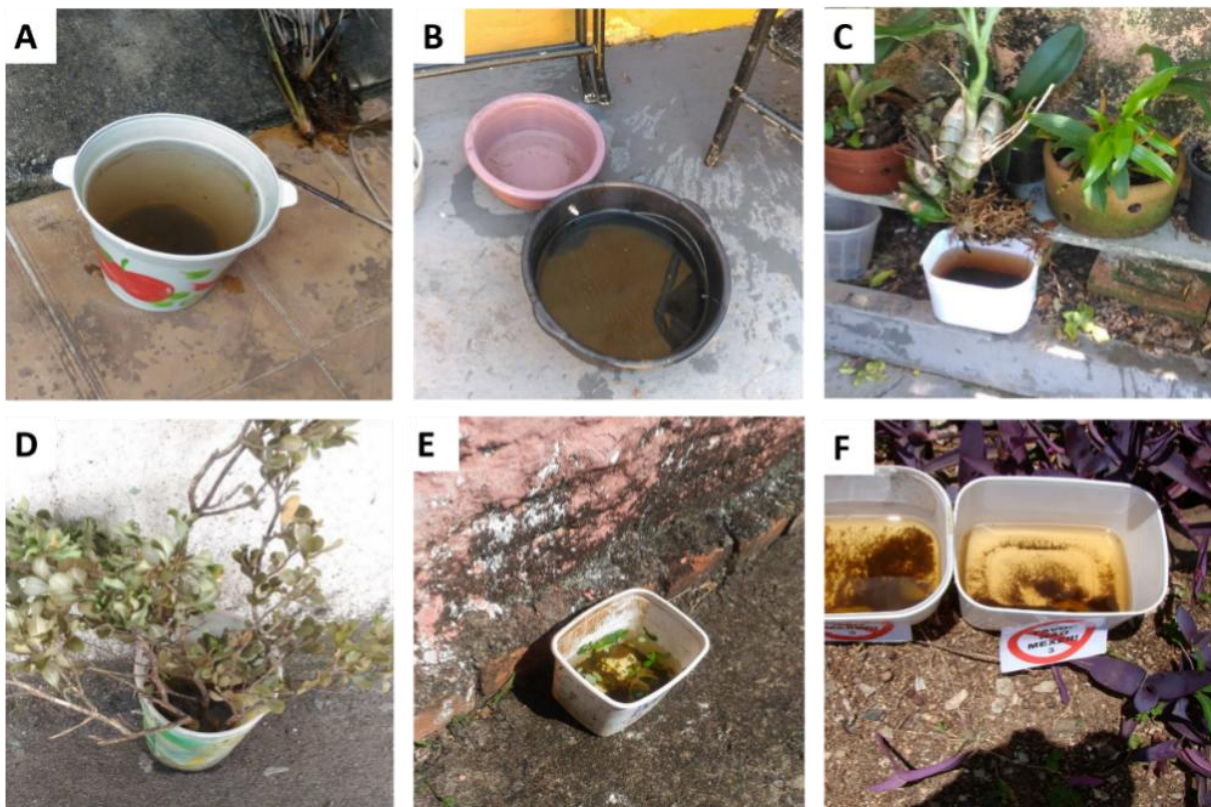
2.3.2.1 Escolha da área para a coleta de recipientes positivos para *Ae. aegypti*

Os ensaios em situação de campo foram conduzidos na cidade de São Carlos- SP, Brasil, com a participação da Vigilância Epidemiológica de São Carlos (Vigep). São Carlos possui uma população recenseada de 249 415 pessoas, distribuída numa área de 1143,9 km², com aproximadamente 270 bairros (27). O Clima é caracterizado como tropical, apresentando chuva no verão e temperaturas entre 17 e 28 °C de Dezembro a Março. O inverno é caracterizado por clima seco com temperaturas variando entre 12 e 28°C de Junho a Setembro (28). A coleta dos recipientes foi realizada em dois bairros: Vila São José e Cidade Aracy, que foram selecionados de acordo com os altos índices de infestação por *Ae. aegypti* registrados nos anos anteriores. As coletas dos recipientes foram realizadas entre os meses de Dezembro e Janeiro.

2.3.2.2 Tratamento dos criadouros

A concentração de DMC avaliada nos criadouros foi de 12,2 mg.L⁻¹, dez vezes a maior concentração testada nos ensaios de campo simulado (seção 2.3.1). Seis criadouros móveis (Figura 2) com capacidade de até 1 L foram selecionados aleatoriamente, três em cada área e, transportados até o laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos.

Figura 2 – Recipientes ou criadouros móveis positivos para *Aedes aegypti* coletados na cidade de São Carlos- SP, Brasil, para a avaliação da eficácia em campo de DMC. A) Balde branco (1), B) Bandeja plástica preta (2), C) Pote de sorvete (3), D) Copo plástico (4), E) Pote de margarina (5) e F) Pote de sorvete (6).



Todos os recipientes foram registrados e fotografados de acordo com os parâmetros de iluminação encontrados no dia da coleta: exposição direta e indireta (sombreado) à luz. No laboratório, a densidade larval pré-tratamento, o volume de água e a presença de matéria orgânica foram verificados antes da aplicação de DMC. Para cada criadouro coletado, houve a divisão de larvas, volume de água e matéria orgânica, estabelecendo-se réplicas para a obtenção dos “criadouros-controle”. Os criadouros originais foram nomeados “criadouros-tratado”.

Após a caracterização dos criadouros, estes foram levados para a área externa do Instituto de Física (com exceção de um recipiente, que foi encontrado no interior de uma residência) e colocados de acordo com os registros fotográficos de campo para a aplicação e

avaliação pós tratamento com DMC. Desta forma, o DMC foi aplicado e homogeneizado em cada situação com o auxílio de pipeta Pasteur de 2 mL e as leituras de densidade larval, pH, temperatura e oxigênio dissolvido na água foram realizadas em 0, 24 e 48 horas. Ao final do tratamento as larvas foram amostradas e armazenadas em álcool 70% para a identificação da composição larval encontradas em cada criadouro. A eficácia do DMC foi avaliada em 48 horas pela porcentagem de redução larval através da fórmula (29):

$$\text{Redução (\%)} = \left(\frac{C - T}{C} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: C= número total de larvas do controle, T= número total de larvas encontradas no tratamento.

2.4 *Análise da qualidade microbiológica dos recipientes tratados com DMC*

A proliferação de microrganismos de todos os recipientes coletados em campo foi avaliada através da análise da presença de colônias microbianas pré (t=0 horas) e pós-tratamento (t=48 horas) com DMC. Aliquotas de água (100 µL) foram retiradas de cada recipiente e transferidas para microtubos de plásticos para centrifugação (do tipo Eppendorf (R)) contendo tampão fosfato salino, PBS (900 µL). As amostras foram separadas em três grupos experimentais para cada condição após serem coletadas: C1-0 horas (água coletada do criadouro-controle 1 em t=0 horas) (balde branco), C1-48 horas (água coletada do criadouro-controle 1 em t=48 horas) e T1-48 horas (água coletada do criadouro-tratado 1 em t=48 horas); o mesmo aplicado para C2 (bandeja plástica preta), C3 (pote de sorvete), C4 (Copo plástico), C5 (pote de margarina) e C6 (pote de sorvete). As diluições foram realizadas em microtubos contendo PBS e foram plaqueadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI). As placas de Petri foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram contadas por meio da observação macroscópica. Os resultados obtidos foram expressos em log de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5 *Análise estatística*

Os dados de mortalidade larval nos ensaios de campo simulado e os dados microbiológicos foram analisados por ANOVA (one-way) e a comparação entre as médias dos grupos controle e tratados foram obtidas através do teste Tukey ao nível de 5% de significância (p<0,05), utilizando o software OriginPro v.8 (OriginLab Corp.). Dados de

mortalidade larval foram corrigidos pela fórmula de Abbott (30) nos ensaios de campo simulado.

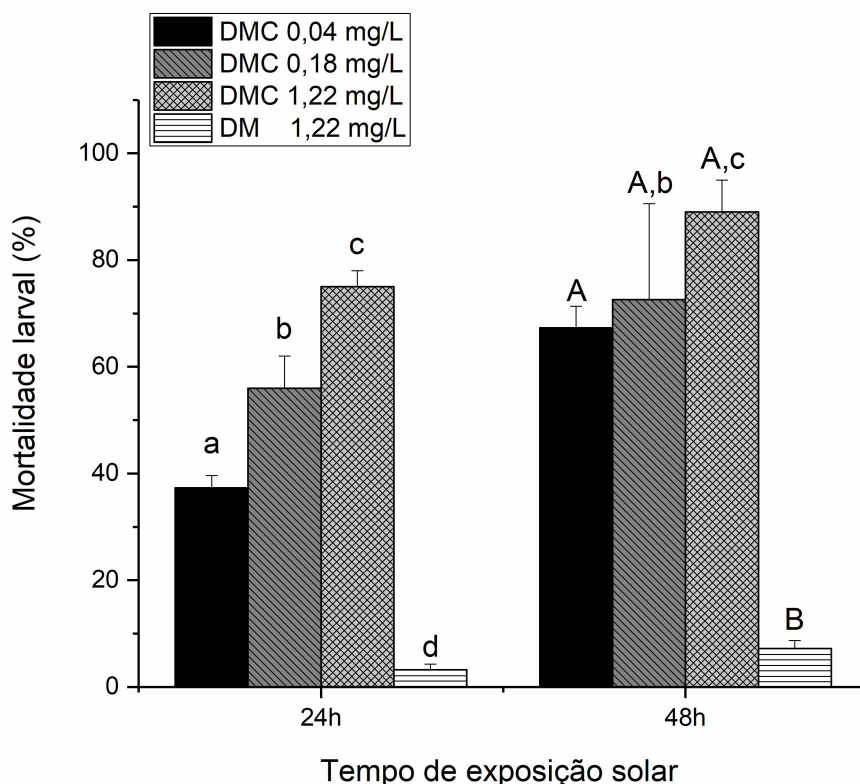
3 RESULTADOS

3.1 Ensaios de campo em pequena escala

3.1.1 Campo simulado

Os resultados mostraram que o DMC foi eficaz contra larvas de terceiro estágio do *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller). Em 24 horas, a mortalidade larval aumentou significativamente em função do aumento da concentração, sendo que, em 1,22 mg.L⁻¹ a mortalidade foi de 75% (Figura 3).

Figura 3 – Foto-toxicidade de DMC (curcumina conjugada a D-manitol) nas concentrações de 0,04, 0,18 e 1,22 mg.L⁻¹ sobre larvas de terceiro estágio do *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller) em ensaios de campo simulado. A eficácia de DMC e DM (controle D-manitol a 1,22 mg.L⁻¹) foi avaliada em 24 e 48 horas. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.



Em 48 horas, observou-se uma mortalidade de 89%, no entanto, não houve diferença significativa em comparação a 24 horas ($p > 0.05$). Apenas em $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ houve um aumento significativo (de 30%) em 48 horas, atingindo 67% de mortalidade larval. Todas as concentrações foram diferentes estatisticamente do controle de D-manitol à $1,22 \text{ mg.L}^{-1}$ ($p < 0.05$). Comparando os pontos de iluminação no interior dos tanques (através do mapa de irradiância solar), observou-se uma distribuição de luz solar uniforme, com irradiância variando entre $0,3\text{-}0,8 \text{ mW/cm}^2$. A temperatura manteve-se estável, apresentando valor médio de $25^\circ \pm 1^\circ \text{C}$.

3.2 Ensaios em populações de campo do *Aedes aegypti*

A Tabela 1 apresenta a caracterização dos 6 criadouros móveis coletados aleatoriamente na cidade de São Carlos-SP, Brasil, incluindo os bairros Vila São José e Cidade Aracy. Parâmetros como o tipo de recipiente, densidade larval pré-tratamento, presença de matéria orgânica, o maior valor de iluminância e o volume de água (em mL) foram registrados. Vale ressaltar que o criadouro 4, foi mantido no interior do laboratório, atendendo aos mesmos critérios em que foi encontrado.

Tabela 1 – Tipos de recipientes tratados com DMC ($12,2 \text{ mg.L}^{-1}$) localizados nos bairros Vila São José e Cidade Aracy da Cidade de São Carlos-SP, Brasil e parâmetros como densidade larval, matéria orgânica presente/ausente, iluminância máxima (lx) e volume de água encontrado em cada criadouro.

Tipos de criadouros móveis				
	Densidade larval	Matéria Orgânica (ausência/ presença)	Iluminância máxima (lx)	Volume (mL)
Balde plástico branco (1)	100 <i>(Ae. aegypti e Culex spp)</i>	p	85.000	500
Bacia plástica preta (2)	100 <i>(Ae. aegypti)</i>	a	85.000	500
Pote plástico de sorvete (3)	25 <i>(Ae. aegypti e Culex spp)</i>	p	10.700	500
Copo plástico (4)	30 <i>(Ae. aegypti)</i>	p	270	120
Pote plástico de margarina (5)	35 <i>(Ae. aegypti)</i>	p	100.000	110
Pote plástico de sorvete (6)	30 <i>(Ae. aegypti)</i>	p	85.000	250

Um total de 320 larvas foram expostas ao DMC, incluindo 246 larvas de *Ae. aegypti* e 74 larvas de *Culex spp.* Em 48 horas de tratamento com DMC, os criadouros 1, 2, 3 e 6 apresentaram uma redução na densidade larvária maior que 80% (88, 95, 92 e 83%, respectivamente). O criadouro 5 apresentou redução de 70%. No entanto, o criadouro 4 foi o que apresentou menor redução da densidade larvária, com porcentagem de 33%.

Larvas de *Ae. aegypti* e *Culex spp.* foram encontradas coabitando os criadouros 1 e 3, enquanto os demais foram observadas apenas larvas de *Ae. aegypti*. Ao final do tratamento, o criadouro 1 apresentou 100% de redução da densidade larvária para *Culex spp.* e 66% para *Ae. aegypti*. O criadouro 3 também apresentou 100% de redução para *Culex spp.* e 77% para *Ae. aegypti*. Os criadouros-controle não apresentaram redução da densidade larval em 48 horas. A redução da densidade total das larvas dos criadouros-tratados, bem como os registros dos parâmetros (pH, temperatura, oxigênio e iluminância) são apresentados na Tabela 2.

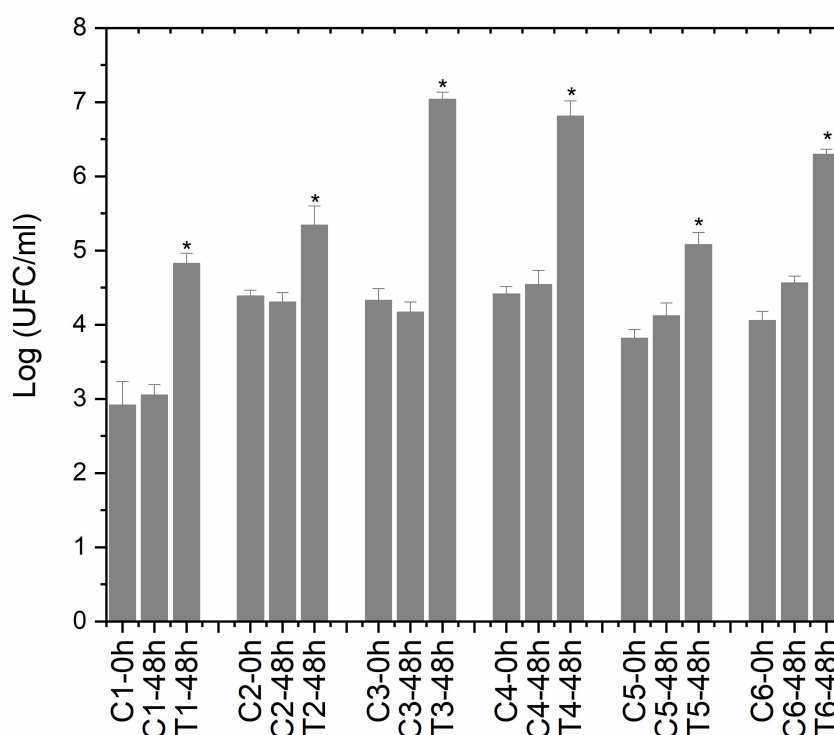
Tabela 2 – Teste de eficácia do DMC (12,2 mg.L⁻¹) em populações de campo do *Aedes aegypti*. Os criadouros tratados foram avaliados em relação a densidade larval em 24 e 48 horas.

Criadouros (no.)	Larvas		Parâmetros						
	Densidade Pré- tratamento	Densidade Pós- tratamento	pH		Temperatura (C°)		Oxigênio (mg.L ⁻¹)		
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
(1)	100	20	12	7	7	28	27,5	4	3
(2)	100	13	5	7	7	28,6	29	5	4,5
(3)	25	12	2	7	5-6	27	28	4	1,4
(4)	30	26	20	7	5-6	24	24	1,48	0,4
(5)	35	10	10	7	7	28	29	6,2	6,5
(6)	30	5	5	7	7	24	26	5,01	5,15
Total	320	86	54						
Média	53,3	14,3	9						
Redução (%)		73,1	97,1						

3.3 Análise da qualidade microbiológica dos recipientes tratados com DMC

Na Figura 4, observa-se o número de bactérias encontradas no momento da coleta dos criadouros (C1, C2, C3, C4, C5, C6-0 horas), 48 horas após a coleta (C1, C2, C3, C4, C5, C6-48 horas) e 48 horas após o tratamento (T1, T2, T3, T4, T5, T6-48 horas).

Figura 4 – Avaliação da carga microbiológica da água dos criadouros tratados com DMC (12,2 mg.L⁻¹) pré (t=0 h) e pós-tratamento (t=48 h), através da contagem de colônias microbianas presentes na água. C1..6-0h = água coletada do criadouro 1..6 em t=0h; C1..6-48h = água coletada do criadouro-controle 1..6 em t=48h e T1..6-48h = água coletada do criadouro-tratado 1..6 em t=48h. Os asteriscos indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos controle e tratado.



De acordo com o gráfico, a quantidade de bactérias encontradas na água no momento da coleta dos recipientes foi de 2,9 log UFC/mL para C1, 4,4 log UFC/mL para C2, 4,3 log UFC/mL para C3, 4,4 log UFC/mL para C4, 3,8 log UFC/mL para C5 e 4,1 log UFC/mL para C6. Um leve crescimento foi observado nas amostras não tratadas após 48 horas, sendo a quantidade de bactérias encontradas de 3,1 log UFC/mL para C1, 4,3 log UFC/mL para C2, 4,2 log UFC/mL para C3, 4,5 log UFC/mL para C4, 4,1 log UFC/mL para C5 e 4,6 log UFC/mL para C6. Já nos criadouros que foram tratados com DMC (12,2 mg.L⁻¹) foi observado um aumento significativo no crescimento microbiano em relação aos criadouros-controle (p < 0,05). Assim, após 48 horas de tratamento, a quantidade de bactérias encontradas

na água dos recipientes foi de 4,8 log UFC/mL para C1, 5,3 log UFC/mL para C2, 7,0 log UFC/mL para C3, 6,8 log UFC/mL para C4, 5,1 log UFC/mL para C5 e 6,3 log UFC/mL para C6.

4 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas mais de 400 espécies de plantas foram estudadas quanto às suas propriedades larvicidas contra vetores de grande importância epidemiológica, cujos principais representantes são os gêneros *Anopheles spp*, *Aedes spp* e *Culex spp*. Apesar dos produtos botânicos serem promissores nesta abordagem, apenas um número limitado de estudos valida a sua eficácia em situação de campo (31). O principal motivo desta limitação talvez seja a alta instabilidade de fito-químicos frente à exposição solar e outras adversidades climáticas que impedem de forma direta o desenvolvimento de inseticidas seguros e economicamente viáveis (32).

Recentemente, alguns produtos de origem vegetal com propriedades biocidas foram lançados no mercado mostrando que essas limitações podem ser contornadas com o uso de novas ferramentas tecnológicas. Um exemplo disto, é o Requiem® da Bayer AG (Germany), um inseticida à base de óleo essencial proveniente de *Chenopodium ambrosioides* e utilizado contra um amplo espectro de pragas em culturas de hortaliças (33,34,35). Outro exemplo, é o óleo de Neem (*Azadirachta indica*) (comercializado como BioNeem® pela Woodstream Corporation (USA)) com atividade larvicida e efeitos “*antifeeding*”, regulador de crescimento, inibidor de reprodução, e outros (36). Versões atuais de produtos à base de extratos ou óleos vegetais contam com o auxílio da nanotecnologia para o melhoramento da sua eficácia, via sistemas nano-carregadores e liberação controlada e de outras tecnologias, como por exemplo, a IFD, discutida aqui (37,38,39).

É bem relatado na literatura as propriedades larvicida da CUR e seus derivados em insetos vetores e outros organismos patogênicos, no entanto, estudos envolvendo-a no processo de IFD como um agente foto-larvicida são recentes (39, 40). Seu mecanismo de ação, de forma simplificada, envolve a ingestão dessas moléculas pelas larvas, que se acumulam no sistema digestório, atuando como um potente larvicida gástrico. Esta técnica envolve interações sinérgicas entre três fatores importantes para o seu sucesso: moléculas fotossensíveis, luz solar (ou quaisquer fontes artificiais) e oxigênio molecular, que promovem a destruição de sítios biológicos através da formação de espécies reativas de oxigênio (41).

Esta combinação resulta em lesões oxidativas foto-induzidas graves nas membranas citoplasmáticas (ou de organelas) e tem implicações direta na sobrevivência das células (42).

Recentemente, os efeitos foto-tóxicos da CUR incorporada em D-manitol (DMC) foram relatados por de Souza *et al* (2019) em larvas do *Ae. aegypti*. Estes ensaios foram conduzidos em pequenos reservatórios de vidro com capacidade volumétrica de 2 L, onde os valores de LC_{50-24h} foram de 0,04 mg.L⁻¹ em condições de luz solar direta e 0,11 mg.L⁻¹ em condições de luz solar indireta (regiões sombreadas). Além disso, o mecanismo de ação do DMC também foi elucidado e, as altas taxas de mortalidade exercidas sobre as larvas foi devido à alta permeabilidade desse composto na membrana peritrófica, resultando na destruição total do epitélio colunar simples (de Souza *et al* 2019, em fase de publicação).

Até onde sabemos, esta é a primeira vez que o verdadeiro potencial da CUR (DMC) é elucidado em condições de campo contra populações selvagens de *Ae. aegypti*, o que o torna o mais novo candidato a compor o escasso arsenal de larvicidas disponibilizados hoje no mercado. Ensaio de campo simulado também foram desenvolvidos com o objetivo de guiar as concentrações escolhidas para o uso nos criadouros naturais. Nos ensaios realizados neste estudo (campo simulado), o DMC provocou 67, 72 e 89% de mortalidade em 48 horas de exposição à 0,04, 0,18, 1,22 mg.L⁻¹, respectivamente. Em comparação aos larvicidas sintéticos, como os organofosforados temephos ($LC_{50-24h}=0,013$ mg.L⁻¹) e o fenthion ($LC_{50-24h}=0,027$ mg.L⁻¹) (43), o DMC mostrou atividade em concentrações mais elevadas, no entanto, apresenta a grande vantagem de ser um agente seguro para a maioria dos organismos não-alvos, incluindo o homem (44,46). Além disso, o themephos é constantemente relatado como indutor de resistência em larvas de *Ae. aegypti* (45).

A fim de comparação, o DMC teve atividade em ensaios de campo simulado análoga à de larvicidas microbianos, como as toxinas de *Lysinibacillus sphaericus* e de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (Bti). Nos ensaios realizados por Rojas-Pinzón *et al* (2018) e Melo-Santos *et al.* (2001), *L. sphaericus* causou 90% de mortalidade em larvas de *Ae. aegypti*, enquanto o Bti provocou 93% de mortalidade em 48 horas (47,48). Em relação aos extratos de plantas avaliados em condições similares, podemos dizer que o DMC teve atividade superior ao *Pinus densiflora* (Pinheiro vermelho) hidrodestilado (PD-HD), com mortalidade de 56% em 24h em uma concentração de 0,18 mg.L⁻¹. Lee *et al* 2013, encontrou um valor de LC_{50-24h} de 22 mg.L⁻¹ para PD-HD (43), o que se refere a uma concentração substancialmente maior que a encontrada para DMC. Isto ocorre, indiscutivelmente, devido às propriedades fotossensíveis da CUR, que pode ter sua atividade potencializada em até 10 vezes na luz

solar (39). Outro fator que favorece a ação do DMC é que, por se tratar de um açúcar (D-manitol), ele auxilia na fago-estimulação das larvas, o que permite maior taxa de ingestão da CUR (49). Além disso, o D-manitol auxiliou no melhoramento das propriedades hidrofóbicas da CUR, ajudando na solubilidade em água. Isto, exclui o uso de solventes orgânicos, como o DMSO (dimetilsulfóxido), principal solvente da curcumina, que mostrou ser altamente tóxico para organismos aquáticos não-alvos (*Daphnia magna* e *Danio rerio*) (Venturini, et al 2019, em fase de publicação).

Outra proposta apresentada neste estudo é a utilização de garrafas PET combinada à IFD para o tratamento de focos do *Ae. aegypti* em locais de armazenamento de água da chuva, como tambores, cisternas, caixas d'água e outros tipos de recipientes; um problema muito recorrente em municípios pertencentes ao semiárido brasileiro (50). Infelizmente, o mau uso desses reservatórios é apontado como uma das causas do aumento do número de casos de DEN e outras doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti*. Os materiais usados nos sistemas de captação de água (calhas e telhas), podem formar poças que servem de sítios à oviposição da fêmea do mosquito, cujas larvas são levadas até o interior das cisternas. A adaptação das PETs ou, “lâmpadas de Moser”, possibilitaria o tratamento via IFD, uma vez que conduziriam a luz solar até o fundo desses reservatórios para ativação do FS. Além da eliminação das larvas, a IFD também auxiliaria na redução da carga microbiológica desses reservatórios, uma vez que atua de forma eficiente contra bactérias, fungos e protozoários, melhorando substancialmente a qualidade da água (51). A combinação dessas técnicas (lâmpada de Moser e IFD), resulta numa ferramenta inovadora, economicamente viável, sustentável e ecologicamente correta para a eliminação de larvas de vetores, uma vez que promoveria a reutilização de garrafas PETs e a utilização de um dos recursos naturais mais abundantes da Terra: a luz solar.

A saída a campo para a coleta dos criadouros na cidade de São Carlos (São Carlos-SP, Brazil), também mostrou que os sistemas residenciais de armazenamento de água da chuva não se restringem aos municípios do semiárido, sendo encontrados em grande número nesta localidade. Todos os domicílios apresentaram sistemas de armazenamento com coberturas precárias ou até mesmo ausentes (Anexo C), contribuindo para a entrada e proliferação do mosquito. Em todos os tanques foram observados uma alta densidade larvária de *Ae. aegypti* e *Culex spp* que foram imediatamente interditados pelos agentes da Vigep. Estes focos de reprodução não serviram como objeto de estudo, pois apresentaram alto risco de emergência de adultos. Com isto, este trabalho se limitou aos criadouros

móveis de fácil acesso ao controle de formas pupais, contribuindo assim para a segurança dos ensaios.

Em condições de campo, o DMC (12,2 mg.L⁻¹) mostrou uma eliminação de 97% das populações larvais de *Ae. aegypti* e *Culex spp* depois de 48h de tratamento. Apenas um dos criadouros não respondeu positivamente a ação do DMC, o criadouro 4 (C4), com mortalidade de 30%. Provavelmente isso aconteceu devido à alta carga microbiana encontrada neste recipiente, esgotando a fonte de DMC, antes mesmo de provocar toxicidade nas larvas. Por outro lado, este recipiente foi o único localizado no interior de um dos domicílios e conseqüentemente, o único a receber menor intensidade de luz em relação aos demais, retardando a ação fotodinâmica (o menor valor de iluminância foi observado nesta condição). Além disso, o recipiente estava coberto com um ramo de folhas, dificultando a penetração da luz.

Sabe-se que, ainda não há relatos da investigação de foto-inseticidas contra populações de campo, porém a atividade do DMC pode ser comparada à ação de inseticidas botânicos recentemente relatados na literatura. Anteriormente, Kamalakannan *et al* (2011), fizeram os primeiros registros da eficácia de extratos de *Acalypha indica* e *Achyranthes aspera* em *Ae. aegypti*. O estudo foi realizado em tanques de armazenamento de água (0,5 m³) aplicando 50g de cada extrato (total de 100g de extrato) + 0,5g de agente emulsificante (Teepol®) por litro. O sinergismo entre os dois extratos reduziu a população larval de *Ae. aegypti* (3º e 4º estágio) em 97% após 5 dias de exposição. Pode-se dizer que apesar do DMC ter provocado o mesmo percentual de redução larval, a sua atividade foi vista em apenas 48 horas e em concentração inferior (52).

Outras investigações de campo foram realizadas por Arjunan *et al* 2011 em tanques de armazenamento de água (0.25m³ e 250 L). Quatro extratos à 51 g/L (10x o valor de LC50 encontrada em laboratório) foram aplicados sobre populações de *Ae. aegypti* (3º e 4º estágio) reduzindo a densidade larvária em 84,3% (*Coleus amboinicus*), 88,7% (*Aloe vera*), 93,8% (*Hemidesmus indicus*) e 93,8% (*Cynodon dactylon*), em 48 horas (53). Suresh *et al* (2015) avaliaram os efeitos do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* (isolado e mediado por nanopartículas de prata) sobre larvas de *Ae. aegypti* em seis reservatórios de água do Instituto Nacional de Doenças Transmissíveis (Coimbatore, Índia). O extrato isolado de *P. niruri* levou a uma redução larval de 69%, enquanto as nanopartículas de prata + *P. niruri* levaram a redução de 76,7% em 48h (54). Mais recentemente, a eficácia larvicida do extrato de *Suaeda maritima* (10x LC50) foi investigada também contra *Ae. aegypti*,

resultando em redução larval de 51,20%, após 48 h (55). Nestes estudos todas as concentrações testadas foram bastante altas em comparação ao DMC.

A análise microbiológica da água dos recipientes coletados em campo mostrou um aumento significativo do crescimento microbiano após 48h da aplicação do DMC. Um leve crescimento também foi observado nos criadouros-controle após 48h. Os recipientes 3 e 4, foram os que tiveram um pico de crescimento mais acentuado, enquanto o recipiente 2 mostrou um leve aumento da sua carga microbiológica, devido à ausência de matéria orgânica. O crescimento microbiano dos recipientes foi caracterizado principalmente pela presença de matéria orgânica e inorgânica responsáveis por fornecer fatores essenciais ao crescimento dos microrganismos. As baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (OD), em 3 e 4, também foram um indicativo de alta atividade microbiana na amostra, ocorrendo maior consumo de OD e, conseqüentemente levando à queda dos níveis totais de OD. O pico de crescimento microbiano também 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 (56). No entanto, é provável que este desequilíbrio microbiológico no micro-ambiente retorne às condições iniciais encontradas após todo o consumo de DMC disponível, reestabelecendo o ambiente original.

Para que a utilização do DMC se concretize como uma nova substância para o controle de larvas do *Ae. aegypti*, alguns estudos precisam ser concluídos, como por exemplo, a avaliação da sua atividade residual nos reservatórios de água. Com isto, será possível indicar os ciclos de reaplicação desta substância nos criadouros, garantindo assim sua dose letal até o fim do tratamento. Outros locais de reprodução do mosquito, como os macro-criadouros, também precisam ser avaliados, uma vez que neste estudo, apenas criadouros com baixos volumes de água foram investigados. A proporção de D-manitol nas formulações de CUR também deve ser repensada antes do emprego do DMC como estratégia de controle, principalmente em reservatórios com carga elevada de matéria orgânica.

Em última análise, podemos dizer que as investigações em campo validaram a alta eficácia da CUR em D-manitol (DMC), reduzindo 97% a população de campo do *Ae. aegypti*. O uso deste foto-inseticida deve ser pensado como uma alternativa segura, eficaz e de baixo impacto ambiental para controlar focos de reprodução de mosquitos. Anteriormente, o uso da CUR no controle ambiental de vetores estava distante de ser viável, devido aos longos processos de extração e baixo rendimento. Hoje, em condições

de laboratório, a CUR pode ser sintetizada em regime de fluxo contínuo, rendendo cerca de 20g ao dia, o que ainda é insuficiente para as grandes aplicações. Em vista disso, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um reator, capaz de sintetizar grandes quantidades de CUR em relação aos métodos tradicionais, com um rendimento de até 60 kg ao mês. Esses reatores podem fornecer uma CUR com alto grau de pureza (~98%) e ainda reduzir substancialmente o custo desta substância, que poderá ser disponibilizada às regiões mais pobres e conseqüentemente, mais afetadas por arboviroses no Brasil.

5 REFERÊNCIAS

1. LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
2. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Fundação Nacional de Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico 2015**, Volume 46, no 44. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br>
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br>
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 16/2017. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br>
5. BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.
6. VALLE D, PIMENTA DN, CUNHA RV. Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015.
7. CLARO, L.B.L. *et al.* Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.6, p.1447-57, 2004.
8. DONALISÍO, R. M.; GLASSER, D. M. C. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista brasileira de epidemiologia**. São Paulo. v. 5, n.3, 2002.
9. MOREIRA, LA.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY JA, et al. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 268-1278, 2009.
10. DUTRA, H. L. et al. Wolbachia blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 6, p. 771–774, 2016.
11. DE SOUZA, L.M. et al. Efficacy of photogem (Hematoporphyrin Derivative) as a photoactivatable larvicide against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Journal of Life Sciences**, v. 11, p. 74-81, 2018.
12. EL-TAYEB, N.M.; ABD EL-AZIZ, H.H.; AWAD. A study on the dynamics of *Aedes caspius* larval uptake and release of novel haematoporphyrin. **African Entomology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2013.

13. FABRIS, C.; OUÉDRAOGO, R.K.; COPPELLOTTI, O.; DABIRÉ, R.K.; DIABATÉ, A.; DI MARTINO, P. 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.
14. ABDEL-KADER, M.H.; EL-TAYEB, T.A. Field application for malaria vector control using sunlight active formulated extract. Patent No. WO 2009/149720 A1, Patent Cooperation Treaty (PCT), Austria.
15. CARPENTER, T.L.; HEITZ, J.R. Light-dependent latent toxicity of rose bengal to *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Environmental Entomology**, v. 9, n. 5, p. 533–537, 1980.
16. EL-SHOURBAGY, N. M.; HUSSEIN, M. A.; ABU EL-DAHAB, F.F.; EL-MONAIRY, O.M.; EL-BARKY, N.M. Photosensitizing effects of certain xanthene dyes on *Culex pipiens* larvae (Diptera- Culicidae). **International Journal of Mosquito Research**, v. 5, n.6, p. 51-57, 2018.
17. WILSON, B.C.; PATTERSON, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics In Medicine And Biology**, v. 53, p. 61-109, 2018.
18. FOOTE, C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science**, v. 162, p. 963- 970, 1968.
19. MAGRO, M.; BRAMUZZO, S.; BARATELLA, D. et al. Self-assembly of chlorin-e6 on γ -Fe₂O₃ nanoparticles: Application for larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.194, p. 21-31, 2019.
20. SUETH, S.V.; MENDES, S.G.P.; DECOTE R.D.; LIMA, M.E. Curcumina, o pó dourado do açafraão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.
21. PÉRET-ALMEIDA, L.; CHERUBINO, A.P.F.; ALVES R.J.; DUFOSSÉ, L.; GLÓRIA, M. A. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Research International**, v. 38, p. 1039-1044, 2005.
22. PANDIT, R.S.; GAIKWAD, S.C.; AGARKAR, G.A.; GADE, A.K.; RAI M. Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its in vitro efficacy against human pathogens. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p.991–997, 2015.
23. DOVIGO, L.N.; CARMELLO, J.C.; DE SOUZA COSTA, C.A.; VERGANI, C.E.; BRUNETTI, I.L.; BAGNATO, V.S.; et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, p. 243–251, 2013.
24. VAREED, S.K.; KAKARALA, M.; RUFFIN, M.T.; CROWELL, J.A.; NORMOLLE, D.P.; DJURIC, Z.; BRENNER, D.E. Pharmacokinetics of curcumin conjugatemetabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiol BiomarkersPrev**, v.17, p. 1411–7, 2008.
25. DE SOUZA, L. M.; MAYUMI, N.; PERRI, F.; CARMONA-VARGAS, C. C.; PRATAVIEIRA, S.; OLIVEIRA, K.TO.; KURACHI, C.; BAGNATO, S. V. “Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae,” **J. Asian Pacific Entomology**, v, 22, n. 1, p. 151–158, 2019.
26. CARMONA-VARGAS, C. C.; ALVES, T. J.; OLIVEIRA, K. T. Combining batch and continuous flow setups in the end-to-end synthesis of naturally occurring curcuminoids. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 2, p. 366-374, 2017.
27. IBGE. Cidades: São Carlos. 2018.

28. Centro de pesquisas meteorológicas e climáticas aplicadas a Agricultura- CEPAGRI 2018. **Clima dos municípios paulistas**. Disponível em: www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html
29. KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; MAHESH KUMAR P, et al. Ovicidal, repellent, adulticidal and field evaluations of plant extract against dengue, malaria and filarial vectors. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1205–1219, 2013.
30. ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-266, 1925.
31. PAVELA, R.; MAGGI, F.; IANNARELLI, R.; BENELLI, G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: from laboratory to the field, with insights on the modes of action. **Acta Tropica**, v. 193, p. 236-271, 2019.
32. GREEN, M.M.; SINGER, J.M. et al. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) towards *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.7, p. 282–286, 1981.
33. CHIASSON, H.; BOSTANIAN N.J.; VINCENT, C. Acaricidal properties of a Chenopodium-based botanical. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, p. 1373–1377, 2004
34. REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405–424, 2012.
35. PAVELA, R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects e a review. **Plant Protection Science**, v. 52, p. 229-241, 2016.
36. SCHMAHL, G.; AL-RASHEID, K.A.S.; ABDEL-GHAFFAR, F.; KLIMPEL S.; MEHLHORN, H. The efficacy of neem seed extracts (Tre-san®, MiteStop®) on a broad spectrum of pests and parasites. **Parasitology Research**, v. 107, p. 261–269, 2010.
37. BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology Research**, v.114, p. 2801–2805, 2015.
38. CHUNG, S.K.; SEO, J.Y.; LIM J.H.; PARK, H.H.; YEA, M.J.; PARK H.J. Microencapsulation of essential oil for insect repellent in food packaging system. **Journal of Food Science**, v. 78, p. 709–714, 2013.
39. DE SOUZA, L. M.; MAYUMI, N., PERRI, F.; CARMONA-VARGAS, C. C.; PRATAVIEIRA, S.; THIAGO, K., OLIVEIRA, D.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae,” **Journal of Asian Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 151–158, 2019.
40. ALI, A.; WANG, Y. H.; KHAN, I. A. Larvicidal and biting deterrent activity of essential oils of *Curcuma longa*, ar-turmerone, and curcuminoids against *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* (Culicidae: Diptera). **Journal of Medical Entomology**, v. 52, p. 979– 986, 2015.
41. BEN AMOR, T.; JORI, G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 915-925, 2000.
42. TSUBONE, T.M.; MARTINS, W.K.; PAVANI, C. et al. Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. **Scientific Reports.**, v. 7, p. 6734, 2017.
43. LEE, D.C.; AHN, YJ. Laboratory and simulated field bioassays to evaluate larvicidal activity of *Pinus densiflora* hydrodistillate, its constituents and structurally related compounds against *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* in relation to their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. **Insects**, v. 4, n. 2, p. 217-229, 2013.

44. VENTURINI, F. et al. Estimative of acute toxicity of a photoactivatable larvicide in non-target organisms. **16th International Photodynamic Association World Congress**, p.290, 2017.
45. DA GRACA, M.L.; MACORIS, M.T.; VALÉRICO, D.M.; MARTINS, P.E. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of Sao Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 573–578, 2014.
46. VAREED, S.K.; KAKARALA, M.; RUFFIN, M.T.; CROWELL, J.A.; NORMOLLE, D.P.; DJURIC, Z.; BRENNER, D.E. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 17, p. 1411–7, 2008.
47. ROJAS-PINZÓN, P.A. et al. Laboratory and simulated-field bioassays for assessing mixed cultures of *Lysinibacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to temephos. **Applied Entomology and Zoology**, v. 53, n. 2, p 183–191, 2018.
48. DE MELO-SANTOS, M.A.V.; SANCHES, E.G.; DE JESUS, F.J.; REGIS, L. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis sorovar. israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1–2, 2001
49. EL-SHARABY, H.S.; SALAMA, M.; ABUL-ELA. Chemoreception in American bollworm *Heliothis armegra* (Hubn.). **Bulletin of entomological research**, v. 62, p. 269–273, 1978.
50. BARRON, J. 2009. Rainwater Harvesting: A Lifeline for Human Well-Being. Nairobi, Kenya: United Nations Environment Programme; Stockholm, Sweden: Stockholm Environment Institute, 69.
51. JORI, G.; MAGARAGGIA, M.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; CAMERIN, M.; TALLANDINI, L.; COPPELLOTTI, O.; GUIDOLIN L. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water-borne diseases. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 30, p. 261–271, 2011.
52. KAMALAKANNAN, K.; MURUGAN, S.; BARNARD, D.R. Toxicity of *Acalypha indica* (Euphorbiaceae) and *Achyranthes aspera* (Amaranthaceae) leaf extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.14, n. 1, p. 41-45, 2011.
53. ARJUNAN, N.; MURUGAN, K.; MADHIYAZHAGAN, P.; KOVENDAN, K.; PRASANNAKUMAR, S. et al. Mosquitocidal and water purification properties of *Cynodon dactylon*, *Aloe vera*, *Hemidesmus indicus* and *Coleus amboinicus* leaf extracts against the mosquito vectors. **Parasitology Research**, v.110, p. 1435-1443, 2012.
54. SURESH, U.; MURUGAN, K.; BENELLI, G.; NICOLETTI, N.; BARNARD, D.R.; PANNEERSELVAM, C. et al. Tackling the growing threat of dengue: phyllanthus niruri-mediated synthesis of silver nanoparticles and their mosquitocidal properties against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). **Parasitology Research**, v. 114, p. 1551-1562, 2015.
55. SURESH, U.; MURUGAN, K.; PANNEERSELVAM, C.; RAJAGANESH, R.; RONI, M. et al. Suaeda maritima-based herbal coils and green nanoparticles as potential biopesticides against the dengue vector *Aedes aegypti* and the tobacco cutworm *Spodoptera litura*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.101, p. 225-235, 2018.
56. WISSELINK, H. W.; WEUSTHUIS, R.A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GROBBEN, G.J. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 151-161, 2001.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesta tese permitem concluir a alta eficácia da CUR em diferentes açúcares (sacarose e D-manitol) para o controle de larvas do *Ae. aegypti*. No entanto, o tipo de material do recipiente tratado interferiu na sua atividade. Aqui, foi possível observar que os recipientes plásticos tiveram melhor resposta no tratamento, apresentando valores de LC_{50-24h} menores que os encontrados em recipientes de vidro. Uma das hipóteses plausíveis é que os materiais plásticos interagiram melhor com a CUR, formando um filme de coloração amarela nas paredes. Isto, fez com que as larvas se alimentassem deste “filme” por raspagem, internalizando assim altas concentrações de CUR.

Análises de microscopia Raman, mostraram a alta eficiência da CUR em D-manitol, uma vez que esse açúcar foi mais permeável à membrana peritrófica em relação à sacarose. Devido a isto, a mortalidade larval foi mais eficiente nesta formulação, uma vez que atingiu o epitélio intestinal mais rápido que a CUR em sacarose. Outra hipótese é que a CUR em D-manitol teria destruído a barreira peritrófica e alcançado o epitélio intestinal de forma mais eficiente que a sacarose. Apesar da CUR em sacarose ter sido menos eficaz, ela também provocou danos importantes à membrana peritrófica e ao epitélio intestinal.

Análises morfológicas das larvas ao longo do tratamento com CUR, evidenciaram um comportamento típico de mecanismo de defesa. Após internalizarem esta substância, as larvas tentaram eliminar, sem sucesso, parte do intestino preenchido com este conteúdo. Essas análises também permitiram localizar o primeiro sítio alvo de ação da CUR, o intestino médio, que ficou com um aspecto enegrecido após o tratamento. Possivelmente este enegrecimento está relacionado à destruição de células epiteliais e/ou a modificações importantes na membrana peritrófica.

Quanto aos testes de toxicidade aguda, ambas formulações de curcumina não apresentaram toxicidade para *D. magna* e *D. rerio*, mesmo em concentrações muito altas (100 mg.L^{-1}), garantindo a segurança da biota não-alvo. Por outro lado, solventes orgânicos como o DMSO e etanol, mostraram ser substancialmente tóxicos, mesmo em concentrações muito baixas.

Foi observada uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS) em *D. magna* na maior concentração de CUR em D-manitol (50 mg.L^{-1}). Isto pode ser uma resposta dos processos de desintoxicação ocorrido no cladócero frente à esta condição. No

entanto, é importante ressaltar que a exposição de *D. magna* a essa concentração é pouco provável em ambientes naturais, uma vez que a concentração usada para causar efeitos letais em *Ae. aegypti* é substancialmente menor que 50 mg.L⁻¹. Isso não foi observado para *D. rerio*.

Quanto às respostas bioquímicas em larvas do *Ae. aegypti*, a CUR em D-manitol não alterou a atividade da catalase (CAT) em nenhuma das concentrações testadas. Por outro lado, pode-se observar um aumento significativo de GSH nas larvas submetidas a concentração de 0,45 mg.L⁻¹ e uma diminuição na concentração de 1,8 mg.L⁻¹. A diminuição da GSH em 1,8 mg.L⁻¹ pode ser resposta à danos severos provocados pela CUR em D-manitol, levando à depleção dos níveis de GSH. Já a superprodução de GSH na concentração mais baixa indica esforços de desintoxicação, provavelmente devido à formação de ERO's oriundas da toxicidade da curcumina.

Alterações morfo-histológicas descritas aqui mostraram que a CUR provocou danos irreversíveis no epitélio intestinal de larvas do *Ae. aegypti*, desencadeando a degeneração celular. Alterações deletérias importantes foram identificadas nas três regiões do tubo digestório no tratamento com a CUR em D-manitol, enquanto os danos foram mais pontuais para a CUR em sacarose.

Em suma, podemos concluir que a CUR em D-manitol foi altamente eficaz contra populações de campo do *Aedes aegypti*, provocando quase 100% de mortalidade na concentração de 12,2 mg.L⁻¹. Esperamos, com os resultados apresentados aqui, contribuir para o desenvolvimento de uma modalidade de larvicidas altamente inovadora, sustentável e economicamente viável para suprir as necessidades do cenário nacional em combater a alta incidência de doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti*. Esses dados são extremamente relevantes, uma vez que, até o momento, os órgãos de saúde não encontraram medidas alternativas para o controle racional desses organismos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HALSTEAD, S. B. Dengue virus mosquito interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 273-291, 2008.
2. Consoli, R. A.; Lourenço-de-Oliveira, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228p., 1994.
3. Forattini, O.P. Culicidologia médica. São Paulo, Edusp, 860p, 2002.
4. Ministério da Saúde; Fundação Nacional de Saúde. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde; 2001b. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf
5. DEGALLIER, N.; FAVIER, C.; MENKES, C.; LENGAINNE, M.; RAMALHO, W. M.; SOUZA, R. G.; SERVAIN, J.; BOULANGER, J.-P. Toward an early warning system for dengue prevention: modeling climate impact on dengue transmission. **Climatic Change**, v. 98, p. 581-592, 2010.
6. ZEIDLER, J. D.; ACOSTA, P. O. A.; BARRÊTO, P. P.; CORDEIRO, J. D. S. Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, p. 986-991, 2008.
7. FARNESI, L.C.; MARTINS, A.J.; VALLE, D.; REZENDE, G.L. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 124–126, 2009.
8. REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 7, n.2, p. 261-273, 2007.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de vigilância em saúde. Secretária de Atenção à Saúde. O agente comunitário de saúde no controle da dengue. Série F. Comunicação e Educação em Saúde, ed.1, 2009.
10. BRAGA, I. A. et al. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, v.33, n.4, p. 347-353, 2000.
11. MERRITT, R.W.; DADD, R.H, WALKER, E.D. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 349– 376, 1992.
12. BLITVICH, B et al. Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 488-489, 2016.
13. SILVA, J. V. J.; LOPES, T. R. R.; OLIVEIRA-FILHO.; E. F.; OLIVEIRA, R. A. S.; DURÃES-CARVALHO, R.; GIL, L. H. V. G. Current status, challenges and

perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses. **Acta Tropica**, v. 182, p. 257–263, 2018

14. Ministério da Saúde (Brasil). Fundação Nacional de Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico 2015, Volume 46, no 44. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/07/2015-svs-be-pncd-se48.pdf>
15. FRANCO, Odair. História da febre amarela no Brasil. Brasília, Ministério da Saúde, 1976.
16. LILAY, A.; ASAMENE, N.; BEKELE, A.; MENGESHA, M.; WENDABEKU, M.; TAREKE, I et al. Reemergence of yellow fever in Ethiopia after 50 years, 2013: Epidemiological and entomological investigations. **Bmc Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 343, 2017.
17. MONATH, T.P. Yellow fever: An update. **Lancet Infectious Diseases**; v.1, n. 1, p 11-20, 2001
18. Ministério da Saúde (Brasil). Situação Epidemiológica: febre amarela. Brasília, DF, 5 jan. 2017.
19. Ministério da Saúde (Brasil). Fundação Nacional de Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 2002 (Série A. Normas e manuais técnicos no 176).
20. NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, Cambridge v. 342, n. 6157, p. 415-415, 2013.
21. DICK, G.W.; KITCHEN, S.F.; HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.46, p. 509-20, 1952
22. OLSON, J.G.; KSIAZEK, T.G. et al. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 389-93, 1981.
23. CAMPOS, G.S.; BANDEIRA, A.C.; SARDI, S.I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.21, n.10, p. 1885- 1886, 2015.
24. OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, I.P.; LEPARC-GOLFRT, I.; LESTÈRE, S.; VALOUR, F. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome: case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveillance**, v. 19, n.9, p. 20720, 2014
25. Ministério da Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 16/2017. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde 2017.

26. WEAVER, S.C.; FORRESTER, N.L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. :32–39, 2015.
27. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção Básica Chikungunya: Manejo Clínico/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica. –Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
28. HALSTEAD, S.B. *Aedes aegypti*: why can't we control it? **Bulletin of the Society for Vector Ecology**, v.1113, n. 2, p. 304–11, 1988
29. COELHO, G.E. Dengue: desafios atuais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n.3, p. 231–3, 2008
30. BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.
31. Valle D, Pimenta DN, Cunha RV. Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015.
32. OMOTO, C. Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (Org.) Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: Pallotti, p. 31-49, 2000
33. BROGDON, W.G.; MCALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.4, p.605-613, 1998
34. CROW, J.F. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, v. 2, p. 227-246, 1957.
35. Ferrari JA. Insecticide resistance In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado; 1996.
36. GOLDBERG, L. J.; MARGALIT. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquitoes News, New York**, v. 37, n. 3, p. 355-358, 1977.
37. LACEY, L. A. Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, 2007.
38. BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Glasgow, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.
39. KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of Bacillus thuringiensis δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 924, n. 3, p. 509-518, 1987.

40. MARDINI, L. B. L. F.; TORRES, M. A. N.; DA SILVEIRA, G. L.; ATZ, A. M. V. Simulium spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 211–214, 2000.
41. GRAF, J.F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, v. 9, p. 471-474, 1993.
42. VASUKI, V.; RAJAVEL.; R. Influence of short time exposure to an insect growth regulator, hexaflumuron, on mortality and adult emergence of vector mosquitoes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 275-283, 1999.
43. VASUKI, V. Influence of IGR treatment on oviposition of three species of vectos mosquitoes at sublethal concentrations. **Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 30, p. 200-203, 1999.
44. SUMAN, D.S.; PARASHAR, B.D.; PRAKASH, S. Effect of sublethal dose of diflubenzuron and azadirachtin on various life table attributes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, p. 996-1002, 2010.
45. CARLSON, J.R.; BENTHEY, D. Ecdysis: neural orchestration of a complex behavioral performance. **Science**, v. 195, p. 1006-1008, 1997.
46. BRAGA, I.A.; MELLO, C.B.; MONTELLA, I.R.; LIMA, J.B.P.; MARTINS-JR, A.J.; MEDEIROS, P.F.V.; VALLE, D. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities under laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 830-837, 2005.
47. KUBLER, A. C., Photodynamic therapy. **Medical Laser Application**, 20: p. 37-45, 2005
48. WILSON, B.C.; PATTERSON, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, 61-109, 2008
49. FOOTE, C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science**; v.162, 963- 970, 1968.
50. NOWIS, D. M.; MAKOWSKI, T.; STOKLOSA, M.; LEGAT, T et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, p. 339–352, 2005
51. SILVA, Z. S.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K.; PORTA, S.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M. R. Animal models for photodynamic therapy (PDT) Bioscience Reports, v. 35, n.6, p. 265, 2015.
52. BARBIERI, A. Sensibilizadores fluorescentes como larvicidas. Action fotodinamica de la luz. **Riv. Malariol**, v. 7, p. 456–463, 1928.

53. Heitz, J.R. Development of photoactivated compounds as pesticides. In: Heitz, J.R., Downum, K.R. (Eds.), *Light Activated Pesticides*. ACS, Washington DC, pp. 1–21. ACS Symposium Series 339, 1987
54. REBEIZ, C.A. Porphyrin insecticides. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 18, p. 97–114, 1992
55. BEN AMOR, T.; TRONCHIN, M.; BORTOLOTTI, L.; VERDIGLIONE, R.; JORI, G. Porphyrins and related compounds as photoactivatable insecticides. 1. Phototoxic activity of haematoporphyrin toward *Ceratitis capitata* and *Bactrocera oleae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 67, p. 206–211, 1998^a
56. MAGRO, M.; BRAMUZZO, S.; BARATELLA, D. et al. Self-assembly of chlorin-e6 on γ -Fe₂O₃ nanoparticles: Application for larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.194, p. 21-31, 2019.
57. ZHANG, J.; SHAKIL, A et al. Cell death induced by α -terthienyl via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the midgut of *Aedes aegypti* larvae. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 137, p. 87-98, 2019
58. DE SOUZA, L. M.; MAYUMI, N., PERRI, F.; CARMONA-VARGAS, C. C.; PRATAVIEIRA, S.; THIAGO, K., OLIVEIRA, D.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae,” **Journal of Asian Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 151–158, 2019.
59. SHIAO, S.H.; WENG, S.C.; LUAN, L.; VICENTE, M.D.G.H.; JIANG, X-J. et al. Novel phthalocyanines activated by dim light for mosquito larva- and cell-inactivation with inference for their potential as broad-spectrum photodynamic insecticides. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, 2019
60. LIMA, A.R , SILVA, C.M. 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.
61. EL- SHOURBAGY, N. M.; HUSSEIN, M. A.; ABU EL- DAHAB, F.F.; EL-MONAIRY, O.M.; EL- BARKY, N.M. Photosensitizing effects of certain xanthene dyes on *Culex pipiens* larvae (Diptera- Culicidae). **International Journal of Mosquito Research**, v. 5, n.6, p. 51-57, 2018.
62. DE SOUZA, L.M. et al. Efficacy of photogem (Hematoporphyrin Derivative) as a photoactivatable larvicide against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Journal of Life Sciences**, v. 11, p. 74-81, 2018.
63. FABRIS, C.; SONCIN, M.; JORI, G.; HABLUETZEL, A.; LUCANTONI, L.; SAWADOGO, S.; GUIDOLIN, L.; COPPELLOTTI, O. Effects of a new photoactivatable cationic porphyrin on ciliated protozoa and branchiopod crustaceans,

potential components of freshwater ecosystems polluted by pathogenic agents and their vectors. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 11, p. 294-301, 2012.

64. WOHLLEBE, S.; RICHTER, R.; RICHTER, P.; HADER, D.P. Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbid as photodynamic substances. **Parasitology Research**, v. 104, p. 593–600, 2009.

65. AWAD, H.H.; EL-TAYEB, A.; EL-AZIZ, N.M.; ABDELKADER, H. A semi-field study on the effect of novel hematoporphyrin formula on the control of *Culex pipiens* larvae. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 2, 2008.

66. DONDI, B.; DUCHON, S.; DIABATE, A.; HERVE, J.P.; CORBEL, V.; HOUGARD, J.; SANTUS, R.; SCHREVEL, J. Assessment of laboratory and field assays of sunlight-induced killing of mosquito larvae by photosensitizers. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n.4, p. 652-656, 2005.

67. ALVES, E.; FAUSTINO, M.A.F.; NEVES, M.G.P.M.S.; CUNHA, Â.; NADAIS, H.; ALMEIDA, A. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 22, p. 34–57, 2014.

68. BEN AMOR, T.; JORI, G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 915-925, 2000

69. SUETH, S.V.; MENDES, S.G.P.; DECOTE R.D.; LIMA, M.E. Curcumina, o pó dourado do açafraão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

70. MIQUEL, J.; BERND, A.; J. M. et al. The curcuma antioxidants: Pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 34, p. 37–46, 2002.

71. JURENKA, J.S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Alternative medicine review**, v. 14, n. 2, p. 141–153, 2009

72. CECÍLIO FILHO, A.B. **Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Curcuma longa*)**, Lavras, MG, 100p. Tese (Doutorado em Fitoctecnia), Universidade Federal de Lavras, 1996.

73. PANDIT, R. S.; GAIKWAD, S.C.; AGARKAR, G.A.; GADE, A.K.; RAI, M. Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its in vitro efficacy against human pathogens. **3 Biotech**, v.5, n. 6, p. 991–997, 2015

74. DOVIGO, L.N.; CARMELLO, J.C.; DE SOUZA COSTA, C.A.; VERGANI, C.E.; BRUNETTI, I.L.; BAGNATO, V.S et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medical Mycology**, v. 5, p. 1243–251, 2013

75. SOUZA, C.R.A. **Cúrcuma: caracterização extração e estabilidade**. Belo Horizonte UFMG. Dissertação de mestrado, 1993, 79 p.
76. PÉRET-ALMEIDA L., CHERUBINO, A.P.F.; ALVES R.J.; DUFOSSÉ, I.; GLÓRIA, M. A. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Research International**, v. 38, p. 1039 -1044, 2005
77. RAVINDRANATH, V.; CHANDRASEKHARA N. Metabolism of curcumin—studies with [3H] curcumin. **Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 337-344, 1982
78. PULIDO-MORAN, M.; MORENO-FERNANDEZ, J.; RAMIREZ-TORTOSA, C.; RAMIREZ-TORTOSA, M: Curcumin and health. **Molecules**, v. 21, p. 264,2016.
79. 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.
80. SUKARI, N.Y.; RASHID, B.K.; NEOH, N.H.; ABU BAKAR, S.; RIYANTO, G.C.L. Larvicidal activity of some Curcuma and Kaempferia rhizome extracts against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). **Asian Journal of Chemistry**, v. 22, p. 7915-7919, 2010

6 ANEXOS

Anexo A: Chamada pública do CNPq, no qual este projeto foi contemplado.

BRASIL Acesso à informação Participe Serviços Legislação Canais

Ir para o conteúdo 1 Ir para o menu 2 Ir para a busca 3 Ir para o rodapé 4

ACESSIBILIDADE ALTO CONTRASTE MAPA DO SITE

CNPq

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

Perguntas frequentes Central de Atendimento Serviços E-mail do Pesquisador Área de imprensa

Você está aqui: [CNPq](#) > [Assuntos](#) > [Bolsas e Auxílios](#) > [Chamadas](#) > Chamadas públicas

CNPq

Chamadas Públicas

As Chamadas Públicas para projetos de pesquisa e bolsas do CNPq estão organizadas nas abas do menu principal em "Abertas", "Encerradas" e "Resultados".

Chamada MCTIC/FNDCT-CNPq/ MEC-CAPES/ MS-Decit / N° 14/2016 - Prevenção e Combate ao vírus Zika

Apoiar projetos de pesquisa científica e tecnológica que visem contribuir significativamente para o desenvolvimento científico e tecnológico do País, com foco especial na prevenção, diagnóstico e tratamento da infecção do vírus Zika e doenças correlacionadas, e no combate ao mosquito *Aedes Aegypti*, contribuindo assim de modo efetivo para o avanço do conhecimento, formação de recursos humanos, geração de produtos, formulação, implementação e avaliação de ações públicas voltadas para a melhoria das condições de saúde da população brasileira.

ASSUNTOS

Institucional

Bolsas e Auxílios

Apresentação

Bolsas

Auxílios

Chamadas

Anexo B: Aprovação do comitê de ética para o uso de animais nos testes de ecotoxicologia



Av. Trabalhador são-carlense, 400 / 13566-590
 Caixa Postal 389 / 13560-970
 São Carlos - SP, Brasil
 Fone: +55 16 3373-9758
 www.ifsc.usp.br

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/IFSC

Certificamos que o projeto intitulado "**Utilização da cúrcuma (curcuma longa) como larvicida fotoativável e estudos toxicológicos em organismos aquáticos**", protocolo nº 11/2016, sob a responsabilidade da pesquisadora **Larissa Marila de Souza** e sob supervisão do **Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), em reunião de 30/09/2016.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	30/09/2016 a 01/10/2017
Espécie/linhagem/raça	Peixe/Danio
Nº de animais	1000
Peso/Idade	0,5 a 1,5g
Sexo	500 machos e 500 fêmeas
Origem	Loja de peixes ornamentais – São Carlos

São Carlos, 30 de setembro de 2016.

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva
 Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – IFSC/USP

Anexo C: Sistemas de armazenamento de água com coberturas precárias ou ausentes encontrados na cidade de São Carlos- SP, Brasil.

