

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LARISSA MARILA DE SOUZA

**Fotossensibilizadores no controle de larvas do *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae)**

**SÃO CARLOS
2015**

LARISSA MARILA DE SOUZA

**Fotossensibilizadores no controle de larvas do *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadores:
Profa. Dra. Cristina Kurachi
Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato

**SÃO CARLOS
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

S729fc

Souza, Larissa Marila de.

Fotossensibilizadores no controle de larvas do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / Larissa Marila de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2015.

119 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Biotecnologia. 2. *Aedes aegypti*. 3. Inativação fotodinâmica. 4. Fotossensibilizadores. 5. Cúrcuma. 6. Photogen[®]. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

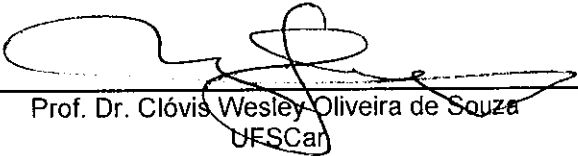


Folha de Aprovação

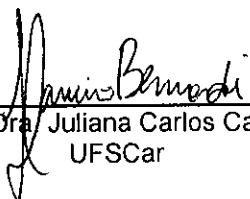
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Larissa Marila de Souza, realizada em 31/08/2015:



Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
USP



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar



Profa. Dra. Juliana Carlos Cancino
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus por ter me proporcionado dois anos incríveis, cheios de bênçãos, oportunidades, descobertas, fé, amor, amigos e, ainda, ter me permitido alcançar alguns sonhos e objetivos neste período. Agradeço diariamente pela saúde, pela VIDA, pelo privilégio de abrir os olhos todas as manhãs e ter a chance de realizar todas as minhas tarefas.

Aos meus pais, Fernando e Leila e à minha irmã Fernanda, por todo o amor, dedicação, ensinamentos, amizade, compreensão. Agradeço principalmente aos meus pais por terem me ensinado que a vida é para ser trilhada com dignidade, respeito ao próximo, humildade e plenitude. Obrigada por terem me dado tantas oportunidades, sem vocês, com certeza, o caminho até aqui seria mais difícil.

Aos meus avós, Neide e José de Jesus (in memoriam).

Ao meu namorado, Dalton Vital, por ter me incentivado e ficado ao meu lado nos momentos difíceis e também nos bons, por ter comemorado comigo todas as conquistas, obrigada.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Bagnato, pela oportunidade única de ter sido sua aluna, por ter me acolhido tão bem no seu laboratório, por ser paciente, por ser amigo e por ensinar à todos de forma tão brilhante. É um privilégio poder conviver com pessoas iguais à você.

À Prof. Dra. Cristina Kurachi, por todas as contribuições, ensinamentos, discussões e pelos almoços descontraídos no mamãe natureza.

Ao Prof. Dr. Juliano Corbi, por todos os ensinamentos desde a minha graduação.

Ao Prof. Dr. Kleber de Oliveira, por sempre motivar e colaborar com ideias brilhantes.

À Dra. Natália Inada que foi uma das primeiras pessoas à me apresentar ao mundo da ciência, que pegou muitas vezes na minha mão e me levou até o caminho certo, mas que também me deu vários puxões de orelha quando foi preciso. Obrigada por fazer parte desses dois anos, obrigada pelos conselhos e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Sebastião Pratavieira, por tanta dedicação ao meu trabalho, por não ter me deixado desistir nos momentos difíceis, por me ensinar o pouquinho que sei sobre “fluorescência”, “FLIM” e até “lei de Gauss”. Obrigada pela paciência, pelas horas de descontração, pelos almoços e risadas no laboratório. Você é um grande amigo.

Ao Dr. José Dirceu (amigo), pelas horas de filosofia no “PQ” depois do lanche, pelas longaaaaas reflexões sobre a vida e por tantas músicas que já cantamos juntos!!!

À minha amiga Ana Paula (Paulinha), que sempre esteve presente nessa minha caminhada, sempre me contagiando com sua alegria, energia positiva e me ensinando que a vida pode ser tão mais leve.

À Kate Blanco, por ter me ensinado que nada do que buscamos é alcançado sem muito esforço, suor e dedicação.

Aos meus amigos do Laboratório de Biofotônica e da Sala 32: Hilde, Ramon, Thaila, Marcelinho, Teresa, Renan, Ila, Mirian, Mariana, Isa, Fernandinha, Algodão, Pri Weiss, Clóvis, Michele, Govone, Pan, Larissa, Amanda, Cíntia, Bruninho, Lili.

À Dra. Juliana Cancino, Prof. Dr. Clóvis Oliveira e a Profa. Dra. Fernanda Anibal, por terem contribuído muito à versão final deste trabalho, participando do meu exame de qualificação.

À minha amiga irmã de alma Roana Piovesan, que mesmo distante, nunca deixou de me aconselhar e me apoiar.

À minha amiga Ivanize, por sempre estar ao meu lado e por me emprestar a casa dela e a mãe dela, quando precisei.

Às minhas amigas de longa data, Renata, Soraia, Mariana Bonadio, Mariana Rinaldi, Carol Toniolo.

Às amigas da Biotec e parceiras de disciplinas muito tensas, Paulinha Machado, Maria Fernanda, Monize, Tais Téó e Thalita (Tigronasss!!!!).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e todos os envolvidos, Claudia Pastega, Prof. Dr. Luis Carlos Trevelin, Prof. Dr. Julio Zuckerman. O meu obrigada pela oportunidade.

Às secretarias da Biofotônica, que são pessoas sensacionais e muitas vezes me ajudaram a resolver inúmeros problemas: Benê, Cris e Dri!!

À CAPES, pelo apoio financeiro.

*"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

"Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes."

- Isaac Newton

RESUMO

SOUZA, L. M. **Fotossensibilizadores no controle de larvas do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2015. 119p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, S.P. (2015)

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão da dengue. Dentre as inúmeras alternativas de combate ao vetor, podemos citar o uso de fotossensibilizadores (FSs) como inativadores de larvas do *Ae. aegypti*. Esses compostos são capazes de interagir com a luz, num comprimento de onda específico, de modo a originar espécies altamente reativas de oxigênio citotóxico, resultando na oxidação de alvos biológicos. O presente estudo teve como principal objetivo analisar os efeitos fototóxicos dos FSs: Photogem[®] e cúrcuma, em três variações moleculares (curcumina, mistura de pigmentos curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina) e curcumina em sacarose), contra larvas do *Ae. aegypti* sob diferentes condições de entrega dos FSs e de iluminação. Os experimentos deste estudo foram divididos em duas etapas: *i*) tanto o Photogem[®] quanto as três composições de cúrcuma foram aplicados nos ensaios de inativação fotodinâmica (IFD) em solução. Os grupos que receberam o Photogem[®] foram também alimentados com dois diferentes tipos de ração, com a finalidade de verificar a influência desses alimentos na mortalidade larval. *ii*) em uma segunda etapa as três composições de cúrcuma foram incorporadas nas rações, onde obteve-se um pó liofilizado, que foi posteriormente ofertado às larvas para a verificação da mortalidade. Após o recebimento dos FSs, tanto em solução como na forma de pó liofilizado, as larvas foram irradiadas com duas fontes de luz: artificial e natural. Além dos ensaios de mortalidade, outros estudos foram realizados, como a verificação do tempo de degradação dos FSs quando expostos à luz, o local anatômico de acumulação dos FSs nas larvas, e estudos de caracterização do produto obtido na forma de pó liofilizado. Na IFD com o Photogem[®] comparando as rações, expostas à iluminação artificial, uma delas apresentou uma mortalidade superior, indicando a importância desta na efetividade da IFD. Já na IFD com as variações de cúrcuma, as porcentagens de mortalidade variaram de acordo com as formas moleculares deste composto. Nas condições envolvendo luz solar, foram obtidas altos valores de mortalidade para todos os FSs entregues em solução, apresentando em diversas condições 100% de mortalidade em 8 horas de exposição à luz. Nos ensaios de IFD utilizando o pó liofilizado das três variações de cúrcuma e luz solar, mortalidades da ordem de 80% foram atingidas em 16 horas de iluminação. As análises das imagens de fluorescência obtidas por microscópio confocal mostraram que tanto as três variações de cúrcuma, como o Photogem[®], após um período de incubação de 12 horas, acumularam-se em todo o canal alimentar das larvas. O Photogem[®], assim como a cúrcuma apresentaram atividade fotodinâmica potente, sendo mais efetivos em condições com maiores intensidades de luz. Com relação às condições de entrega do FS, observamos que as maiores mortalidades foram obtidas através da aplicação dos FSs em solução, quando comparadas com os estudos de mortalidade utilizando o pó liofilizado. Esses resultados indicam que IFD pode ser uma técnica promissora no controle de vetores como o *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, inativação fotodinâmica, fotossensibilizadores, cúrcuma, Photogem[®].

ABSTRACT

SOUZA, L. M. **Photosensitizers on the control of *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae)**. 2015. 119p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, S.P. (2015)

The *Aedes aegypti* mosquito is the main responsible for the transmission of dengue. Among numerous alternatives to combat vector, we can cite the use of photosensitizers (PSs) as inactivating of *Aedes aegypti* larvae. These compounds are able to interact with the light in a specific wavelength, so the cause highly reactive cytotoxic oxygen, resulting in the oxidation of biological targets. The present study had as main objective to analyze the phototoxic effects of PSs: Photogem[®] and turmeric, in three molecular variations (curcumin, curcuminoids pigment mixture (curcumin, desmethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) and curcumin in sucrose), against *Aedes aegypti* larvae under different conditions of delivery of the PSs and lighting. The experiments of this study were divided into two stages: i) Photogem[®] and the three compositions of turmeric were applied in trials of photodynamic inactivation (PDI) in solution. The groups that received the Photogem[®], were also fed with two different types of food, in order to verify the influence of these foods on larval mortality. ii) in a second step the three compositions of turmeric were incorporated in pet food, where it obtained a lyophilized powder, which was subsequently offered to the larvae for scanning. After the receipt of the PSs in solution as in the form of freeze-dried powder, the larvae were irradiated with two sources of light: artificial and natural. In addition to the trials of mortality, other studies were performed, such as checking the time of degradation of PSs when exposed to light, the anatomical location of accumulation of FSs in the larvae, and characterization studies of the product obtained in the form of lyophilized powder. On PDI with the Photogem[®] comparing the foods, exposed to artificial lighting, one of the foods introduced a higher mortality, indicating the importance of this on effectiveness of PDI. Already on PDI with variations of turmeric, mortality rates varied according to the molecular forms of this compound, showing high mortality for curcumin and curcumin in sucrose. In conditions involving sunlight, high mortality rates were obtained for all FSs delivered solution, featuring in various conditions 100% mortality in 8 hours from exposure to light. For IFD using the freeze-dried powder of three variations of turmeric and sunlight, mortalities in the order of 80% were achieved in lighting 16 hours. The analysis of the fluorescence image obtained by confocal microscope showed that both the three variations of turmeric, such as Photogem[®], after an incubation period of 12 hours, accumulated throughout the alimentary canal of the larvae. The Photogem[®], as well as turmeric showed potent photodynamic activity being more effective in conditions with higher light intensities. Regarding the delivery conditions of the PS, we observe that the highest values of mortality were obtained through the application of PSs in solution, when compared with the mortality studies using the freeze-dried powder. These results indicate that PDI can be a promising technique in the control of vectors as the *Aedes aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*, photodynamic inactivation, photosensitizers, turmeric, Photogem[®].

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global de áreas em risco de transmissão de dengue. As regiões de riscos estão marcadas em vermelho.	23
Figura 2 - Casos de dengue e hospitalizações registrados no Brasil entre os anos de 1986 e 2002.	28
Figura 3 - Fases do ciclo evolutivo do <i>Aedes aegypti</i> . A: momento da postura dos ovos, B: larvas, C: pupa e D: adulto.	31
Figura 4 - Dois comportamentos alimentares identificados em larvas de <i>Aedes aegypti</i> ; A: <i>Collecting-filtering</i> : coleta por filtragem e B: <i>Collecting-gathering</i> : coleta ativa do substrato.	33
Figura 5 - A: Espectro de absorção óptica do fotossensibilizador Photogem [®] , B: Estrutura monomérica do Photogem [®]	41
Figura 6 - Espectro de fluorescência do fotossensibilizador Photogem [®]	42
Figura 7 - Estruturas químicas dos curcuminóides isolados do extrato de <i>Curcumina. longa</i> disponível comercialmente: 1: curcumina, 2: demetoxicurcumina e 3: bis-demetoxicurcumina.....	44
Figura 8 - Espectro de absorção da curcumina e da mistura de pigmentos curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina).....	45
Figura 9 - Espectro de fluorescência da curcumina e da mistura de pigmentos curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina).....	45
Figura 10 - Ilustração esquemática da aplicação de IFD em insetos transmissores de doenças. Os recipientes contendo larvas recebem o FS (pontos vermelhos) que posteriormente é ingerido por esses organismos (larvas em vermelho). Após a ingestão do FS, as larvas são irradiadas com luz solar ou luz artificial para que ocorra o início das reações fotodinâmicas, induzindo desta forma a mortalidade larval.	47
Figura 11 - Espectro de irradiância da lâmpada fluorescente (Sylvania – 18 W).....	54
Figura 12 - Espectro de irradiância do Sol em uma das condições experimentais.	54
Figura 13 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando Photogem [®] durante IFD – Iluminação artificial.	63
Figura 14 – Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função da concentração de Photogem [®] durante IFD – Iluminação artificial.	64
Figura 15 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando cúrcuma natural (CN) durante IFD – Iluminação artificial.	65
Figura 16 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando curcumina (C) durante IFD – Iluminação artificial.	66
Figura 17 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando curcumina incorporada em sacarose (CS) durante IFD – Iluminação artificial.....	67
Figura 18 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo, utilizando curcumina incorporada em sacarose (CS) – Controle escuro.....	68
Figura 19 - Mortalidade das larvas (Grupo 1) em função da concentração de Photogem [®] - Iluminação natural (período 1).	69
Figura 20 - Mortalidade das larvas (Grupo 2) em função da concentração de Photogem [®] - Iluminação natural (período 2).	70
Figura 21 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando cúrcuma natural (CN) durante IFD – Iluminação natural.	71
Figura 22 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando curcumina (C) durante IFD – Iluminação natural.....	72
Figura 23 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando curcumina em sacarose (CS) durante IFD – Iluminação natural.	73
Figura 24 - Espectros de absorção óptica do Photogem [®] - Fotodegradação com iluminação natural.	74
Figura 25 - Espectros de absorção óptica do Photogem [®] - Fotodegradação com iluminação artificial.....	75
Figura 26 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma natural (CN)- Fotodegradação com iluminação artificial.	76
Figura 27 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma natural (CN) - Fotodegradação com iluminação natural.	77
Figura 28 - Espectros de absorção óptica da curcumina (C)- Fotodegradação com iluminação artificial. 78	
Figura 29 - Espectros de absorção óptica da curcumina (C)- Fotodegradação com iluminação natural. ..	79

Figura 30 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose (CS)- Fotodegradação com iluminação artificial.	80
Figura 31 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose (CS)- Fotodegradação com iluminação artificial.	80
Figura 32 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose (CS)- Fotodegradação com iluminação natural.	81
Figura 33 – Imagens de microscopia confocal em larvas do <i>Aedes aegypti</i> – Incubação em Photogem®. 82	
Figura 34 – Imagens de microscopia confocal da larva e dos segmentos larvais do <i>Aedes aegypti</i> – Incubação em Photogem®.	83
Figura 35 – Imagens de microscopia confocal em larvas do <i>Aedes aegypti</i> – Incubação em cúrcuma.	84
Figura 36 - Imagens de microscopia óptica das rações A e B	86
Figura 37 - Imagens de fluorescência das rações A e B liofilizadas com cúrcuma (CN, C e CS).....	87
Figura 38 – Espectros de fluorescência normalizados da cúrcuma natural (CN), curcumina (C) e curcumina em sacarose (CS), incorporadas em ração A.	88
Figura 39 - Espectros de fluorescência normalizados da cúrcuma natural (CN), curcumina (C) e curcumina em sacarose (CS), incorporadas em ração B.....	89
Figura 40 – Espectros de absorção da solução com ração A liofilizada com cúrcuma natural.	90
Figura 41 - Espectros de absorção da solução com ração A (controle)	91
Figura 42 - Espectros de absorção da solução com ração B liofilizada com cúrcuma natural.	92
Figura 43 - Espectros de absorção da solução com ração B (controle)	92
Figura 44 - Espectros de fluorescência normalizados da curcumina (C) incorporada em ração A.	93
Figura 45 - Espectros de fluorescência normalizados da cúrcuma natural (CN) incorporada em ração A.	94
Figura 46 - Espectros de fluorescência normalizados da curcumina (C) incorporada em ração B.....	95
Figura 47 - Espectros de fluorescência normalizados da cúrcuma natural (CN) incorporada em ração B.	96
Figura 48 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando ração A liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), com período de incubação.	97
Figura 49 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando ração A liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), sem período de incubação.	98
Figura 50 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando ração B liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), com período de incubação.	99
Figura 51 - Mortalidade do <i>Aedes aegypti</i> em função do tempo de iluminação utilizando ração B liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), sem período de incubação.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BTi: *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelenses*
CN: Cúrcuma natural
C: Curcumina
CS: Curcumina em sacarose
CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças
DC: Dengue clássica
DDT: Dicloro-difenil-tricloroetano
DENV-1: Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2: Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3: Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4: Vírus dengue sorotipo 4
DMSO: Dimetilsulfóxido
EESC: Escola de Engenharia de São Carlos
FHD: Febre hemorrágica do dengue
FS: Fotossensibilizador
HP: Hematoporfirina
HpIX: Protoporfirina IX
IFD: Inativação Fotodinâmica
NPK: Nitrogênio, fósforo e potássio
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPAS: Organização Pan- Americana de Saúde
OF: Organofosforado
PNCD: Programa Nacional de Controle da Dengue
RCI: Reguladores de crescimento de insetos
UV: Ultravioleta
°C: Grau Celsius
g: Grama
mg: Miligrama
mL: Mililitros
nm: Nanômetro
μM: Micromolar
mm: Milímetro
mg/L: Miligrama por litro
mg/mL: Miligrama por mililitro
μg/mL: Micrograma por mililitro
g/mol: Grama por Mol
mW/m²: Miliwatts por centímetro quadrado
ppm: Partes por milhão
rpm: Rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. DENGUE	23
2.1. Histórico da dengue no mundo	23
2.2. Dengue nas Américas e no Brasil.....	25
2.3. Aspectos básicos do vetor <i>Aedes aegypti</i>	29
2.4. Métodos utilizados no controle de larvas do <i>Aedes aegypti</i>	33
3. INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA	37
3.1 Princípios básicos da inativação fotodinâmica e fotossensibilizadores.....	37
3.2. Photogem [®] e cúrcuma	40
4. HISTÓRICO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM INSETOS VETORES	46
5. OBJETIVOS.....	51
6. MATERIAL E MÉTODOS	52
6.1 Criação e manutenção das larvas.....	52
6.2 Fotossensibilizadores.....	52
6.3 Fontes de luz.....	53
6.4 Primeira etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: fotossensibilizadores aplicados diretamente em meio aquoso	55
6.4.1 Mortalidade de larvas do <i>Aedes aegypti</i> : iluminação artificial.....	55
6.4.2 Mortalidade de larvas do <i>Aedes aegypti</i> : iluminação natural	56
6.4.3 Estudo de fotodegradação dos fotossensibilizadores.....	58
6.4.4 Microscopia confocal de fluorescência	59
6.5 Segunda etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: incorporação da cúrcuma (CN, C e CS) em ração, obtendo-se um pó liofilizado	59
6.5.1 Preparo das rações liofilizadas e mortalidade larval	60
6.5.2 Caracterização das rações: análise em microscópio confocal, estabilidade preliminar das rações liofilizadas armazenadas em temperatura de 2 a 8° C e ensaios de liberação das composições de cúrcuma em solução (ração liofilizada)	60
6.6 Análise dos dados	61
7. RESULTADOS.....	62
7.1 Primeira etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: Fotossensibilizadores aplicados diretamente em meio aquoso	62
7.1.1 Mortalidade de larvas do <i>Aedes aegypti</i> : iluminação artificial.....	62
7.1.2 Mortalidade de larvas do <i>Aedes aegypti</i> : iluminação natural.....	68

7.1.3	Estudo de fotodegradação dos fotossensibilizadores.....	73
7.1.4	Microscopia de fluorescência	81
7.2	Segunda etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: incorporação da cúrcuma (CN, C e CS) em ração, obtendo-se um pó liofilizado.....	84
7.2.1	Caracterização das rações (puras e liofilizadas com os fotossensibilizadores): análise em microscópio confocal.....	84
7.2.2	Caracterização das rações: ensaios de liberação das composições de cúrcuma em solução (ração liofilizada)	89
7.2.3	Caracterização das rações: análise de estabilidade preliminar das rações liofilizadas armazenadas em temperatura de 2° a 8° C.....	93
7.2.4	Mortalidade de larvas do <i>Aedes aegypti</i>	96
8	DISCUSSÃO	101
8.1	Primeira etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: Photogem [®] e curcuma (CN, CI e CS) em solução	101
8.2	Segunda etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: incorporação da cúrcuma (CN, C e CS) em ração	108
9	CONCLUSÕES	110
10	REFERENCIAS	112

1. INTRODUÇÃO

Dentro da temática da entomologia médica, os mosquitos da família Culicidae são os que mais têm atraído à atenção da saúde pública. Esses insetos, da ordem díptera são responsáveis pela transmissão de diversas doenças à espécie humana, em especial, no que concerne a malária, as filariose e arboviroses como a febre amarela e a dengue.¹

A dengue, em específico é uma doença infecciosa cujos agentes etiológicos são arbovírus pertencentes à família Flaviviridae, do qual são conhecidos quatro sorotipos, antigenicamente distintos, designados como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.^{2;}³A doença é exclusivamente transmitida ao homem através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes* e pode se manifestar sob duas formas clínicas: a dengue clássica (DC) e a febre hemorrágica da dengue (FHD), onde a sintomatologia é constituída por cefaleia, febre, uretralgias, mialgias e prostração.¹ A infecção por um dos tipos sorológicos não confere o desenvolvimento de proteção cruzada contra os demais sorotipos, de modo que, teoricamente, uma população que vive em áreas endêmicas poderá ser exposta aos quatro sorotipos do vírus da dengue.^{1; 3}

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 100 milhões de pessoas sejam infectadas pelo vírus da dengue anualmente, ocasionando 500.000 casos de dengue hemorrágica (FHD) e 24.000 mortes, colocando quase metade da população mundial em risco. A dengue, por sua vez, revela-se endêmica em todos os continentes com exceção da Europa, afetando de forma direta regiões urbanas, subúrbios e zonas rurais.⁴

Na ausência de uma vacina específica para a contenção da doença, medidas de combate ao vetor foram adotadas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), instituída pelo Ministério da Saúde em 1996.⁵ Em casos de surtos, as estratégias restringem-se à aplicação de inseticidas químicos de ação larvicida e adulticida da classe dos piretróides, organofosforados e carbanatos, com destaque para o Abate (*Temephos*),^{1; 5} que atua diretamente no sistema nervoso central dos insetos. Além dos inseticidas químicos, produtos como o Dimilin (difluorbenzofurona) e o Altosid (metoprene) também foram lançados com a finalidade de controlar as populações de vetores, cuja ação desses compostos é caracterizada por interferir na metamorfose de larvas e inibir a síntese de quitina, bloqueando a formação cuticular em cada muda.^{1; 5; 6} Outro agente muito enfatizado nas últimas décadas foi o *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti), onde pode ser inserido nos tópicos de controle biológico

e utilizado como alternativa à inseticidas químicos, produtos originados de microrganismos revelam aspectos promissores como larvicidas.^{1; 7} O Bti é uma bactéria Gram positiva comumente encontrada em solos, cuja principal característica é a produção de cristais sintetizados durante a esporulação, os quais são responsáveis por conferir ação tóxica a diversas ordens de insetos, como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hemiptera.^{1; 8; 9}

Considerando-se o alto custo das formulações do *B. thuringiensis israelenses*, muitos países subdesenvolvidos, onde os riscos de epidemias são elevados, limitam o seu uso preferindo produtos mais acessíveis, como os inseticidas convencionais. No entanto, sabe-se que a aplicação frequente desses compostos tem provocado o aparecimento de populações de mosquitos resistentes, além de ocasionar uma série de eventos indesejáveis como a poluição ambiental e graves problemas à saúde humana.^{10; 11; 12}

Embora a utilização desses compostos seja essencial em casos de epidemia, sua aplicação deve ser combinada com estratégias de gestão ambiental e métodos que envolvam diretamente ações de cidadania, onde a população é orientada a ter condutas que gerem melhorias sanitárias em seus domicílios. Ainda hoje, a melhor forma de prevenir a doença é a inspeção de potenciais criadouros de larvas, tanto os artificiais como os naturais, e a remoção mecânica de recipientes capazes de acumular água. Esses recipientes consistem em resíduos sólidos inservíveis, descartáveis, que são utilizados de forma intensa em áreas urbanas pelo homem.^{12; 13; 14; 15}

Dentre as inúmeras estratégias que estão sendo investigadas para o controle do *Aedes aegypti*, como por exemplo, a introdução de mosquitos estéreis no ambiente na tentativa de suprimir a população¹⁶ e o desenvolvimento de novas formulações à base de princípios ativos de plantas, vale destacar o uso de fotossensibilizadores (FSs) ou fotoinseticidas como ferramenta promissora para o combate de insetos-vetores.^{17; 18; 19} Este conceito pode ser explicado pelos princípios das reações fotodinâmicas, onde o mecanismo de fotossensibilização consiste na interação de um FS com luz e oxigênio molecular, resultando em espécies altamente reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto (¹O₂).

Os processos envolvendo reações fotodinâmicas possuem diversas aplicações em diferentes áreas, um exemplo bastante típico pode ser representado pela Terapia Fotodinâmica (TFD), que consiste no tratamento do câncer e de doenças não

oncológicas.^{20; 21; 22} Nas últimas décadas, a técnica também mostrou-se promissora no tratamento de uma série de doenças infecciosas provocadas por fungos e bactérias.^{23; 24}

A inativação fotodinâmica é caracterizada por ser um processo sem um alvo específico, a metodologia é eficaz na oxidação de inúmeras biomoléculas, levando a morte de vários tipos celulares. Essa metodologia possui um amplo leque de atividades e, utilizando o mesmo FS, é possível ocasionar a destruição de vírus, bactérias, leveduras, protozoários, helmintos e, ainda, insetos.^{25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32}

Diversas gerações de fotossensibilizadores demonstraram ação rápida e eficaz na eliminação de larvas de insetos transmissores de doenças, alguns já são conhecidos como agentes fototerapêuticos e aditivos alimentares, tais moléculas consistem em porfirinas, acridinas, tiofenos, fenotiazinas, xantenos, clorofila, clorofilinas, hematoporfirina, entre outros.^{32; 33} Futuramente, alguns desses compostos podem apresentar grande interesse para órgãos de combate à dengue, pois além de possuírem baixo custo de produção, reduzem os impactos ambientais e não apresentam atividade mutagênica.^{32; 34} Ao longo dos anos a ação desses compostos foi investigada em um amplo espectro de insetos, incluindo moscas e mosquitos. Em condições laboratoriais os efeitos de porfirinas e compostos similares apresentaram-se eficazes para organismos como *Ceratitis capitata* e *Bactrocera oleae*.^{11,24} Outros derivados de porfirina, solubilizados em água, também mostraram ser potentes contra larvas de *Aedes* e *Culex* em condições de campo e laboratório.²⁵ Em 2012, uma porfirina modificada (C12) foi investigada na presença de alimentos larvais e compostos farmacêuticos, a fim de otimizar o efeito da C12 em larvas de *Anopheles gambiae*. Os resultados exibiram alto potencial larvicida dessas composições.¹⁹ De acordo com a literatura outras espécies também mostraram ser susceptíveis as ações desses fotossensibilizadores como *Aedes caspius*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles stephensi*, *Culex pippiens* e *Culex quinquefasciatus*.²²

A motivação em se estudar substâncias fotossensíveis para o controle de insetos nocivos é apresentar aos órgãos públicos novas estratégias para a contenção de doenças provocadas por esses organismos, de modo que essas substâncias reduzam os problemas de saúde pública e os impactos ambientais provocados por inseticidas convencionais. Em vista disso, o presente estudo propôs avaliar os efeitos da IFD contra larvas do *Aedes aegypti*, utilizando duas classes de FSs: o Photogem[®] e a cúrcuma. Embora os efeitos larvicida da cúrcuma já tenham sido demonstrados por outros autores, os resultados deste trabalho revelam de forma inédita a grande eficácia desta substância

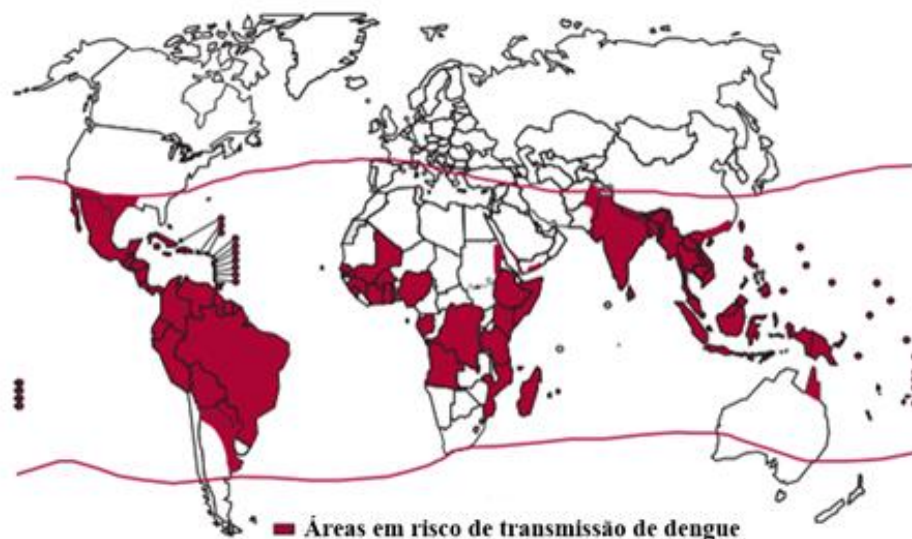
quando em combinação com luz visível, atuando desta forma como um fotoinseticida em larvas do *Aedes. aegypti*.

2. DENGUE

2.1. Histórico da dengue no mundo

Dengue é uma doença infecciosa transmitida ao homem pela picada infectada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, cujo principal representante sob o ponto de vista epidemiológico, vem a ser o *Aedes aegypti*.¹ Mosquitos deste gênero foram os principais responsáveis por disseminar a forma ativa do vírus por vários territórios, ocasionando graves epidemias por muitas décadas. Os vírus DENV são mantidos na natureza através de ciclos biológicos que envolvem o vetor hematófago e hospedeiros vertebrados, cujo homem é o único a adquirir as formas clínicas da infecção.^{35; 36} Nos últimos 50 anos, os quatro sorotipos do vírus se disseminaram de forma acelerada pela África, Américas, Sudeste da Ásia e Mediterrâneo Oriental, alertando à população de uma possível ameaça de pandemia (Figura 1).^{4; 36} De acordo com Howe *et al* (1981), no período correspondente aos anos de 1779 e 1916, aconteceram no mundo oito pandemias, com duração de até sete anos.³⁷

Figura 1 - Distribuição global de áreas em risco de transmissão de dengue. As regiões de riscos estão marcadas em vermelho.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2013)

A dengue, compreendida como uma síndrome febril seguida de sintomatologia extensa teve seus primeiros relatos na Ásia (ilha de Jacarta), Egito (Cairo e Alexandria) e América do Norte nos anos de 1779 e 1780, no entanto também se encontram registros da doença no século III. Nos anos de 265 a 420 d.C., ao longo da Dinastia Chinesa, foram relatados sintomas de uma possível enfermidade relacionada à água e à mosquitos, os chineses denominaram-na “veneno da água”. Esses relatos foram incluídos em uma enciclopédia durante a Dinastia Tang, em 610 d.C., e Dinastia Norte Sug, em 992 d.C.^{38; 39}

Ainda no ano de 1780, ao longo de uma grave epidemia na Filadélfia, o médico Benjamin Rush, através de preciosas observações, conseguiu relacionar os primeiros casos da doença com fatores ambientais, como por exemplo, o aumento da temperatura, que ocasionou a proliferação de mosquitos vetores. O quadro clínico da doença, também relatado pelo autor, se mantém até hoje como uma das melhores descrições das manifestações desta arbovirose, deixando claro a origem/causa do surto ocorrido na Filadélfia.⁴⁰ Outros casos foram descritos anteriormente ao ano supracitado, estes ocorridos no oeste da Índia Francesa (1635) e no Panamá (1699), no entanto, não há comprovação de ter se tratado de dengue, apesar dos sintomas serem semelhantes aos relatados hoje.⁴¹

Graham (1903) foi o primeiro a registrar que a doença era transmitida por insetos portadores do vírus DENV, a confirmação veio através de voluntários expostos à mosquitos coletados em residências de pessoas infectadas.^{42; 43} Bancroft (1926) identificou a principal espécie envolvida na transmissão da doença, isso foi possível a partir dos hábitos diurnos do mosquito, concluindo ser então o *Aedes aegypti*. Nesse período ainda se desconhecia o agente etiológico causador da infecção, foi um ano depois, que Ashburn e Craig, observaram que a doença era ocasionada por um organismo ultramicroscópio e filtrável em retentores de bactérias e protozoários, eliminando a hipótese da infecção ser ocasionada por esses microrganismos.^{44; 45}

Por muitos anos, a dengue se apresentou em sua forma benigna, não relatando óbitos e, foi apenas durante a Segunda Guerra Mundial que teve o início de severos surtos de febre hemorrágica e de novos sorotipos do vírus circulando por um mesmo território.⁴⁶ Esses surtos de febre hemorrágica muitas vezes foram confundidos com outras arboviroses como a febre amarela, e só depois de uma grave epidemia na Tailândia (Bangcoc, 1958) que foi confirmado que se tratava de uma nova forma de dengue.⁴⁶ Posteriormente, a dengue hemorrágica foi registrada em outros países do

Sudeste Asiático, como Vietnã do Sul (1960), Singapura (1962), Malásia (1963), Indonésia (1969) e Birmânia (1970).⁴¹ Segundo Gluber *et al* (1995), já existiam registros desta forma clínica de dengue antes do século XX, onde se constatou doenças semelhantes à febre hemorrágica da dengue. No ano de 1928, a Grécia foi afetada gravemente pela doença, onde mais da metade da população de Atenas foi atingida, sendo notificados mais de 1 milhão de casos e cerca de 1250 óbitos.⁴¹

Ao final da guerra, Sabin (1952) fez relatos importantes sobre o que se conhece atualmente a respeito da arbovirose, como por exemplo, definiu os dois primeiros sorotipos virais envolvidos com a infecção, sorotipo 1 e sorotipo 2, desvendou as vias de infecção e o tamanho da partícula do vírus, bem como substâncias químicas capazes de inativá-los, descobriu através de infecções experimentais todo o aspecto clínico da doença e também determinou a duração da imunidade homóloga e heteróloga conferida pela infecção.⁴⁷ Além das importantes contribuições de Sabin (1952), o mesmo também foi responsável por desenvolver o primeiro modelo de infecção em camundongos recém-nascidos, o que permitiu os primeiros ensaios de vacinação e testes sorológicos para a identificação de anticorpos neutralizantes.^{47; 48}

A partir dos surtos ocorridos no Sudeste Asiático, especificamente em Manila (Filipinas), isolaram-se mais dois sorotipos do vírus, os sorotipos 3 e 4, onde então o complexo dengue passou a ser formado por quatro diferentes tipos de vírus, denominados hoje: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.⁴⁹ Pelo que se conhece, foi no período pós-guerra que a dengue se transformou em um dos mais impactantes problemas de saúde pública no mundo, voltando-se para a maioria dos continentes, e afetando milhões de pessoas por ano.

2.2. Dengue nas Américas e no Brasil

A maioria das epidemias de dengue nas Américas foi registrada a partir de 1896 nos Estados Unidos e em cidades portuárias do Caribe. Embora as etiologias dos primeiros casos sejam ainda desconhecidas, há relatos de que uma infecção semelhante a dengue teria aparecido em Buenos Aires através de pessoas desembarcadas do Brasil.³⁶ A primeira epidemia na Argentina ocorreu em 1916, porém o sorotipo específico envolvido nestas infestações ficou desconhecido até 1953, onde as primeiras amostras de DENV-2 foram então isoladas. Alguns anos mais tarde descobriu-se que as

epidemias relacionadas à década de 60, no continente americano, teria sido causada pelo DENV-2 e DENV-3, que foi isolado pela primeira vez em Porto Rico.⁵⁰

Em 1977, o DENV-1 foi introduzido nas Américas, sendo detectado pela primeira vez na Jamaica e se alastrado desde então por diversas ilhas do Caribe. O mesmo sorotipo foi isolado nos Estados Unidos da América (EUA), sendo notificados mais de 700.000 casos de dengue entre os anos de 1977 e 1980. Epidemias similares foram registradas na América do Sul (Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa) América Central (Belize, Honduras, Guatemala, El Salvador) e México.⁵¹

No ano de 1981 o continente foi marcado por dois acontecimentos importantes: a introdução de um novo sorotipo do vírus, o DENV-4, e os primeiros diagnósticos de febre hemorrágica do dengue/síndrome de choque, provocando graves epidemias em Cuba, onde notificou-se cerca de 344.203 casos, 116.000 hospitalizações e aproximadamente 158 óbitos.³⁸ A segunda epidemia envolvendo a forma hemorrágica do dengue ocorreu na Venezuela em 1989, onde foram relatados mais de 3 mil casos e 73 mortes com o envolvimento dos três sorotipos do vírus: DENV-1, DENV-2 e DENV-4.³⁸

Os quatro sorotipos do DENV foram detectados em vários países da América do Sul e Caribe. Com o passar dos anos, demais países do continente americano tiveram sua situação epidemiológica agravada, onde as regiões não-endêmicas ou hipoendêmicas (presença de apenas um sorotipo do vírus) passaram a ter casos de hiperendemia (ocorrência de vários sorotipos do vírus presente numa mesma região).³⁸ Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, entre os anos de 1980 e 1990 foram notificados mais de 42.000 casos de febre hemorrágica, difundida em 25 países, com destaque para a Colômbia, México e Brasil.⁵²

No Brasil há relatos da presença do *Aedes aegypti* desde o século XVII, porém esses registros referem-se aos surtos de febre amarela que é também transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*. A primeira epidemia de febre amarela urbana aconteceu no estado de Pernambuco em 1685 e as primeiras mortes foram detectadas na Bahia no ano seguinte. Em 1849, ocorreu uma rápida expansão da infestação do vetor na cidade de Salvador, causando 2.800 mortes. No mesmo ano confirmou-se mais uma epidemia de febre amarela na cidade do Rio de Janeiro, com aproximadamente 4.160 óbitos. A disseminação da doença foi então acelerada pela navegação marítima, que passou a atingir vários territórios desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul.⁵³

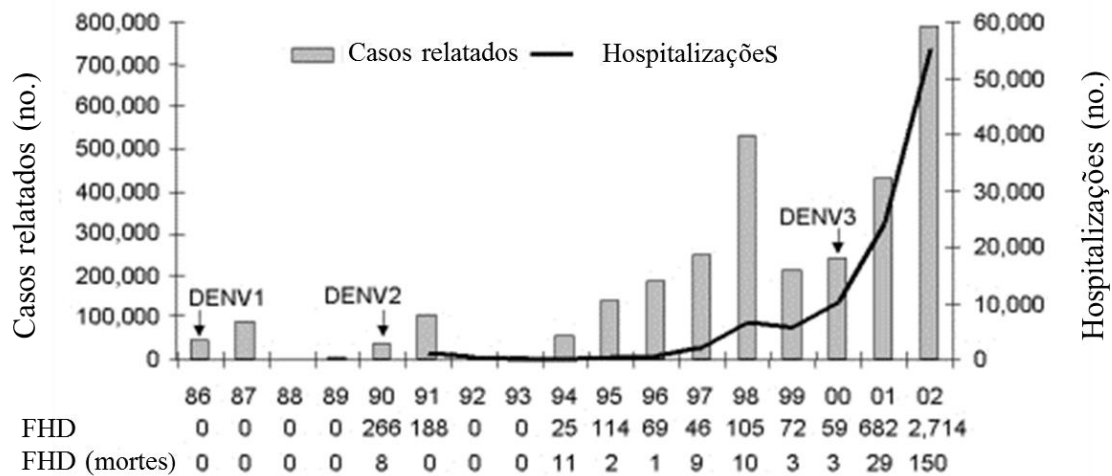
Após muitos óbitos confirmados, órgãos públicos resolveram lançar uma campanha sanitária de combate ao vetor, comandada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), a fim de prevenir a febre amarela. Com o programa de erradicação, o Brasil permaneceu livre do *Aedes aegypti* por várias décadas.⁵³

Depois de vários anos sem a presença do *Aedes aegypti* em território nacional ocorreu a reinfestação do vetor e a reintrodução do DENV em áreas urbanas do Brasil, o que aumentou, mais uma vez, os riscos de novas epidemias de febre amarela. Os primeiros surtos de dengue no país foram registrados também no Rio de Janeiro (RJ) em 1864, englobando as regiões sul, sudeste e nordeste.⁵⁴ Em 1886, a doença se alastrou pelo município de Valença (RJ), onde recebeu nomes populares como: valenciana e polka, esta última associada com as fortes dores nas articulações causada pela infecção viral.

Em 1981, foram isolados pela primeira vez em laboratório dois sorotipos do vírus relacionados à surtos ocorridos em uma área isolada no noroeste da Amazônia (Roraima): DENV-1 e DENV-4. Após 5 anos sem notificações da doença, o Rio de Janeiro sofreu uma grave epidemia causada pelo DENV-1, onde o número de casos chegou a ultrapassar 60.000.⁵⁵

Nesta época, todo o território nacional registrou mais de 134.716 casos da doença, atingindo principalmente as regiões do Nordeste (Alagoas, Ceará e Bahia) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), com baixa incidência na região Sul. Em 1987 e 1991, o número de casos de dengue aumentou significativamente após a introdução do DENV-2 e o aumento da transmissão pelo DENV-1 (Figura 2).⁵⁵ A introdução do DENV-2 trouxe concomitantemente à dengue clássica os primeiros diagnósticos de febre hemorrágica do dengue, onde foram confirmados 462 casos e 8 óbitos. Nos anos seguintes, a circulação simultânea desses dois sorotipos do vírus se expandiu por várias regiões do Brasil, acompanhando a expansão do mosquito.⁵⁶

Figura 2 - Casos de dengue e hospitalizações registrados no Brasil entre os anos de 1986 e 2002.



Fonte: SIQUEIRA *et al* (2005)

A dengue caracteriza-se por apresentar maior risco de transmissão em países tropicais, cujas condições ambientais são marcadas por altos índices pluviométricos e temperaturas elevadas, permitindo o desenvolvimento ótimo e a proliferação do mosquito *Aedes aegypti*.¹ De 1986 a 1993, a maior parte dos casos, sendo 76,6% dos 294.419, ocorreram em períodos chuvosos de dezembro à maio, exibindo um padrão sazonal bem definido. Devido aos intervalos ocorridos entre as epidemias, foi possível concluir uma baixa atividade viral nos períodos de estiagem, que acontece entre os meses de julho à novembro.⁵⁵

Segundo Siqueira *et al* (2005), o padrão epidemiológico da dengue no Brasil foi dividido em dois seguimentos, onde o primeiro refere-se às epidemias acontecidas de forma esporádicas em áreas localizadas, nos anos de 1986 e 1993, e o segundo que registra um período de endemias com a circulação do vírus por todo o país, em 1994 e 2002.⁵⁵

O ano 2000 foi marcado pela introdução do DENV-3 no estado do Rio de Janeiro, onde o mesmo foi isolado de pacientes resistentes nos anos anteriores.⁵⁷ Em 2002, esse sorotipo foi responsável por causar a pior epidemia da história, sendo registrados mais de 800 mil casos. Durante seis anos houve uma queda no número de notificações por dengue, porém em 2008 a doença reincide e provoca novos surtos. No mesmo ano, o Ministério da Saúde registrou mais de 700 mil casos, onde aproximadamente 45 mil pessoas foram submetidas à hospitalização, apresentando sérias manifestações clínicas.

⁵⁶A epidemia provocada pelo DENV-3 gerou mudanças no cenário epidemiológico brasileiro, formas mais graves da doença, como a febre hemorrágica do dengue foram notificadas, levando a morte de três crianças; até então esses casos só tinham provocado óbitos em adultos.⁵⁵ Há registros da ocorrência do DENV-4 no estado de Roraima, região norte do Brasil e no Rio de Janeiro, em 2010 e 2011, respectivamente.⁵⁸ De acordo com o Boletim Epidemiológico, gerado pela Secretaria de Vigilância em Saúde, o Brasil, este ano (2015) teve 1.319.957 casos notificados de dengue até a semana epidemiológica 28 (04/01/15 a 18/07/15). Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (849.645 casos; 64,4%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (230.404 casos; 17,5%), Centro-Oeste (160.016 casos; 12,1%), Sul (53.063 casos; 4,0%) e Norte (26.829 casos; 2,0%).

2.3. Aspectos básicos do vetor *Aedes aegypti*

O Aedes aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) muito provavelmente é originário da região afrotropical (Etiópia), onde se encontra a maior parte dos membros deste grupo. Nas Américas e em várias regiões infestadas do mundo, é considerado o principal transmissor da dengue e da febre amarela.⁵⁹

Trata-se de um mosquito classicamente tido como tropical e subtropical, por conseguir se adaptar bem às condições climáticas dessas regiões, no que concerne a períodos úmidos e quentes ao longo de todo ano. Assim sendo, podem ser encontrados entre os paralelos de 45° de latitude norte e 40° de latitude sul, predominando em áreas urbanas e periurbanas.¹ De maneira geral possui um comportamento estritamente antropofílico e sinantrópico, representando o mosquito com mais hábitos domiciliares entre a família dos Culicídeos.⁶⁰

Dependendo da região onde a espécie esteja inserida, o mosquito adulto pode apresentar uma coloração escura com diversas tonalidades de marrom, apresentando listras e manchas brancas distribuídas pelo corpo. Os mosquitos adultos têm a necessidade de manterem-se vivos num período necessário para a propagação e sobrevivência da espécie, no entanto devem adquirir substâncias alimentares energéticas para um bom desempenho dessas funções.¹ Diferentes dos machos, que se alimentam especialmente de substâncias açucaradas, como néctar de flores e outros nectários, as fêmeas apresentam um comportamento hemofágico acentuado. É através do sangue (preferencialmente humano), que esses organismos conseguem um coquetel rico de

aminoácidos para o desenvolvimento dos ovos, tais nutrientes do sangue são convertidos em substâncias proteicas constituintes do vitelo. As fêmeas também podem apresentar hábitos fitófagos, já que necessitam da energia de nutrientes vegetais para o voo.^{1; 59}

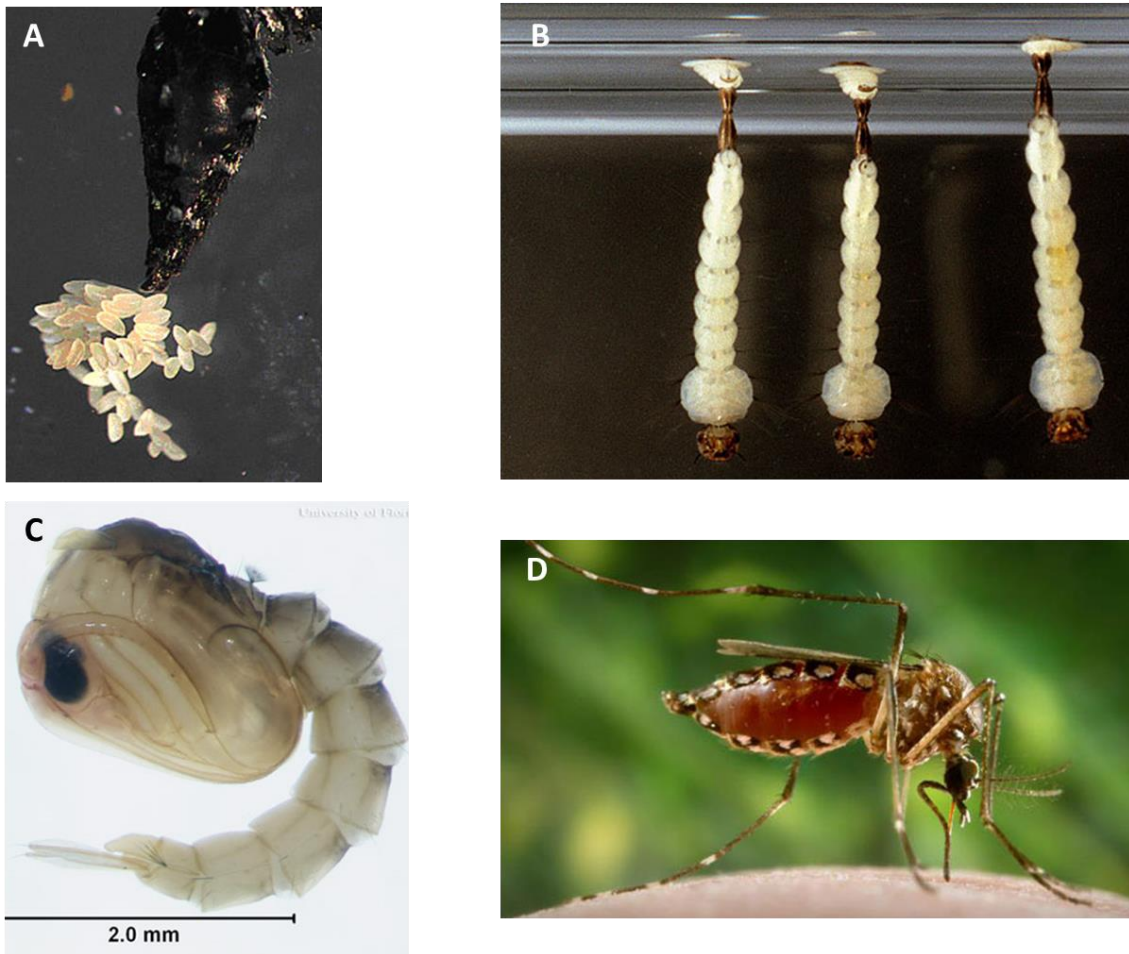
Fêmeas do *Aedes aegypti* costumam depositar seus ovos em recipientes artificiais descartados pelo homem ou em tanques utilizados para o armazenamento de água de uso doméstico, esses reservatórios costumam servir como locais ótimos para desenvolvimento de larvas de mosquitos.⁶¹ Essas coleções aquáticas foram designadas por comunidades epidemiológicas como: “criadouros” (*breeding places*), podendo ser então, pneus, vasos de plantas, pingadeiras, latas, caixas d’água, piscinas, ralos, sucatas, lajes, entulhos de construções, copos plásticos, entre outros.⁶²

A deposição dos ovos por fêmeas do *Ae. aegypti* são realizadas no período diurno, após o repasto sanguíneo, em substratos úmidos próximos à água, as mesmas podem apresentar o potencial de originar cerca de 1.500 indivíduos durante toda vida, colocando em média cerca de 50 a 500 ovos por criadouro.¹

O desenvolvimento desses ovos pode variar de acordo com inúmeros fatores ambientais, tais como: estímulos gerados por temperatura, presença de substâncias no meio líquido (que poderão bloquear ou estimular o desenvolvimento do embrião) e a influência da densidade populacional no criadouro; a permanência das larvas dentro dos ovos também irá depender dessas condições.¹ Após a deposição dos ovos, os quais necessitam estar em contato direto com a linha d’água e na presença de alta umidade para que atinjam o desenvolvimento embrionário completo e iniciem o processo de eclosão das larvas. Contudo, se esses ovos estiverem expostos a condições ambientais adversas, podem se tornar altamente resistentes aos períodos de seca, permanecendo viáveis por até um ano, desde que seja certificado o desenvolvimento completo do embrião.⁶¹

A espécie em questão possui um ciclo de vida relativamente curto, podendo durar de 15 a 30 dias, seu desenvolvimento pós-embrionário acontece através de holometabolia, ou seja, apresenta metamorfose completa. Dessa forma, esses insetos exibem quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (passando por quatro estágios: L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (**Figura 3**).^{1; 63}

Figura 3 - Fases do ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*. A: momento da postura dos ovos, B: larvas, C: pupa e D: adulto.



Fonte: A e B: Vieira G.J., Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. C: Zettel C.M., Universidade da Flórida. D: Gathany J., Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC).

Após a eclosão dos ovos, as larvas irão passar por processos de “muda” que consiste no desprendimento do exoesqueleto de quitina. Na separação da larva com o exoesqueleto, um fluido será produzido para facilitar o rompimento, onde em seguida irá ocorrer aberturas na cápsula encefálica e no tórax permitindo a saída das formas larvais.⁶¹

As larvas de *Ae. aegypti* passam todo o período de sua vida se alimentando de detritos orgânicos, bactérias, leveduras, vitaminas e sais minerais. O desenvolvimento completo ocorre entre 5º e 7º dia após a eclosão dos ovos, podendo variar também de acordo com as condições de temperatura, densidade populacional e a quantidade de suplementação alimentar presente no ambiente. Enquanto a fase larval passa todo o período da vida se alimentando, as pupas não se alimentam, tendo um período de

desenvolvimento relativamente curto, de até dois dias até a emergência do adulto, que é terrestre e tem como principal função sua dispersão e reprodução.⁵⁹

De forma geral, as larvas pertencentes à família Culicidae, costumam adquirir seus alimentos através de filtragem, cujo processo foi designado anteriormente “*filter feeding*”. Estes organismos apresentam um sistema de filtros constituído por escovas situadas ao redor da cavidade oral que se movimentam criando um fluxo que carrega partículas alimentares para o orifício bucal.⁶⁴ Clements *et al* (1992) classificou as partículas utilizadas na alimentação das larvas como sendo: grandes (partículas com diâmetros maiores que 1 mm), finas (partículas com diâmetros menores que 1 mm e maiores que 50µm) e ultrafinas (partículas com diâmetros menores que 50µm e maiores que 0,5 µm).^{1; 65} Nesse sentido, pode-se dizer que a ingestão das larvas pertencentes a essa família é orientada principalmente pelo tamanho/dimensões das partículas presentes no meio.¹

O processo de filtragem é caracterizado pela imobilidade das larvas na superfície (com exceção de suas escovas orais que permanecem em constante movimento), onde a alimentação é adquirida através da remoção de partículas (detritos e microrganismos) suspensas na coluna d’água. Esse hábito alimentar por muito tempo foi considerado de caráter passivo, no entanto sabe-se hoje que a obtenção do alimento é mediada através de correntes aquáticas geradas pelas próprias larvas. Com isto, o termo “*filter feeding*” foi substituído por “*Collecting-filtering*”. Além desta abordagem, as larvas de *Ae. aegypti*, em especial, apresentam outros hábitos de obtenção de alimento, onde estes podem variar de acordo com a disponibilidade de partículas no meio. Em vista disto, alguns destes comportamentos consistem na busca ativa por partículas alimentares depositadas no fundo dos criadouros, tal modo de alimentação levou o nome de “*Collecting-gathering*” ou “coleta ativa do substrato” (**Figura 4**).⁶⁵

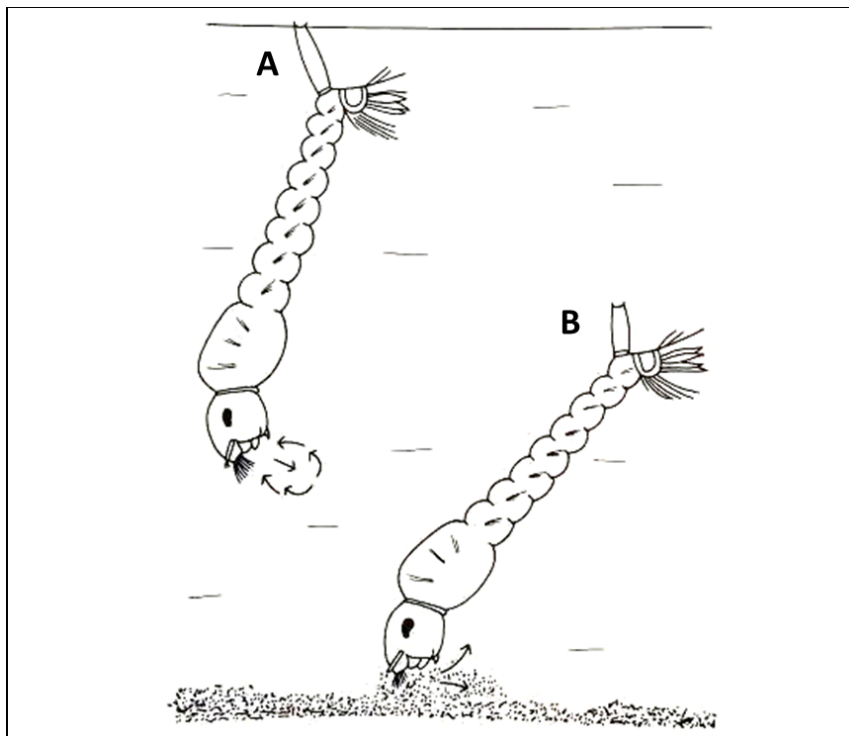
Os modelos de alimentação dos constituintes desta família podem ser muito amplos e variar de acordo com cada espécie. Na literatura, são apresentados outros hábitos além dos dois já citados: “raspagem” (*scraping*), que consiste na obtenção do alimento por remoção de filmes biológicos, “mordedura” (*shredding*),⁶⁶ referente àqueles organismos que retalham e roem pequenos fragmentos de matéria orgânica e “predação”, cujas larvas apresentam hábitos sapróbios, se alimentando de pequenos invertebrados mortos.

A maioria dos Culicídeos utilizam pelo menos dois modos de alimentação ao longo de sua vida, os casos mais conhecidos são os das larvas de *Aedes aegypti*, que

intercalam seu comportamento alimentar entre “*Collecting-filtering*” e “*Collecting-gathering*”, sendo o último o mais comum entre a espécie.^{1: 65; 67}

O estudo dos hábitos alimentares de larvas desses insetos, bem como as dimensões de partículas ingeridas pelas mesmas, é de suma importância para o desenvolvimento de novas técnicas e formulações para o controle desses organismos.

Figura 4 - Dois comportamentos alimentares identificados em larvas de *Aedes aegypti*; A: *Collecting-filtering*: coleta por filtragem e B: *Collecting-gathering*: coleta ativa do substrato.



Fonte: CLEMENTS *et al* (1992)

2.4. Métodos utilizados no controle de larvas do *Aedes aegypti*

Atualmente os métodos de combate aos insetos vetores são baseados na utilização de compostos químicos que possuem alta eficácia, rápida ação e custo acessível, no entanto as desvantagens do uso dessas substâncias ainda são muitas. Podemos citar, os riscos à saúde humana e os impactos ambientais como os principais problemas gerados pela utilização dos mesmos, sem contar os efeitos adversos em organismos não-alvos e a indução de resistência em populações de vetores. Apesar dos riscos supracitados em se utilizar os inseticidas convencionais, não podemos deixar de citá-los como parte

importante no controle integrado de insetos nocivos. Dá-se o nome de “inseticidas” àqueles compostos que são utilizados contra as formas adultas de mosquitos e “larvicidas”, às formas imaturas.¹

No Brasil, por exemplo, o início da “era dos inseticidas químicos” começou na década de 60 com os DDTs (*dicloro-difenil-tricloroetano*), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial. O produto costumava ser aplicado no interior das residências e permaneciam ativos por muitos meses contra, por exemplo, mosquitos do gênero *Aedes*, *Anopheles* e *Lutzomyia*.⁶⁶ Em 1967, com o uso dos organoclorados, as populações de *Aedes aegypti* foram erradicadas do Brasil, tendo sua reintrodução no estado do Pará anos mais tarde. Acredita-se que essa reintrodução, muito provavelmente, teria ocorrido devido a não erradicação do mosquito em países vizinhos. Com o reaparecimento desta espécie em várias regiões do Brasil, o DDT começou a ser utilizado de forma indiscriminada, o que contribuiu com o aparecimento de populações resistentes.⁶⁷

O uso de formulações em pó do DDT aparentemente não apresenta muitos riscos à saúde por não serem absorvidas pela pele, no entanto quando diluídas em óleo, podem apresentar alta toxicidade, acumulando-se nos tecidos. Pesquisas alertam o uso dessas substâncias por apresentarem riscos de desenvolvimento do câncer e de graves problemas ambientais, podendo permanecer no ambiente e nas cadeias alimentares por vários anos. Além disso, há relatos na literatura da presença do DDT no leite materno, sendo então transferido para recém-nascidos. Essa substância pode estar presente também em frutas e vegetais, não sendo eliminada com lavagem.⁶⁸

Em vista disso, o DDT teve seu uso restrito no Brasil em 1985, podendo ser aplicado apenas em surtos e epidemias.⁶⁹ Mais tarde, o composto ganhou um substituto, um inseticida contendo em sua composição fósforo: os organofosforados (OF). O principal representante deste grupo é o temephos (Abate), que é utilizado em águas potáveis no controle das formas larvais do mosquito. No controle dos adultos faz-se uso do malathion (Cheminova Brasil Ltda) e o do fenitrothion (Sumitomo Chemical Brasil Ltda).⁷⁰

Atualmente o uso de OF é direcionado para a agricultura e Saúde Pública, no entanto, como os organoclorados, também apresentam muitas desvantagens como: rápida degradação química, toxicidade elevada em mamíferos e indução de resistência. No entanto, esses compostos apresentam vantagens em comparação ao DDT por serem biodegradáveis, altamente tóxicos para insetos e menos persistentes no ambiente.⁷¹

Compostos alternativos foram então desenvolvidos na tentativa de um controle eficaz e seguro contra vetores, estes pertencem aos grupos dos inseticidas biológicos (bacterianos) e dos reguladores de crescimento de insetos, conhecidos pela sigla RCI. Entre os RCI destacam-se o Altosid (metoprene), Pyriproxyfen, que interferem diretamente na metamorfose de larvas em pupas e adultos, e o Dimilin (difluorbenzofurona), que bloqueia a formação da quitina em cada troca de muda. Apesar de serem relativamente mais seguros que o DDT e os OFs, possuem a desvantagem de atuar também contra artrópodes não-alvo que compartilham o mesmo habitat de larvas do *Aedes aegypti*. O uso de RCI é proibido em locais que possuem um número elevado de artrópodes.^{1;5}

O principal inseticida biológico conhecido hoje é o *Bacillus thuringiensis* (Bt). Trata-se de uma bactéria entomopatogênica, cujos esporos apresentam toxinas de elevado poder inseticida. Os mecanismos de ação do Bt ocorrem quando as larvas ingerem os cristais tóxicos provenientes destes esporos, que serão dissolvidos no intestino alcalino dos organismos (pH= 9-10).⁵⁹ Essas toxinas irão atuar diretamente no epitélio intestinal, promovendo a diminuição dos movimentos peristálticos e resultando na interrupção da alimentação. Os benefícios em se utilizar os Bts no controle de larvas de *Aedes aegypti* é que os mesmos possuem alta seletividade, porém são necessárias reaplicações frequentes.⁷¹ De acordo com Braga *et al* (2007), a utilização desses inseticidas deve ser complementada com outras práticas de combate ao vetor, como por exemplo, a realização de inspeções periódicas aos criadouros, bem como sua remoção mecânica. A seguir, a **Quadro 1**, apresenta um resumo dos principais larvicidas utilizados para o controle de pragas e vetores de grande importância epidemiológica.⁵

Quadro 1 - Compostos e formulações recomendadas pela Organização Mundial da Saúde para o controle de larvas de mosquitos.

<i>Larvicidas</i>	<i>Categoria</i>	<i>Formulação</i>	<i>Ação</i>	<i>Vantagens/Desvantagens</i>
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	Biopesticida	Grânulos dispersíveis em água	Ingestão de toxinas provenientes de bactérias, afetando células epiteliais do trato gastrointestinal	Alta especificidade, não poluente ao meio ambiente / reaplicações frequentes
Diflubenzuron	Reguladores de crescimento de insetos - RCI	Pó molhável	Inibidor da síntese de quitina	Boa atividade residual, alta margem de segurança / afetam organismos não-alvo
Novaluron		Concentrado emulsionável		
Methoprene		Granulado	Atuam sobre o desenvolvimento do inseto, inibindo a emergência do adulto	
Pyriproxyfen				
Chlorpyrifos	Organofosforados	Concentrado emulsionável	Inibição da Acetilcolinesterase (AChE), envolvida na regulação da transmissão nervosa	Ação rápida, baixo custo, biodegradável, não acumulam nos tecidos / poluição ambiental, riscos à saúde humana, indução de resistência, instabilidade química
Fenthion				

Fonte: DI MARTINO *et al* (2012)

3. INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

3.1. Princípios básicos da inativação fotodinâmica e fotossensibilizadores

A terapia fotodinâmica (TFD) (ou em inglês *Photodynamic Therapy* - PDT), é uma modalidade terapêutica muito utilizada no tratamento de tumores cutâneos do tipo não-melanoma.^{72; 73} Além do tratamento de lesões tumorais, a TFD possui um amplo espectro de aplicações na área da saúde e na área ambiental, envolvendo tratamentos estéticos, antimicrobianos (inativação de fungos, bactérias e vírus), tratamento de doenças não-oncológicas, desinfecção de água, controle de vetores e pragas, eliminação de agentes patogênicos de origem alimentar, entre muitas outras aplicações.³² Na literatura, são muitos os termos utilizados na descrição da TFD, no entanto quando a mesma está voltada para o controle de organismos ou microrganismos transmissores de doenças o melhor termo seria *Inativação Fotodinâmica* (IFD), como é o caso deste trabalho.⁷²

A IFD é uma técnica que emprega a combinação de uma fonte de luz visível (com comprimento de onda específico), um composto químico intermediário, conhecido como fotossensibilizador (FS) e um agente oxidante (oxigênio molecular), para a destruição de um alvo biológico.²³ Quando um FS absorve um fóton de luz, a molécula passa do estado singlete fundamental (S_0) para um estado excitado singlete (S_n), podendo então retornar ao seu estado inicial emitindo fluorescência, que pode ser utilizada para o diagnóstico, ou passar para o estado tripleto (T_1), de menor energia, através do cruzamento intersistema (ISC). Como o tempo de vida do estado tripleto é relativamente longo (10^{-3} a 10 segundos), o fotossensibilizador poderá interagir com moléculas vizinhas através de duas reações: *reação tipo I e reação tipo II*.^{23; 72}

A reação do tipo I acontece quando o FS excitado interage com as moléculas vizinhas, preferencialmente com O_2 , removendo hidrogênio do substrato biológico (fosfolípidos, colesterol, proteínas) ou através de transferência direta de elétrons, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS ou ROS, do inglês *reactive oxygen species*) na forma de radicais livres, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxilas (OH). Essas EROS são capazes de oxidar vários alvos biológicos, levando a destruição de tecidos vivos.^{74; 75}

Nas reações do tipo II, o FS (no estado tripleto) irá reagir com o oxigênio molecular, cujo estado fundamental também é o tripleto (3O_2), transformando-o em

oxigênio singleto excitado ($^1\text{O}_2$), altamente oxidante. O oxigênio singleto poderá causar então danos irreversíveis em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Os dois tipos de reações podem ocorrer concomitantemente, no entanto o tipo II é muitas vezes predominante com a utilização de FSs derivados de hematoporfirina (HP).⁷⁶

A IFD é caracterizada pelo acúmulo de um FS no interior de um organismo/microrganismo alvo, onde posteriormente o composto será ativado por pequenas doses de luz visível num comprimento de onda específico, ocasionando reações fotoquímicas. Como já dito, é a partir destas reações que irá ocorrer trocas de energia entre as moléculas de oxigênio, ocorrendo formas tóxicas que serão capazes de oxidar substratos biológicos e conseqüentemente, levar a morte do organismo em questão. Para cada tipo de aplicação da TFD/IFD parâmetros como, tempo de incubação, a espécie química do FS e o tempo de exposição à luz precisam ser muito bem avaliados.

As primeiras observações dos efeitos fotodinâmicos vieram de Oscar Raab e Herman von Tappeiner no século XX em Munique, os quais relataram a morte de um protozoário (*Paramecium caudatum*) após exposição à luz na presença de um corante, a acridina, sendo o mesmo inofensivo quando as amostras eram deixadas no escuro. A modificação do corante pela incidência de luz permitiu então a identificação de um “fotossensibilizador”. Anos mais tarde, os pesquisadores avaliaram estes efeitos e conseguiram ampliar os conhecimentos a respeito da técnica, tendo como relato importante à necessidade do envolvimento de oxigênio para que as reações fotodinâmicas ocorressem. Subseqüentemente, relataram suas experiências utilizando TFD no tratamento de tumores cutâneos e dermatoses (*lúpus vulgaris*) com a aplicação da eosina como FS e luz artificial.^{77; 78}

Com a descoberta de um amplo espectro de FSs, cada qual com uma característica química específica e capacidade de se ligar a uma variedade de moléculas e substratos, permitiram a expansão da TFD tanto em áreas clínicas como não clínicas, podemos citar, por exemplo, a utilização desses compostos na área da microbiologia. Em estudos de inativação bacteriana, descobriu-se que um FS catiônico poderia eliminar bactérias Gram-negativas, dispensando a utilização de agentes permeabilizantes.^{79; 80}

O tipo de FS que será utilizado para o controle desses microrganismos irá depender da característica estrutural das paredes celulares bacterianas, bactérias Gram-positivas, por exemplo, possuem em sua constituição ácidos lipoteicóicos e teicóicos organizados em camadas de peptidoglicano que conferem certa porosidade, então

facilitam a entrada do FS nessas células. Em contrapartida, bactérias Gram-negativas, possuem estruturas que impedem a entrada de antimicrobianos na célula, criando uma barreira impermeável e dificultando a ação destas substâncias. Um FS que apresente cargas positivas poderá ancorar-se nas paredes bacterianas através de interações eletrostáticas, permitindo melhor internalização.^{23; 81}

Hoje, sabemos que os FSs foram divididos em três categorias, sendo os de primeira geração, incluindo as porfirinas e seus derivados, os de segunda geração, sendo os derivados de clorinas, ftalocianinas e corantes e os de terceira geração, que são os FSs associados à conjugados. A primeira geração de FSs envolvem principalmente os derivados de hematoporfirina (do inglês, *hematoporphyrin derivative*), entre os quais podemos citar o Photofrin[®], de origem americana, Photosan[®], de origem alemã e o Photogem[®], de origem russa. Esses compostos são diferenciados de acordo com sua estrutura, podendo ser uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros, apresentando até oito unidades com ligações do tipo éter e éster. Os FSs de primeira geração são obtidos através da tecnologia original de desfibrilação do sangue de animais e humanos, a partir da protoporfirina IX (HpIX) existente na circulação sanguínea. Em particular, o Photogem[®] e o Photofrin[®] são semelhantes quanto às suas características químicas, físicas e diagnósticas e apresentam uma banda de absorção intensa na região do 400 nm – Banda de Soret.^{77; 82; 83}

Com relação à segunda geração de FSs podemos citar compostos estruturalmente semelhantes às porfirinas, divididos em diferentes classes: ftalocianinas e naftalocianinas, b) clorinas e bacterioclorinas, c) purpurinas e corantes tais como acridinas, eosinas, curcuminas e outros. Dentro das clorinas, os FSs disponíveis atualmente são: Photoditazine, Apoptosin, Photolon, Verteporfin, Foscan ou Temoporfin, MACE, Radachlorin e Purlytin. A terceira geração de FSs consiste na vetorização desses compostos, permitindo maior seletividade ao antígeno presente em células tumorais ou a microrganismos alvos. Esses métodos de vetorização consistem no emprego de nanopartículas e/ou microesferas em proteínas específicas ou anticorpos monoclonais.^{84; 85}

A seletividade e distribuição dos FSs nas células podem variar muito de acordo com vários fatores, tais como os mecanismos de entrada e saída do composto da célula, o comportamento químico do FS, sendo estes hidrofílicos, anfifílicos (no caso do Photogem[®] empregado neste estudo), hidrofóbicos (como o caso da cúrcuma) e quanto ao tipo e número de cargas envolvidas, podendo ser aniônicas, catiônicas ou neutras. A

localização desses FSs no interior das células ou em superfícies celulares pode nos dizer também a respeito do tipo de morte celular que irá ser gerada (apoptose ou necrose).^{77; 84; 86}

Dentro desta temática, vale ressaltar a importância de um FS possuir afinidades com meios hidrofóbicos, a fim de apresentar boa permeabilidade na membrana plasmática. Portanto, moléculas anfifílicas, cuja polaridade possa ser alterada através da engenharia molecular são bons candidatos à aplicação da TFD/IFD.⁸⁶

Outras propriedades também podem ser levadas em consideração para que esses FSs atuem como bons agentes terapêuticos, tais características consistem em: alta solubilidade (preferencialmente em água), ter um alvo celular conhecido, apresentar facilidade para transporte ativo ou passivo, ter alto rendimento quântico nos estados tripleto e singleto (para a produção de oxigênio singleto), não ser tóxico em pequenas concentrações, não causar efeitos mutagênicos e carcinogênicos, ser metabolizado rapidamente minimizando efeitos colaterais, facilidade de obtenção em escala industrial e apresentar um baixo custo de síntese.^{77; 85}

3.2. Photogem[®] e cúrcuma

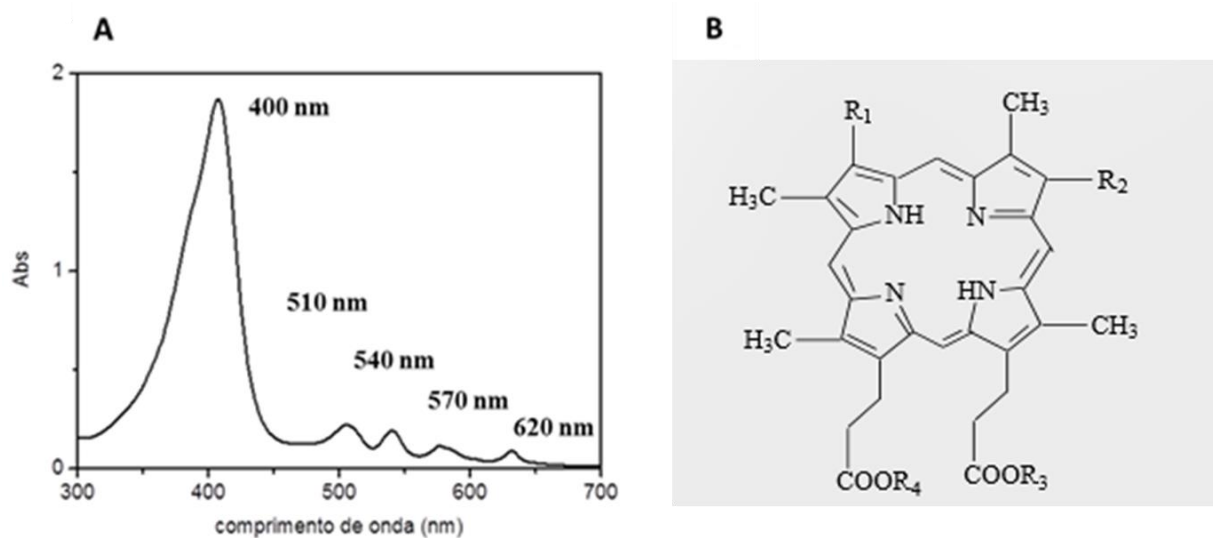
O Photogem[®] (Photogem, Moscou, Rússia) é um composto muito conhecido em Terapia Fotodinâmica para o tratamento do câncer (exibindo propriedades favoráveis, tais como se acumular em tecidos tumorais) e inativação microbiana, apresentando relatos em *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* (encontrados na dentina cariada), *Candida albicans*, *Candida glabrata* (causadores da candidíase e resistentes ao antifúngico fluconazol), *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton Mentagrophytes* (um dos principais microrganismos encontrado em onicomicoses).⁸⁷ O mesmo apresenta-se na forma de um pó violeta e é distribuído através de frascos esterilizados contendo 200g do composto. O mesmo pode ser armazenado por até dois anos desde que sejam protegidos da luz e estocados a uma temperatura de 2 a 8°C.^{88; 89; 90; 91}

O Photogem[®] é um derivado de hematoporfirina (composto isolado da hemoglobina), e pode apresentar em sua estrutura uma mistura de dímeros, monômeros e oligômeros, tendo sua fórmula genérica representada por $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$ e peso molecular de 598 g/mol (monômero) a 2920 g/mol (oligômeros). Assim como os FSs de primeira geração, o Photogem[®] apresenta um espectro de absorção com uma banda característica (banda de Soret) com máximo de absorção em torno de 400 nm e outras

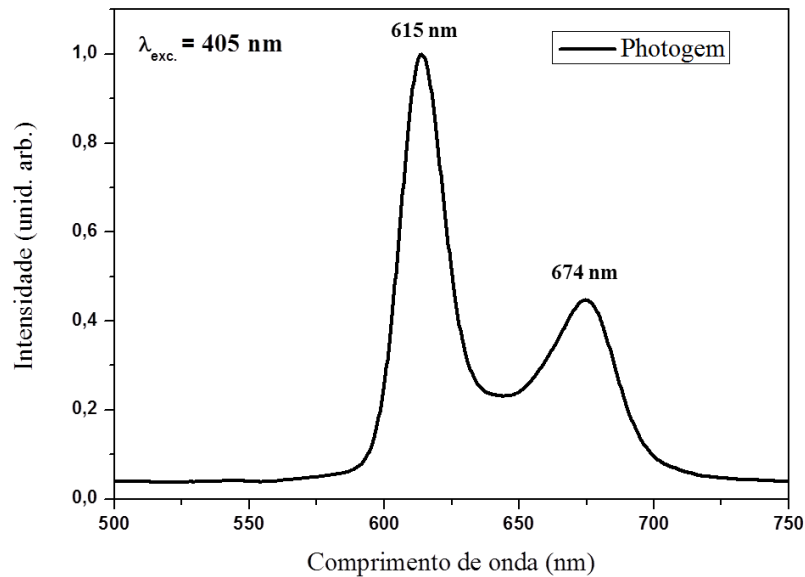
quatro bandas menores, denominadas “bandas-Q”, com máximos em torno de 510, 540, 570 e 620 nm (**Figura 5**). O espectro de fluorescência do Photogem[®] é caracterizado por apresentar duas bandas de emissão de fluorescência, uma em 611 nm, com intensa emissão e outra em 672 nm (**Figura 6**).^{83; 91}

Nos últimos anos, as propriedades de FSs derivados de hematóporfirinas, como o Photogem[®], têm apresentando grande relevância em aplicações envolvendo sistemas biológicos. Além de serem totalmente desprovidos de toxicidade na ausência de luz, apresentam características importantes como a capacidade de absorver quase todos os comprimentos de onda do espectro solar (UV e visível), bom rendimento quântico na produção de oxigênio singlete.³⁴

Figura 5 - A: Espectro de absorção óptica do fotossensibilizador Photogem[®], B: Estrutura monomérica do Photogem[®].



Fonte: A: SOUZA (2015), B: TOMINAGA (2011)

Figura 6 - Espectro de fluorescência do fotossensibilizador Photogem®.

Fonte: SOUZA (2015)

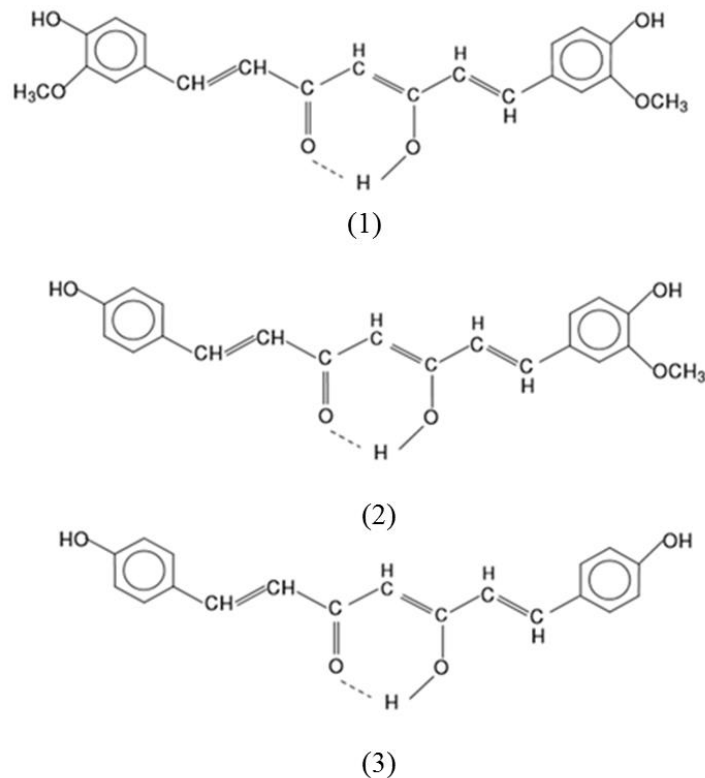
A cúrcuma, por sua vez, é um FS natural derivado do rizoma do Açafreão-da-Índia (*Curcuma longa* Linn). Na Ásia é considerada uma especiaria de cor amarela muito utilizada como aditivo alimentar, medicamento popular, conservante de alimentos e corante têxtil. Nessa região, seu uso é muito tradicional na área da medicina por possuir propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, quimiopreventivas e quimioterápicas. Essas propriedades foram demonstradas ao longo dos anos com ensaios em cultivos celulares e em modelos animais, abrindo caminhos para experimentações em humanos.^{92; 93} Na literatura há relatos do seu uso na inativação de cepas metilina resistentes de *Staphylococcus aureus*, em espécies de fungo *Candida*, (causador da candidíase), em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, na investigação da atividade antibacteriana da *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Um trabalho recente apresentou também os efeitos fotodinâmicos da cúrcuma em *Acanthamoeba polyphaga* (protozoário).^{89; 94; 95; 96; 97}

A *Curcuma longa* é muito conhecida por ser uma planta da família do gengibre (*Zingiberaceae*) e por ser facilmente cultivada, não exigindo tratamentos culturais específicos, podendo se desenvolver bem em regiões tropicais (com altitudes que variam de 1500 metros acima do nível do mar, sob condições de temperatura de 20 a 30°C). No Brasil, a cúrcuma se adaptou bem, sendo cultivada principalmente em regiões como São Paulo,

Mato Grosso e Goiás, tendo uma produtividade nacional variando em torno de 12ton/ha. No entanto, pode-se melhorar esse rendimento com estratégias de adubação que envolve a aplicação de fósforo, nitrogênio e potássio (NPK). Pesquisas realizadas pela Universidade Federal de Lavras mostraram que é possível se obter 25ton/ha, utilizando métodos específicos de cultivo.⁹⁸

A curcumina, um dos pigmentos curcuminóides, foi isolada pela primeira vez em 1842 por Vogel e sua estrutura foi caracterizada por Lampe e Milobedeska em 1910. A composição química dos rizomas de cúrcuma pode variar de acordo com o tipo de solo em que a planta está inserida, que muitas vezes é influenciada pelo clima, adubação, disponibilidade hídrica, época de colheita e tempo de armazenamento.⁹⁹ Os principais ingredientes farmacologicamente importantes isolados dos rizomas e folhas de *C. longa* são divididos em dois grupos: os pigmentos curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina) e os óleos essenciais. Os pigmentos curcuminóides possuem estruturas semelhantes, sendo que a curcumina apresenta dois grupos metoxila, a demetoxicurcumina apresenta um e a bis-demetoxicurcumina é desprovido de grupos metoxila (**Figura 7**). A concentração desses pigmentos nos extratos de cúrcuma podem variar de 4 a 6 mg por 100g para curcumina, 4 a 3 para demetoxicurcumina e de 3 a 2 para a bis-demetoxicurcumina. Os óleos essenciais no rizoma da cúrcuma variam de 2,5 à 7% e apresentam os principais compostos em sua constituição: α -felandreno, β -felandreno, limoneno, linalol, ar-turmerond, zingibereno, borneol e cineol.^{100; 101; 102}

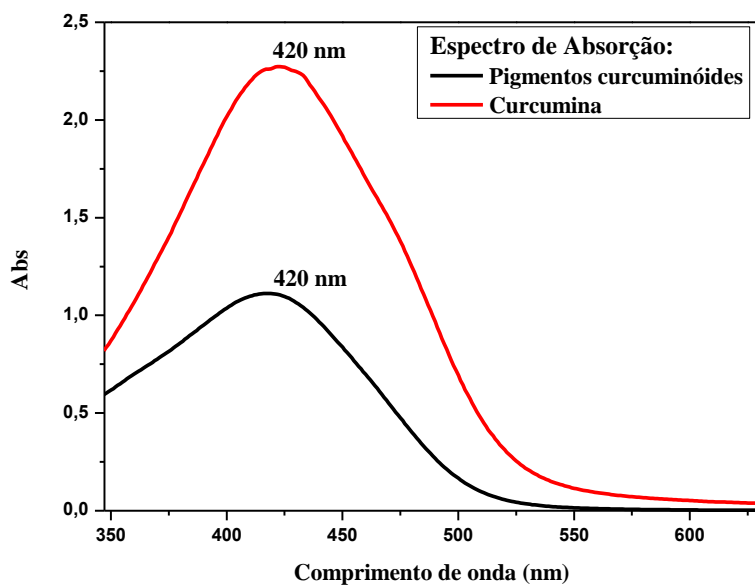
Figura 7 - Estruturas químicas dos curcuminóides isolados do extrato de *Curcumina. longa* disponível comercialmente: 1: curcumina, 2: demetoxicurcumina e 3: bis-demetoxicurcumina.



Fonte: ALMEIDA (2006)

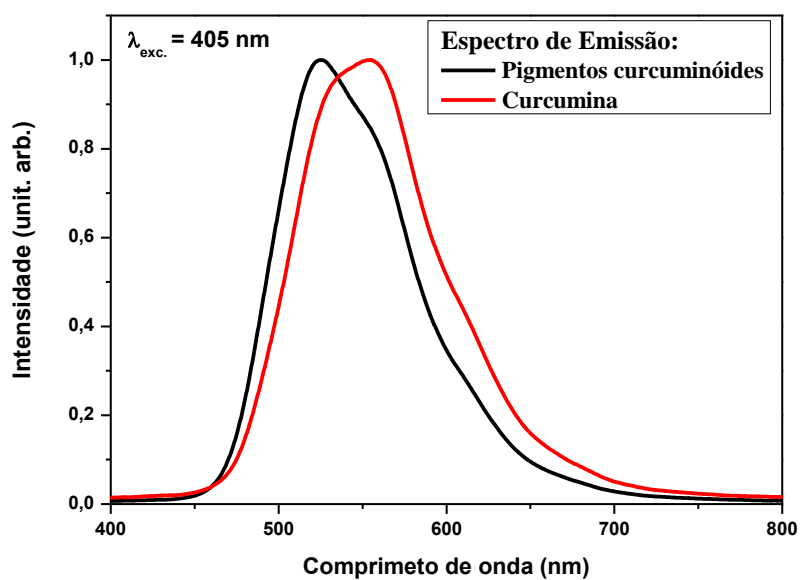
A cúrcuma (mistura de pigmentos curcuminóides ou a curcumina) apresenta um pico máximo de absorção em torno de 420 nm (**Figura 8**), e uma emissão de fluorescência em torno 520 e 550 nm (**Figura 9**), dependendo do meio em que estiverem essas bandas de absorção e fluorescência podem mudar. É um composto considerado hidrofóbico, insolúvel em água, podendo sofrer rápida degradação em várias condições. O avanço da aplicação da curcumina tem sofrido vários desafios devido a sua instabilidade, principalmente em pH neutros e básicos e pela baixa solubilidade apresentada em água. Com isto, pesquisas têm sido desenvolvidas para encontrar a melhor forma de diluição da curcumina em solução aquosa com solubilidade e estabilidade aceitáveis.^{103; 104}

Figura 8 - Espectro de absorção da curcumina e da mistura de pigmentos curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina).



Fonte: SOUZA (2015)

Figura 9 - Espectro de fluorescência da curcumina e da mistura de pigmentos curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina).



Fonte: SOUZA (2015)

4. HISTÓRICO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM INSETOS VETORES

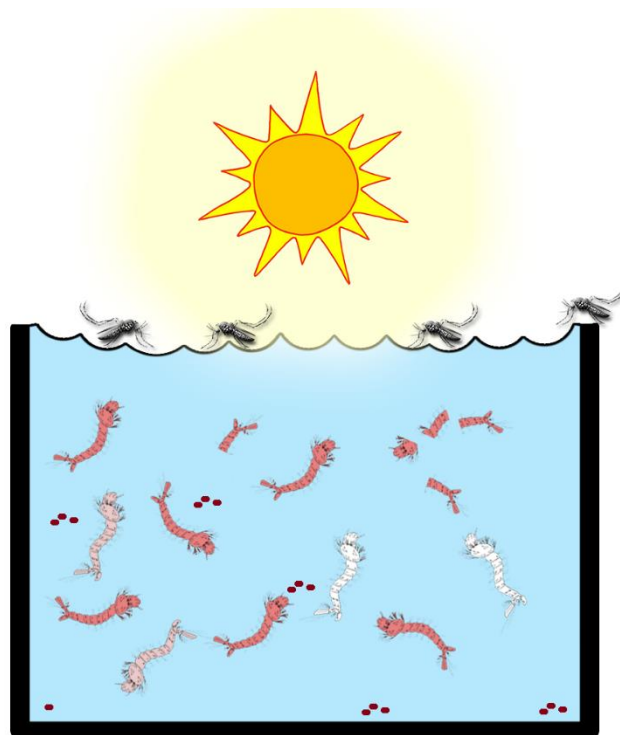
Tendo em vista os problemas gerados pela utilização indiscriminada dos inseticidas convencionais, ocorreu a necessidade do desenvolvimento de novas formulações ou estratégias que fossem mais seguras, tanto para o homem, quanto para o meio ambiente. Os problemas ainda ultrapassam as questões de segurança, novas formulações ou técnicas precisariam ser viáveis economicamente para suprir as necessidades de várias regiões afetadas por doenças vetoriais.³²

A ideia em se utilizar FSs como fotoinseticidas não é nova, muito provavelmente teria partido de um estudo realizado por Barbieri em 1928, que investigou os efeitos de substâncias fotossensíveis, como os derivados de xanteno, para a eliminação de larvas do gênero *Anopheles* e *Aedes*.¹⁰⁵ Na década de 80, alguns pesquisadores como Jori e Ben Amor retomaram as pesquisas nesta área, sendo os pioneiros a utilizar derivados de porfirinas como fotoinseticidas para o controle de insetos.³⁴ O caráter anfifílico dessas moléculas pode explicar o sucesso dos resultados obtidos nestes estudos, uma vez que se ligam facilmente às membranas, permitindo sua ação dentro das células.¹⁰⁶ Além dos derivados de porfirinas, como a clorofila, clorofilina e o feoforbideo, outros compostos sintéticos e naturais (xantenos, tiofenos, fenotiazinas, acridinas, furocumarinas) relataram ser bem sucedidos contra uma variedade de insetos nocivos, incluindo algumas espécies de moscas.⁸⁶ Essas moléculas possuem vantagens sobre os inseticidas atuais, por serem altamente eficazes, seguros e por não apresentarem ações mutagênicas, além de serem rapidamente degradados à medida que são expostos à luz.³⁴

De acordo com Alves *et al* (2014), os estudos encontrados na literatura que envolvem reações fotodinâmicas no controle de insetos ou pragas são realizados da seguinte maneira: a) as larvas são colocadas em contato com o FS na sua forma pura ou associado a outros compostos que irão potencializar a sua internalização, b) após a aplicação do FS nos criadouros (condições de campo) ou nas bandejas de criação (laboratório) é necessário um período de incubação no escuro para que as larvas possam ingerir e acumular uma taxa conveniente do FS no seu canal alimentar, c) as amostras são então irradiadas com fontes de luz, tanto natural (solar) como artificial (lâmpadas e outras), calculando por fim a porcentagem de mortalidade larval ou, em alguns casos, a dose de FS letal mediana (LC50), ou seja, a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50% das larvas (**Figura 10**).³² Alguns trabalhos também

costumam analisar o local anatômico que esses FSs ficam preferencialmente acumulados, a quantidade de FS que foi absorvido pelo organismo e o tempo de permanência no canal alimentar até serem liberados por excreção.^{31; 106; 107}

Figura 10 - Ilustração esquemática da aplicação de IFD em insetos transmissores de doenças. Os recipientes contendo larvas recebem o FS (pontos vermelhos) que posteriormente é ingerido por esses organismos (larvas em vermelho). Após a ingestão do FS, as larvas são irradiadas com luz solar ou luz artificial para que ocorra o início das reações fotodinâmicas, induzindo desta forma a mortalidade larval.



Fonte: SOUZA (2015)

Até hoje, o papel dessas substâncias (FSs), têm sido investigado como potenciais sucessores de inseticidas convencionais, para o controle integrado e sustentável de pragas, que induzem danos significativos às culturas agrícolas, e para o combate de mosquitos vetores, como o *Aedes* (dengue, febre amarela, chikungunya), *Anopheles* (malária), *Culex* (febre amarela).³²

Karunaratne *et al* (2004) investigou os efeitos fotodinâmicos de dois derivados de porfirinas (protoporfirina dimetil-éster, hematoporfirina dimetil-éster) contra o segundo estágio de larvas do *Aedes aegypti*.¹⁸ Em condições de laboratório, as larvas foram

colocadas em contato com as soluções de FSs e em seguidas expostas à luz solar difusa. Nas duas condições foi possível observar efeitos fotodinâmicos potentes contra esses organismos, obtendo-se mortalidade de 90% e 85% em 24 horas de iluminação, utilizando hematoporfirina dimetil-éster e protoporfirina dimetil-éster, respectivamente. Em contrapartida, larvas de estágios avançados por apresentarem cutícula corporal mais espessa, apresentaram menor susceptibilidade à ação desses FSs, mostrando que essa condição e a cor do tegumento do inseto podem interferir nos resultados de inativação fotodinâmica.¹⁸

A mortalidade larval induzida por luz na presença de FSs também foi avaliada em larvas de quarto estágio do *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* por Dondji *et al* (2005).¹⁷ Os FSs utilizados foram: o xanteno (rosa bengala), clorina (e6) e também derivados de porfirinas como cloroquinolina, tetrafenil propioamido porfirina, tetrafenil porfirina tetrasulfato e hematoporfirina (HP). A fotoexcitação dos FSs foi realizada através de duas lâmpadas de tungstênio (500W) e as amostras foram distribuídas uniformemente à uma distância de 30 cm da fonte de luz. Os resultados preliminares mostraram melhor efeito fotodinâmico induzido pelo corante rosa bengala nas três espécies estudadas e em comparação aos demais FSs foi o que apresentou maior efeito letal em baixas concentrações. Em larvas de *Aedes aegypti* o único FS eficaz entre os derivados de porfirina foi a hematoporfirina (HP). Em 72 horas de exposição à luz, foi observada uma mortalidade de 100%, 80% e 70% correspondente aos FSs rosa bengala, hematoporfirina e clorina e6.¹⁷

Lucantoni *et al* (2011) estudou uma porfirina catiônica denominada C14 como um agente fotossensibilizador contra larvas de *Aedes aegypti*.⁸⁶ Além de mostrar o potencial fotolarvicida desta molécula, o trabalho trouxe uma nova abordagem para a aplicação do FS. O autor supracitado utilizou rações de roedores (alimentos que são comumente utilizados na alimentação de larvas criadas em laboratório) associadas à porfirina C14 para promover uma internalização rápida e seletiva dessa formulação pelos organismos.

Inicialmente as rações foram trituradas e peneiradas apresentando partículas com diâmetros entre 50-500 µm e a seguir foram incubadas em soluções de porfirina C14 à uma concentração de 5 µM. Após uma pré - incubação das larvas com a formulação, as amostras foram iluminadas com lâmpadas fluorescentes com emissão entre 400-800 nm e com fluência variando de 1,0 a 4,0 mW/cm², dependendo da região analisada. Essas condições apresentaram alta eficiência na fotoinativação desses organismos, levando a uma mortalidade de 92%, após um período de 3 horas de iluminação.⁸⁶

Ao longo dos anos outros compostos, também conhecidos na literatura como FSs, apresentando relevância em outras áreas de aplicação, foram estudados contra larvas de mosquito, como a cúrcuma. No entanto, até o momento essa substância foi apresentada unicamente como um larvicida, não havendo uma discussão clara a respeito do envolvimento da luz na mortalidade desses organismos.

Sagnou *et al* (2012) estudou os três pigmentos curcuminóides isolados a partir da *Curcuma longa*: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina. Esses compostos foram extraídos e separados de um extrato de açafrão disponível comercialmente. Os efeitos larvicidas destas substâncias foram testadas contra larvas do *Culex pippiens* e os resultados exibiram alta atividade larvicida com valores de LC50 de 19,07 mg/L e LC90 de 61,63 mg/L em larvas tratadas com a curcumina. Os outros pigmentos curcuminóides não foram tão eficientes, apresentando valores de LC50 superior a 150 mg/L.¹⁰⁸

Os óleos essenciais de *C. longa* também foram avaliados como possíveis larvicidas por Kalaivani *et al* (2012), em larvas de *Aede aegypti*, apresentando valores de LC50 e LC90 de 115,6 e 193,3 ppm, respectivamente. As larvas de primeiros estágios foram mais susceptíveis à ação dos óleos essenciais que os últimos estágios e pupas tratadas.¹⁰⁹

Além dos derivados naturais extraídos diretamente da raiz do açafrão-da-terra, Anstrom *et al* (2012) testou análogos sintéticos de curcumina contra larvas de *Aedes aegypti* no quarto estágio de vida. Em condições de laboratório, as larvas foram mantidas em soluções de curcumina com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, até que se atingisse mortalidade relevante. Os resultados mostraram LC50 entre 17 e 28 μ M, comprovando a eficácia dessas substâncias como larvicidas. Outro ponto importante levantado pelo autor neste estudo foi que esses insetos não apresentam uma via enzimática de síntese do colesterol, no entanto o organismo precisa obter esse ingrediente vital diretamente da sua dieta alimentar. O colesterol por ser uma molécula altamente hidrofóbica, sua absorção no intestino médio requer o auxílio de uma proteína de transporte. Com base nisto, muitos inseticidas têm como mecanismo de ação inibir o transporte de colesterol que é mediado por essas proteínas. Assim, alguns análogos de curcumina foram testados com a finalidade de avaliar sua habilidade de inibir a absorção do colesterol, porém ficou constatado que este não é unicamente o principal motivo da toxicidade desses compostos em larvas de mosquitos, outros mecanismos também resultam em mortalidade larval. Os análogos de curcumina são moléculas

fáceis de serem sintetizadas e podem apresentar uma grande variedade química, sendo uma fonte para futuros larvicidas.¹¹⁰

Os pigmentos curcuminóides e óleos essenciais da cúrcuma, além de serem larvicidas naturais, apresentam uma série de atividades contra insetos, como por exemplo, podem atuar como repelentes no momento da oviposição de fêmeas, uma vez que essas substâncias estejam inseridas nos criadouros, possuem elevada ação ovicida, impedindo a eclosão dos ovos, e também auxiliam na redução do inchaço e de reações alérgicas provocadas pela picada desses organismos.^{110; 111; 112; 113}

5. OBJETIVOS

Avaliar a mortalidade provocada por duas diferentes classes de fotossensibilizadores (Photogem[®] e cúrcuma) em larvas de *Aedes aegypti*, em diferentes condições de entrega do fotossensibilizador e de iluminação.

Acompanhar a fotodegradação do Photogem[®] e da cúrcuma expostos a duas fontes distintas de luz (lâmpada fluorescente e luz solar) através da análise de espectros de absorção óptica.

Investigar o local de acumulação/atução dos fotossensibilizadores, através de imagens de fluorescência por meio da microscopia confocal.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Criação e manutenção das larvas

Neste estudo foram utilizadas cartelas com ovos do *Aedes aegypti* provenientes do laboratório Bioagri (Mérieux NutriSciences, Charqueada-SP, Brasil). Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos (USP) em parceria com o Departamento de Hidráulica e Saneamento da Universidade de São Paulo (EESC).

As desovas do *Aedes aegypti* foram mantidas em bandejas plásticas contendo 4 litros de água e fotoperíodo de 12 horas. Após a eclosão das larvas pode-se observar a passagem de instar (estágio de vida) a cada dois dias, onde se retirava o exoesqueleto de quitina (exúvias) e anotavam-se as ecdises. As larvas foram alimentadas diariamente com ração AlconBASIC[®] MEP 200 Complex (Alcon, Santa Catarina, Brasil) até que atingissem o 2^o ou 3^o estágio de desenvolvimento, quando então eram transferidas para recipientes plásticos menores (volume máximo de 50 mL) para os ensaios de inativação fotodinâmica.

6.2. Fotossensibilizadores

Duas classes de FSs foram empregadas neste trabalho: um derivado de hemaporfirina (Photogem[®]) e a cúrcuma. O primeiro estudo de inativação fotodinâmica foi realizado com o FS Photogem[®], adquirido através da empresa Photogem (Moscou, Rússia) e aprovado pelo *Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation*. Soluções estoque de 5 mg/mL (p/v) foram preparadas em água destilada e estocadas a 4^o C até o momento da sua utilização.

No estudo com a cúrcuma, utilizaram-se três variações moleculares deste composto: 1) mistura de pigmentos curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina), que neste trabalho foi designada como cúrcuma natural (CN) 2) curcumina (C) e 3) uma mistura sólida de curcumina com sacarose (CS). A cúrcuma natural proveniente da empresa PDTPharma Ltda., Cravinhos-SP, Brasil, consiste em uma mistura de curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina) e apresenta em sua composição 53,4% de curcumina e 46,6% dos curcuminóides demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina. A curcumina foi

sintetizada pelo Laboratório de Química Bio-orgânica (Departamento de Química) da Universidade Federal de São Carlos e possui em sua composição 100% deste pigmento curcuminóide. As três variações moleculares de cúrcuma foram obtidas na forma de um pó amarelado (curcumina e curcumina em sacarose) e avermelhado (cúrcuma natural), cuja solubilidade é alcançada com a utilização de solventes orgânicos como o DMSO (dimetilsulfóxido) e o etanol. Na tentativa de minimizar os efeitos tóxicos provocados por solventes orgânicos e de melhorar as características de solubilidade da curcumina em água, incorporou-se o insumo em sacarose obtendo-se a terceira variação molecular de cúrcuma. Essa nova formulação foi cedida pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, também do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. As três variações de cúrcuma partiram de soluções estoques na concentração de 1,5 mg/mL (p/v), onde diluiu-se o pó amarelado na mistura de álcool (99,9%) e DMSO (0,1%), com exceção da curcumina em sacarose (CS) que foi diluída diretamente em água destilada. Após o preparo das soluções estoque, as mesmas foram levadas para ultrassom com temperatura a 60° C, por aproximadamente 30 minutos, com o intuito de se obter melhor solubilidade dessas substâncias. Na realização dos ensaios, as soluções estoques foram diluídas em recipientes com larvas, contendo 30 mL de água decolorada, obtendo-se desta forma as concentrações utilizadas nos estudos de IFD (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Fotossensibilizadores utilizados no estudo de inativação fotodinâmica e suas respectivas concentrações.

<i>Fotossensibilizadores</i>	<i>Concentrações (µg/mL)</i>
Photogem [®]	10; 20; 40; 60; 80
Cúrcuma natural (CN)	5; 10; 15; 20; 25
Curcumina (C)	5; 10; 15; 20; 25
Mistura curcumina + Sacarose (CS)	5; 10; 15; 20; 25

6.3. Fontes de luz

Para a realização da IFD em larvas do *Aedes aegypti* foram utilizadas duas fontes de iluminação, uma artificial e outra natural. A iluminação natural aconteceu nas áreas externas do Instituto de Física de São Carlos (USP, São Carlos, SP, Brasil), onde os recipientes plásticos (transparentes) foram distribuídos de forma a receberem luz solar constantemente. Já os experimentos utilizando iluminação artificial, utilizamos

lâmpadas tubulares fluorescentes da Sylvania (18 W). Os espectros de irradiância, tanto da lâmpada como do Sol foram obtidos através de espectroradiômetro calibrado Ocean Optics USB 2000 UV-VIS (Ocean Optics, USA), cujos espectros estão apresentados na **Figura 11** e na **Figura 12**. As medidas de irradiância na luz solar foram realizadas em quatro horários diferentes ao longo do dia (09h40, 10h10, 12h40 e 17h40), sendo a fibra do radiômetro posicionada a 90° da superfície terrestre.

Figura 11 - Espectro de irradiância da lâmpada fluorescente (Sylvania – 18 W).

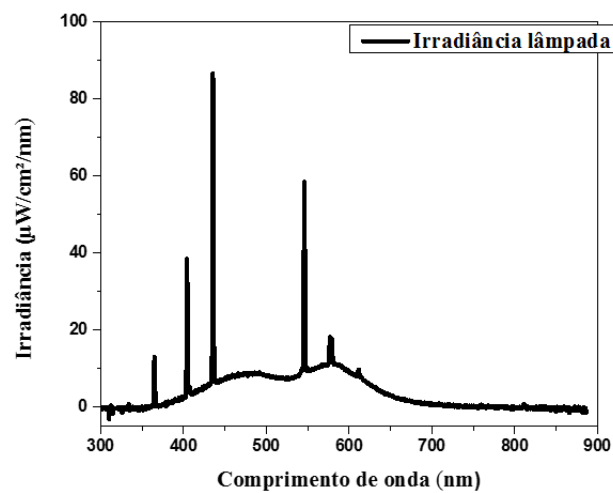
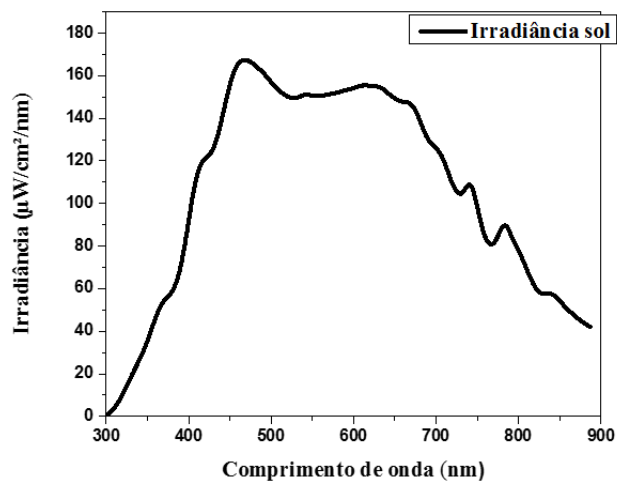


Figura 12 - Espectro de irradiância da luz solar em uma das condições experimentais.



6.4. Primeira etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: fotossensibilizadores aplicados diretamente em meio aquoso

Os estudos de mortalidade deste trabalho foram divididos em duas etapas, empregando-se duas abordagens para a aplicação dos FSs nos ensaios de IFD em larvas do *Aedes aegypti*. *i*) na primeira etapa, os FSs, tanto o Photogem[®] como a cúrcuma, nas três variações moleculares (CN, C e CS), foram dispersos na forma de solução nos recipientes plásticos contendo as larvas, onde em alguns estudos, após a aplicação dos FSs, as larvas receberam dois diferentes tipos de ração, com o intuito de avaliar a influência de um gênero alimentício específico na mortalidade larval. *ii*) na segunda etapa, os FSs derivados da cúrcuma, foram disponibilizados às larvas na forma de um pó liofilizado, preparado juntamente com os aditivos alimentares citados acima. O último estudo teve como objetivo otimizar a internalização dos FSs em larvas, e também eliminar a aplicação do FS na forma de solução, para desta forma, melhorar a seletividade desses compostos, tornando-os mais específicos para larvas de insetos em futuras aplicações.

6.4.1. Mortalidade de larvas do *Aedes aegypti*: iluminação artificial

A fim de determinar a melhor condição experimental para a redução da sobrevivência das larvas do *Aedes aegypti* e verificar a influência de dois diferentes gêneros alimentícios nas porcentagens de mortalidade, foram realizados estudos piloto, onde o Photogem[®] foi aplicado em solução nos recipientes com as larvas, que posteriormente receberam dois tipos específicos de ração, *uma para peixes*, denominada ração “A”, da Alcon, Santa Catarina, Brasil, contendo cerca de 44% de proteínas, 5% de gordura, 5% de carboidratos, minerais e vitaminas, e *outra para gatos*, ração “B”, da marca Magnus Cat Premium, Mix Sabores Filhotes (Adimax, São Paulo, Brasil), contendo 34% de proteínas, 10% de gordura, 3,5% de carboidratos, minerais e vitaminas. As rações (A e B) foram trituradas em finas partículas com o auxílio de gral e pistilo e pesadas em lotes de 0,100g. Para cada condição experimental, todas em triplicatas, foram utilizados recipientes plásticos transparentes contendo 30 mL de água declorada (pH próximo a 7), com 30 larvas por recipiente, entre o segundo e terceiro estágio de vida. Para cada recipiente, as larvas receberam ração “A” ou “B” e foram expostas a uma concentração inicial de 40 µg/mL de Photogem[®]. As larvas ficaram no

escuro em contato com o FS e com as rações durante 12 horas antes de serem colocadas à luz, neste caso utilizaram-se as lâmpadas fluorescentes para a irradiação das amostras. Os recipientes foram distribuídos aleatoriamente e alinhados a 20 cm de distância da lâmpada de maneira a garantir uniformidade na distribuição de luz. Controles onde as larvas ficaram expostas somente à luz, também foram avaliados na presença das rações (sem os FSs).

Após determinar as melhores condições de mortalidade larval, cujos resultados vieram através da utilização da ração A, novos experimentos foram realizados utilizando a metodologia supracitada. As larvas foram então, alimentadas unicamente com ração A e expostas a novas concentrações de Photogem[®] de 10, 20, 40, 60 e 80 µg/mL e de cúrcuma (CN, C e CS) de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. As leituras de mortalidade aconteceram em intervalos regulares de tempo até que se atingisse 100% de mortalidade larval. A fim de avaliar a toxicidade da sacarose isolada e a atividade dos FSs na ausência de luz, grupos controles foram mantidos durante todo o período do experimento.

6.4.2. Mortalidade de larvas do *Aedes aegypti*: iluminação natural

Nesta seção, os estudos realizados com o Photogem[®], propôs avaliar os efeitos fotodinâmicos deste FS em duas condições de iluminação solar. As larvas foram divididas em dois grupos (Grupo 1 e Grupo 2), ambos em triplicatas, onde receberam três concentrações do Photogem[®]: 20, 40, e 80 µg/mL. O preparo das amostras foi realizado um dia antes da exposição solar, onde as larvas receberam unicamente ração A e às concentrações do FS, permanecendo no escuro por um período de incubação de 12 horas. Os recipientes com as larvas foram distribuídos nas áreas externas do Instituto de Física de São Carlos em torno das 9 horas e 40 minutos da manhã e recolhidos às 17 horas e 40 minutos da tarde. Os grupos que não apresentaram mortalidade satisfatória, superior a 80%, eram deixados no escuro até a manhã seguinte, retornando ao Sol até que atingissem alta mortalidade.

A irradiação das amostras aconteceu em dois diferentes períodos do ano, denominados no estudo de período 1, referente a dezembro, e período 2, referente a junho. Esses períodos apresentaram acentuadas variações climáticas, sendo os dias do período 1, com altas intensidades luminosas, e os dias do período 2 com baixas intensidades luminosas. Desta forma, o Grupo 1, foi submetido às condições de

iluminação do período 1, atingindo alta mortalidade em um dia de experimento (dia 1), e o Grupo 2, às condições do período 2, atingindo altos valores de mortalidade em três dias de experimento (dia 1, dia 2 e dia 3). Os espectros de irradiância solar foram monitorados ao longo dos dias de iluminação, utilizando espectrorradiômetro, para a obtenção das intensidades luminosas. As intensidades luminosas referentes aos dias de experimentos estão representadas na **Tabela 2** e **Tabela 3**.

Tabela 2 - Medidas de intensidade referentes ao dia 1 de iluminação do período 1 dos experimentos de mortalidade utilizando o Photogem[®] nos estudos de IFD. Essas condições de iluminação foram aplicadas ao Grupo 1.

<i>Horários de medida (dia 1)</i>	<i>Intensidades (mW/cm²)</i>
09h40	30±5
10h10	60±5
12h40	45±5
17h40	40±5

Tabela 3 - Medidas de intensidade referentes aos dias (dia 1, dia 2 e dia 3) de iluminação do período 2 dos experimentos de mortalidade utilizando o Photogem[®] nos estudos de IFD. Essas condições de iluminação foram aplicadas ao Grupo 2.

<i>Horários de medida</i>		<i>Intensidades (mW/cm²)</i>
<i>(dia 1)</i>	09h40	7±2
	10h10	8±5
	12h40	20±5
	17h40	5±2
<i>(dia 2)</i>	09h40	8±5
	10h10	8±5
	12h40	15±5
	17h40	7±5
<i>(dia 3)</i>	09h40	5±2
	10h10	8±5
	12h40	19±5
	17h40	7±5

O período 2 por apresentar baixas intensidades luminosas foi escolhido propositalmente para o este estudo para simular criadouros de larvas localizados em regiões que recebem pouca entrega de luz, pois sabe-se que fêmeas do *Aedes aegypti* procuram locais com menor intensidade de luz para a realização da postura dos ovos. Em contrapartida, não podemos deixar de mencionar a relevância das condições apresentadas no período 1, visto que hoje, muitos estudos demonstram a existência de criadouros de larvas do *Aedes aegypti* expostos à altas intensidades de luz solar.

Com o estabelecimento das melhores condições de luz para que a mortalidade larval ocorresse num período de tempo mais curto, e visto que os melhores resultados foram alcançados através das condições de iluminação do período 1, as mesmas variáveis foram aplicadas para as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL.

Vale ressaltar que todos os resultados apresentados nesta seção foram comparados a grupos controle submetidos ao mesmo protocolo de tratamento, exceto com a presença de FS em condições de iluminação.

6.4.3. Estudo de fotodegradação dos fotossensibilizadores

De acordo com a literatura, a maior parte dos FSs sofre fotodegradação à medida que são expostos a luz. Com isso, os experimentos desta seção tiveram como objetivo avaliar o tempo de permanência do Photogem[®] e das três composições de cúrcuma, em solução, após exposição a duas fontes de luz: natural e artificial (lâmpadas fluorescentes). Para isto, soluções de 3 mL dos FSs foram preparadas partindo das soluções estoques do Photogem[®] (5 mg/mL) e das três composições de cúrcuma (1,5 mg/mL), obtendo-se concentrações de 20 e 25 µg/mL. Após o seu preparo, essas soluções foram transferidas para cubetas plásticas e vedadas com papel filme (PVC), a fim de evitar a evaporação do líquido ao decorrer do experimento. Para avaliar a fotodegradação dos FSs ao longo do tempo, medidas de absorção óptica foram realizadas com o auxílio de espectrofotômetro Cary UV-VIS (Varian, Australia) nos intervalos de tempo apresentados na **Tabela 4**. Muitos dos intervalos de tempo escolhidos para as medidas de absorção óptica de fotodegradação foram os mesmos em que se realizou a verificação da mortalidade larval durante exposição à luz solar/lâmpada. Os espectros foram monitorados numa faixa de 300-700 nm e as medidas realizadas em cubetas de quartzo.

Tabela 4 - Intervalos de tempo para a realização das medidas de absorção óptica e concentrações utilizadas para a fotodegradação do Photogem[®] e das composições de cúrcuma (CN, C e CS).

<i>Fotossensibilizadores</i>	<i>Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Intervalos de medidas após início de exposição solar / lâmpada (horas)</i>
Photogem [®]	20	12; 24; 36; 48 / 12; 24; 36; 48; 72
Cúrcuma natural (CN)	25	0,5; 3; 8 / 0,5; 3; 8; 24; 48; 72
Curcumina (C)	25	0,5; 3; 8 / 0,5; 3; 8; 24; 48; 72
Mistura Curcumina + Sacarose (CS)	25	0,5; 3; 8 / 0,5; 3; 8; 24; 48; 72

6.4.4. Microscopia confocal de fluorescência

Para verificar o local anatômico de atuação e acumulação dos FSs em larvas do *Aedes aegypti*, imagens de fluorescência foram realizadas por meio de Microscópio Confocal de Fluorescência invertido da Zeiss - LSM780 (Zeiss, Jena, Alemanha), com excitação em 405 nm para o Photogem[®] e 450 nm para as composições de cúrcuma. As larvas ficaram em contato por 12 horas no escuro com os FSs, sendo utilizada a concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ para o Photogem[®] e 25 $\mu\text{g/mL}$ para CN, C e CS. Após o período de incubação, as larvas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso dos FSs, e em seguida foram transferidas para lamínulas de microscópio para análise, imediatamente após o período de incubação.

6.5. Segunda etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: incorporação da cúrcuma (CN, C e CS) em ração, obtendo-se um pó liofilizado

Com o objetivo de melhorar a internalização dos FSs em larvas do *Aedes aegypti* e, ainda, proporcionar maior seletividade às larvas em condições reais, optou-se pelo desenvolvimento de um produto, na forma de um pó liofilizado, contendo três composições de cúrcuma incorporadas em iscas (rações). A motivação em se utilizar exclusivamente a cúrcuma neste estudo partiu desses compostos possuírem uma alta ação larvicida contra um amplo espectro de insetos nocivos, tendo suas propriedades potencializadas pela aplicação da luz, além de ser uma substância de fácil obtenção de baixo custo.

6.5.1. Preparo das rações liofilizadas e mortalidade larval

As rações foram trituradas utilizando gral e pistilo, até a obtenção de finas partículas. Para cada tipo de ração (ração A e ração B), as partículas foram separadas em lotes de 1g, e a seguir cada lote recebeu 2 mL de solução estoque das três composições de cúrcuma à 1,5 mg/mL, obtendo-se uma pasta homogênea de coloração amarelada. A mistura das partículas de ração e os FSs foram levados para congelamento em freezer a -80 ° C por um período de 24 horas, onde a seguir foram transferidos para o liofilizador também por 24 horas, para a retirada da água. O equipamento utilizado foi um liofilizador de bancada, série LS (Terroni, São Carlos Brasil).

Após o processo de liofilização, obteve-se um produto na forma de pó, que foi distribuído nos recipientes com larvas na quantidade de 10 mg por 30 mL de água deionizada. As amostras foram divididas em dois grupos antes da irradiação, o primeiro grupo recebeu as rações liofilizadas e permaneceram no escuro por um período de incubação de 12 horas. O segundo grupo foi colocado no Sol imediatamente após a alimentação com a ração liofilizada, eliminando o período de incubação no escuro. O tempo de iluminação total das amostras foi de 16 horas, sendo colocadas no Sol pela manhã às 9 horas e 40 minutos e recolhidas no final da tarde às 17 horas e 40 minutos, por dois dias de experimentos. Os experimentos desta seção foram realizados em condições de iluminação semelhantes ao período 1, apresentadas no tópico 4.4.2, **Tabela 2**. Grupos controles também foram mantidos no escuro com as rações liofilizadas (controle escuro), e na presença de luz, sem as rações liofilizadas (controle luz).

6.5.2. Caracterização das rações: análise em microscópio confocal, estabilidade preliminar das rações liofilizadas armazenadas em temperatura de 2 a 8° C e ensaios de liberação das composições de cúrcuma em solução (ração liofilizada)

Antes de realizar a caracterização do produto final de cúrcuma (pó liofilizado), as rações A e B, na forma pura, foram trituradas para a obtenção de finas partículas, tendo suas dimensões mensuradas com auxílio de microscópio de fluorescência confocal. A mensuração das dimensões das partículas foi realizada com o objetivo de relacionar

estes parâmetros com os valores de mortalidade larval induzida no estudo com o Photogem[®], em condições de iluminação artificial, apresentado na seção 4.4.1.

A caracterização das rações liofilizadas com cúrcuma foi realizada através de espectros e imagens de fluorescência, para investigar se ocorreu a incorporação dos FSs (CN, C e CS) nas rações. Os espectros de fluorescência foram realizados em intervalos de tempo de 2 semanas, 1 mês e 3 meses, a fim de determinar também por quanto tempo os FSs permaneceriam ativos/estáveis nas rações, mantidos em temperatura de 2 a 8° C. Os espectros de fluorescência foram coletados através de espectrômetro Ocean Optics USB 2000 UV-VIS (Ocean Optics, USA), utilizando um laser de diodo de 405 nm para a excitação. Um filtro de passa-alta de 480 nm foi utilizado para eliminar a excitação do laser.

Os experimentos de liberação da cúrcuma em solução foram realizados com o objetivo de investigar o perfil de liberação das três composições de cúrcuma incorporadas nas rações, quando em contato com a água dos recipientes utilizados nos experimentos de mortalidade. A permanência desses compostos nas rações é de extrema importância para que organismos que coexistam nos *habitats* naturais das larvas não sejam atingidos pela IFD, em casos de aplicação em ambientes lacustres, como lagos e lagoas.

Para verificar o perfil de liberação desses compostos em água, as rações liofilizadas foram pesadas em alíquotas de 2 mg e colocados em tubos cônicos (1,5 mL) contendo 1 mL de água destilada e armazenados em temperatura ambiente. Para verificar a liberação dos FSs, medidas de absorção foram realizadas no espectrofotômetro em intervalos de tempo de 12, 24, 48 e 72 horas. Antes da realização das medidas, os tubos cônicos foram colocados na centrífuga por 3 min a 3.000 rpm, e o sobrenadante foi transferido para cubetas de quartzo para a realização das medidas de absorção.

6.6. Análise dos dados

A comparação entre os valores de mortalidade nos diferentes grupos foi testada com teste-t ou análise de variância (ANOVA), complementada por Tukey, para analisar a existência de diferença significativa. O nível de significância foi de 5% ($p \geq 0,05$). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa Origin (OriginLab Corporation, Northhampton, MA, EUA).

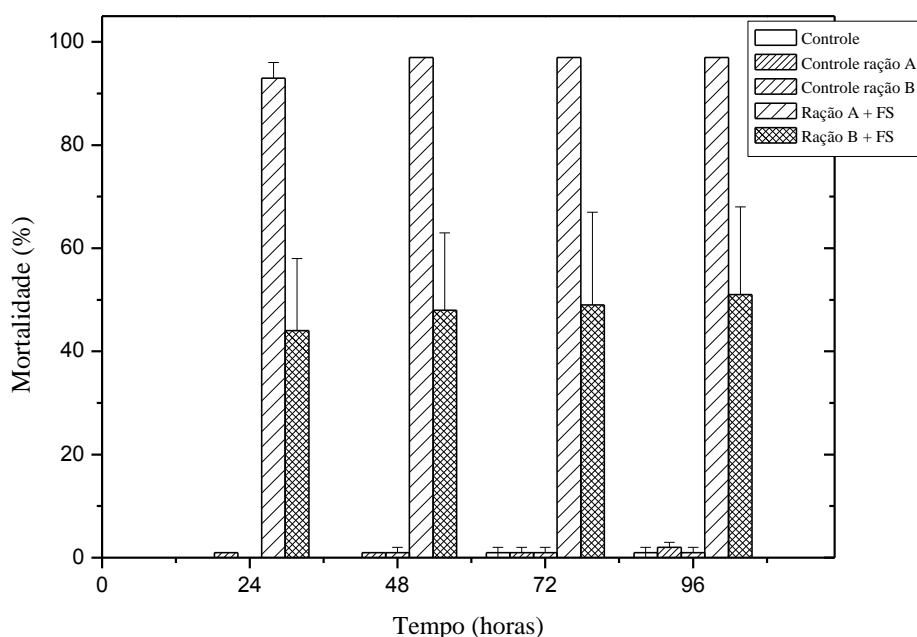
7. RESULTADOS

7.1. Primeira etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: Fotossensibilizadores aplicados diretamente em meio aquoso

7.1.1. Mortalidade de larvas do *Aedes aegypti*: iluminação artificial

Os resultados preliminares de mortalidade larval mostraram que a ração A (AlconBASIC[®] MEP 200 Complex) foi responsável por otimizar os efeitos do Photogem[®] quando exposto à iluminação artificial (lâmpada fluorescente, com intensidade variando entre 1,2 a 2,3 mW/cm²). Os experimentos em que as larvas receberam ração “A” apresentaram uma mortalidade de 93% contra 44% das larvas alimentadas com ração “B”, em 24 horas de iluminação, na concentração de 40 µg/mL (**Figura 13**). Em todos os tempos, quando comparamos à mortalidade média das larvas alimentadas com ração A com aquelas que receberam ração B, observou-se diferença estatística com $p \leq 0,05$. O Photogem[®] não apresentou toxicidade no escuro na concentração de 40 µg/mL.

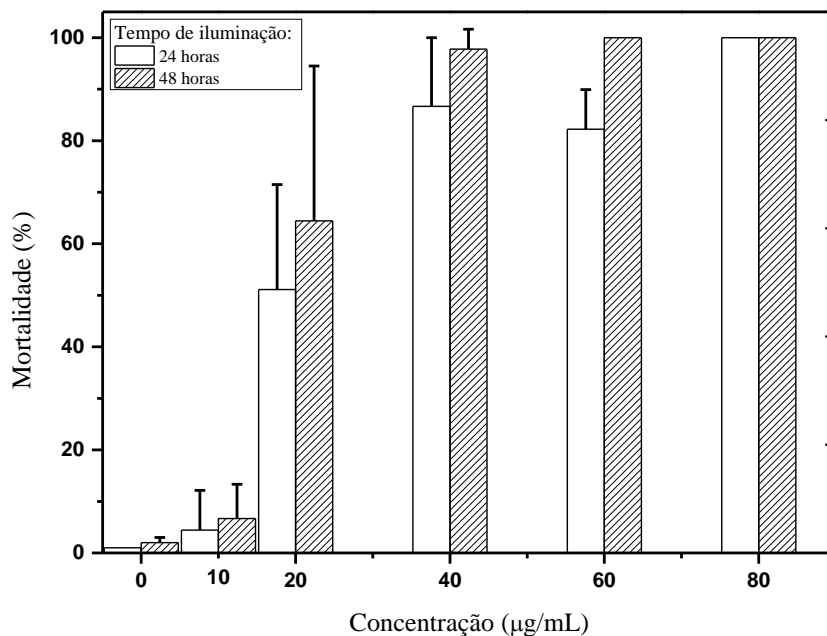
Figura 13- Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando Photogem[®] durante IFD – Iluminação artificial.



Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando Photogem[®] como FS na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, associado com ração A ou ração B. A irradiação das amostras foi realizada com lâmpadas fluorescentes. Grupos: controle (luz), controle ração A (luz), controle ração B (luz) e inativação fotodinâmica (ração A + FS e ração B + FS). Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão. Em todos os tempos ocorreu diferença significativa ($p \geq 0,05$), entre Ração A + FS e Ração B + FS.

Os resultados dos experimentos reproduzidos com luz artificial, utilizando as concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$ para o Photogem[®], associado unicamente à ração A, estão representados na **Figura 14**. Ao analisar o gráfico observa-se uma mortalidade larval crescente em função das concentrações do FS, sendo que em 24 horas de iluminação ocorreu mortalidade de 4%, 51%, 86%, 82% e 100% nas respectivas concentrações: 10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$. Em 48 horas de exposição à iluminação artificial, nas mesmas concentrações observamos uma mortalidade de 6%, 64%, 97%, 100% e 100%. De acordo com o gráfico, nota-se um efeito de morte acentuado nos grupos tratados com o FS na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$, atingindo a mortalidade total das larvas (100%) em 24 horas de exposição à luz. Na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, a mortalidade total foi atingida em 48 horas. O Photogem[®] não apresentou toxicidade no escuro nas concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 14 – Mortalidade do *Aedes aegypti* em função da concentração de Photogem[®] durante IFD – Iluminação artificial.

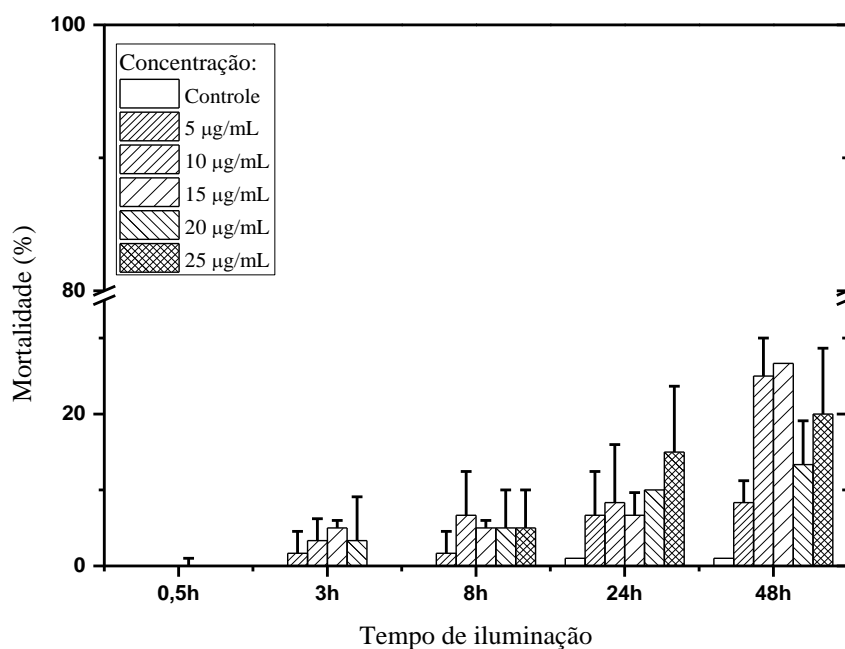


Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando Photogem[®] como FS nas concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 µg/mL, associado unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com lâmpadas fluorescentes. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

Os resultados dos experimentos de IFD utilizando as três composições de cúrcuma ativadas por luz artificial (lâmpadas fluorescentes), nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL estão representados na **Figura 15**, **Figura 16** e **Figura 17**.

Das três composições de cúrcuma associadas a ração A, apenas a cúrcuma natural (CN) mostrou-se pouco ativa, apresentando baixa mortalidade em 48 horas de exposição à luz. Os resultados com cúrcuma natural, por sua vez, exibiram valores de mortalidade de 8,3%, 25%, 26,6%, 13,3% e 20% nas respectivas concentrações: 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL. No escuro, a cúrcuma natural, não exibiu atividade larvicida em nenhuma das concentrações, mostrando ser atóxica para larvas do *Aedes aegypti* nestas condições. O gráfico de mortalidade tendo como FS a cúrcuma natural está representado na **Figura 15**.

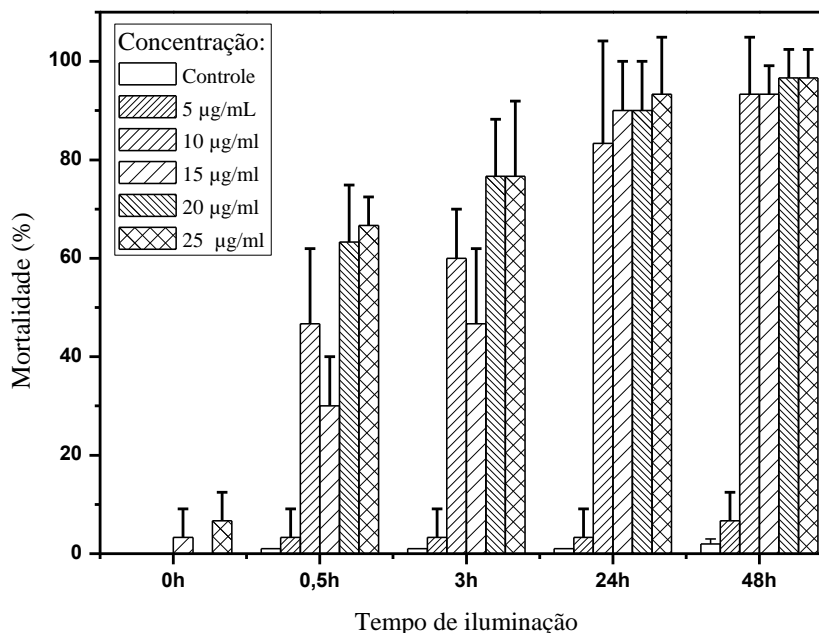
Figura 15- Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando cúrcuma natural (CN) durante IFD – Iluminação artificial.



Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando cúrcuma natural como FS nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, associada unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com lâmpadas fluorescentes. O controle presente no gráfico é referente aos solventes orgânicos, etanol e DMSO. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

Em relação aos experimentos utilizando a curcumina, ao analisar o gráfico (**Figura 16**) observa-se que este FS apresentou alta atividade fotolarvicida, exibindo mortalidades de 60%, 46%, 76% e 76% para as concentrações de 10, 15, 20 e 25 µg/mL, em três horas de iluminação artificial. Em 24 horas e 48 horas de exposição à luz, percebe-se um aumento dos valores de mortalidade, sendo elas de 83%, 90%, 90%, 93% e 93%, 93%, 96% e 96%, respectivamente. Em todos os tempos a concentração de 5 µg/mL mostrou-se pouco efetiva contra as larvas de *Aedes aegypti*, resultando em uma mortalidade final de 7%, em 48 horas de iluminação. Assim como a cúrcuma natural, a curcumina também apresentou baixa toxicidade no escuro, exibindo mortalidade abaixo de 5% em todas as concentrações, comprovando desta forma que a mortalidade larval foi alcançada pela ativação do FS por luz visível.

Figura 16 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando curcumina (C) durante IFD – Iluminação artificial.



Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando curcumina como FS nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, associada unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com lâmpadas fluorescentes. O controle presente no gráfico é referente aos solventes orgânicos etanol e DMSO. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

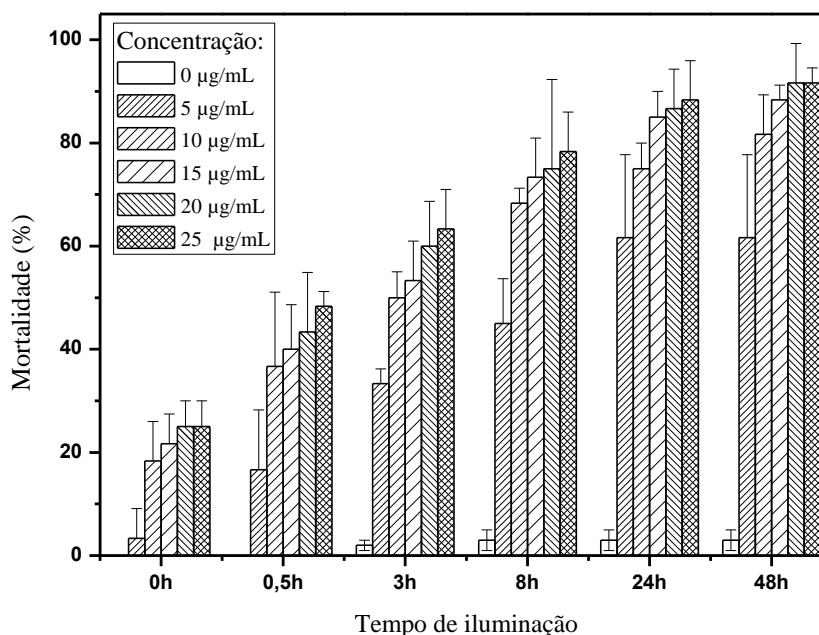
Os experimentos realizados com a curcumina incorporada em sacarose (CS), também apresentaram resultados positivos para o controle de larvas do *Aedes aegypti*, no entanto, nota-se que ocorreu um efeito sinérgico entre a curcumina e a sacarose, levando a altas porcentagens de mortalidade no escuro. Vale ressaltar que os controles realizados apenas com sacarose não induziram mortalidade larval.

Analisando o gráfico (**Figura 17**), nota-se que o aumento da mortalidade é diretamente proporcional ao aumento do tempo de exposição à luz artificial. Em 3 horas de iluminação foram alcançadas mortalidades de 33%, 49%, 53%, 59% e 63% para 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL e em 24 horas, essas mortalidades foram de 61%, 74%, 84%, 86%, 88%. No final da exposição à luz artificial, num período de iluminação de 48 horas, os valores de mortalidade encontrados foram de 61%, 81%, 88%, 91% e 91%, nas concentrações supracitadas.

Testes estatísticos foram aplicados para as três composições de cúrcuma, em 48 horas de iluminação artificial, na concentração de 25 µg/mL, e não ocorreu diferença

significativa entre a curcumina (C) e a curcumina incorporada em sacarose (CS). Nos demais grupos foi observada diferença estatística entre CS e CN, e C e CN, com $p \leq 0,05$.

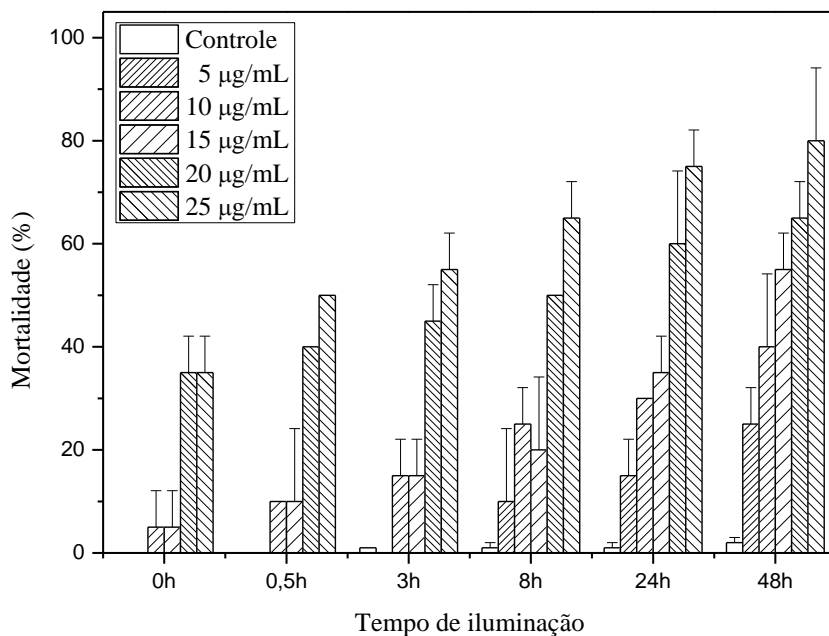
Figura 17 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando curcumina incorporada em sacarose (CS) durante IFD – Iluminação artificial.



Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando curcumina incorporada em sacarose como FS nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, associada unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com lâmpadas fluorescentes. O controle presente no gráfico é referente à sacarose pura. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

As larvas tratadas com curcumina em sacarose no escuro, por 48 horas, apresentaram mortalidades de 25%, 40%, 55%, 65% e 80%, nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL. Ao analisar o gráfico (**Figura 18**), observa-se que a curcumina em sacarose apresenta um alto potencial larvicida na ausência de luz, no entanto essa propriedade é potencializada com a IFD, com a utilização de lâmpadas fluorescentes. Com a utilização da fonte de luz, pode-se perceber um aumento da mortalidade em 36%, 41%, 33%, 26,6% e 11% nas respectivas concentrações: 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL, em 48 horas de iluminação (**Figura 17**). Testes estatísticos foram realizados entre o grupo controle (escuro), e o grupo de IFD, em 48 horas, na concentração de 25 µg/mL e foi observada diferença significativa, com $p \leq 0,05$.

Figura 18 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo, utilizando curcumina incorporada em sacarose (CS) – Controle escuro.

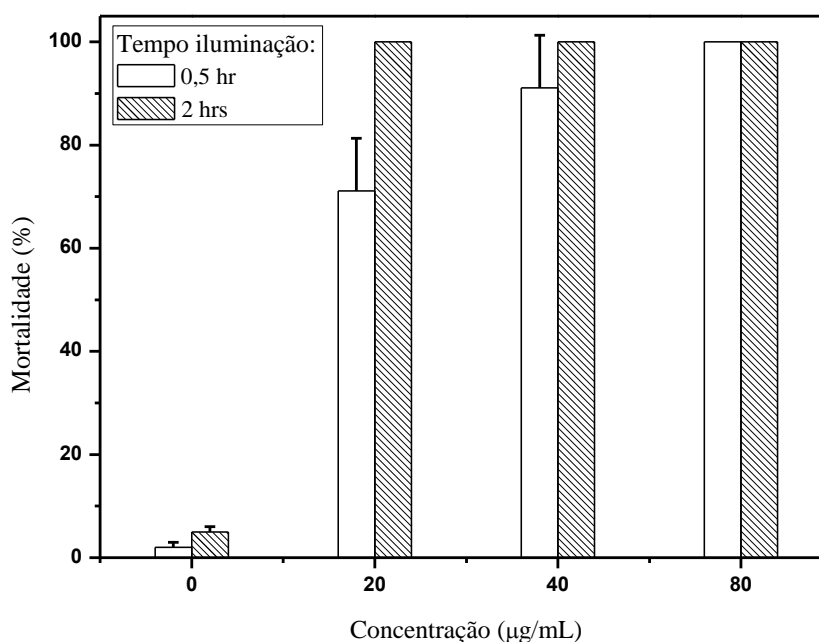


Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando curcumina incorporada em sacarose nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, associada unicamente com ração A, no escuro. O controle presente no gráfico é referente à sacarose pura. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

7.1.2. Mortalidade de larvas do *Aedes aegypti*: iluminação natural

Os resultados dos experimentos de IFD, envolvendo o Grupo 1, que foi submetido às condições de iluminação do período 1, utilizando como FS o Photogem[®], nas concentrações de 20, 40 e 80 µg/mL, estão representados na **Figura 19**. Analisando o gráfico (**Figura 19**), observamos que o Grupo 1 exibiu alta mortalidade em duas horas de exposição à luz solar, cujas intensidades no dia de iluminação variaram de 30 a 60 mW/cm². Em meia hora de iluminação, é possível observar mortalidade de 71%, 91% e 100%, para 20, 40 e 80 µg/mL, respectivamente. A mortalidade total das larvas foi observada para todas as concentrações num período de iluminação de duas horas.

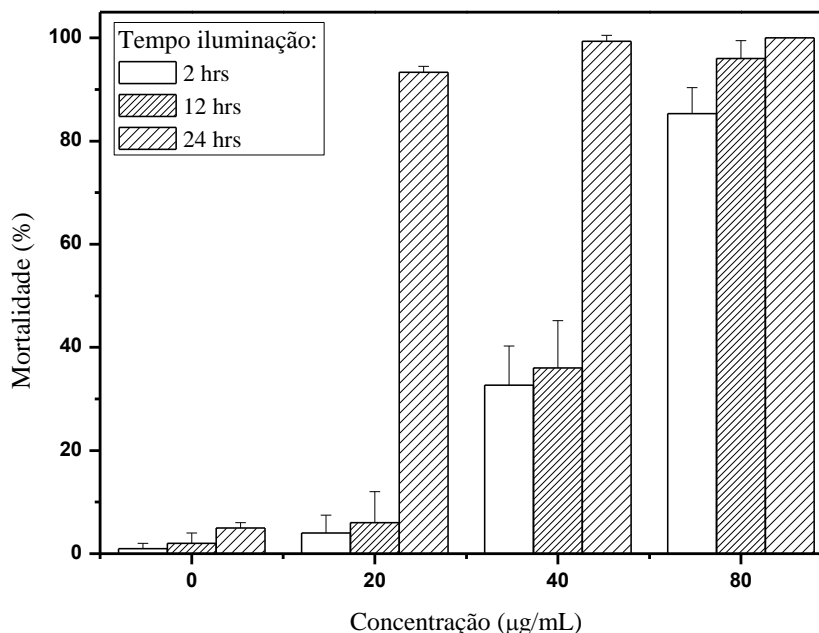
Figura 19 - Mortalidade das larvas (Grupo 1) em função da concentração de Photogem[®] - Iluminação natural (período 1).



Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* (Grupo 1) utilizando Photogem[®] nas concentrações de 20, 40 e 80 µg/mL, associado unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural, nas condições de iluminação do período 1 (irradiância solar entre 30 e 60 mW/cm²). O controle luz está representado no gráfico por 0 µg/mL. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

O Grupo 2 que foi submetido as condições de iluminação do período 2, com irradiância solar variando entre 5 e 20 mW/cm², exibiu mortalidade de 100% em 24 horas de iluminação, na concentração de 80 µg/mL para o Photogem[®] (**Figura 20**). Os valores de mortalidade para as concentrações de 20 e 40 µg/mL, em 2, 12 e 24 horas, foram de 3%, 6%, 96% e 32%, 36% e 99%, respectivamente. O efeito da luz (controle luz), sem a presença do FS, também foi avaliado nas duas condições (período 1 e período 2) e estão representados na **Figura 19** e **Figura 20**, por 0 µg/mL.

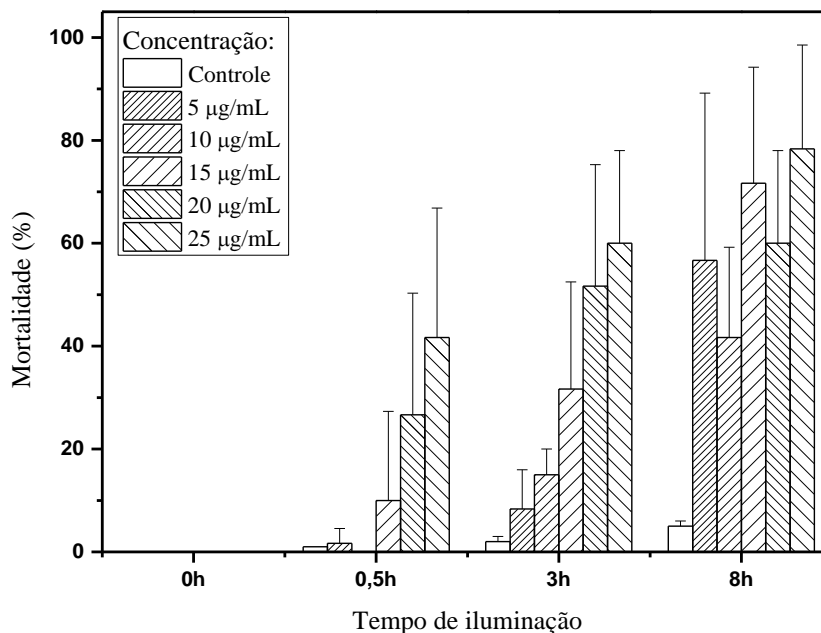
Figura 20 - Mortalidade das larvas (Grupo 2) em função da concentração de Photogem[®] - Iluminação natural (período 2).



Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* (Grupo 2) utilizando Photogem[®] nas concentrações de 20, 40 e 80 µg/mL, associado unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural, nas condições de iluminação do período 2 (irradiância solar entre 5 e 19 mW/cm²). O controle luz está representado no gráfico por 0 µg/mL. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

Diferente dos resultados obtidos para o Grupo 1, utilizando o Photogem[®], nas condições de iluminação do período 1, que apresentaram alta mortalidade em 2 horas de exposição solar, as três composições de cúrcuma, que foram submetidas às mesmas condições de iluminação (período 1), atingiram valores de mortalidade similares em 8 horas de iluminação. A cúrcuma natural (CN), por sua vez, em 0,5 hora de iluminação, exibiu valores de mortalidade de 1%, 0%, 10%, 26% e 41% nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL. Em 3 horas, essa mortalidade foi superior, apresentando valores de 8%, 15%, 32%, 51% e 60%. No final da exposição à luz solar, num período de iluminação de 8 horas, as mortalidades encontradas foram de 56%, 41%, 71%, 59% e 78%, nas concentrações supracitadas. Os resultados dos experimentos de IFD com a cúrcuma natural estão representados na **Figura 21**.

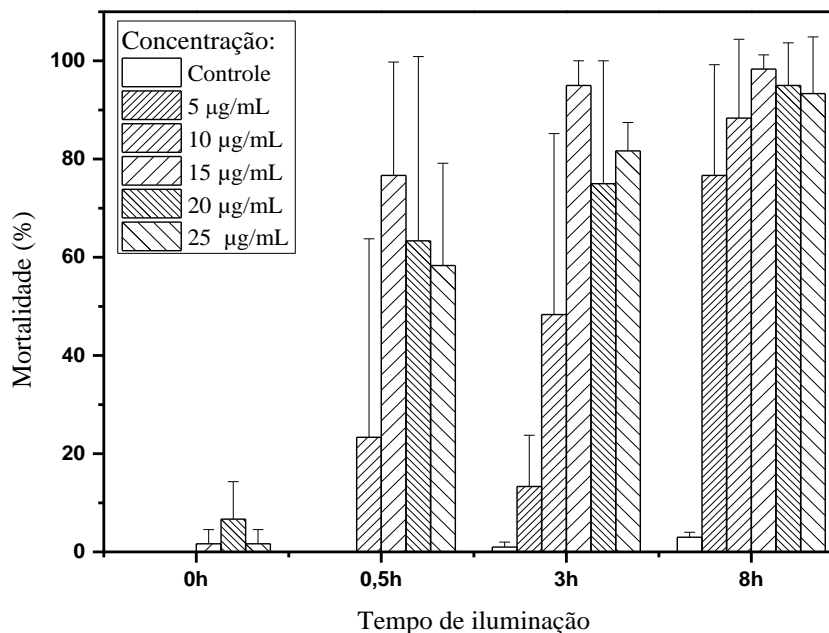
Figura 21 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando cúrcuma natural (CN) durante IFD – Iluminação natural.



Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando cúrcuma natural nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, associado unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural, em condições similares de iluminação do período 1. O controle presente no gráfico é referente ao controle luz. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

A curcumina (C), também apresentou alta atividade fotolarvicida contra as larvas do *Aedes aegypti*, quando ativada por luz solar. Os valores de mortalidade em 0,5 hora de iluminação foram de 0%, 23%, 76%, 63% e 58% para as concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL. Em 3 horas observou-se um aumento na mortalidade, tendo para as mesmas concentrações, mortalidade de 13%, 48%, 95%, 74% e 81%. Após o período final de iluminação solar, ou seja, 8 horas na presença de luz, os valores de mortalidade foram de 76%, 88%, 98%, 95% e 93% para 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL, respectivamente. O gráfico de mortalidade tendo como FS a curcumina (C) está representado na **Figura 22**.

Figura 22 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando curcumina (C) durante IFD – Iluminação natural.

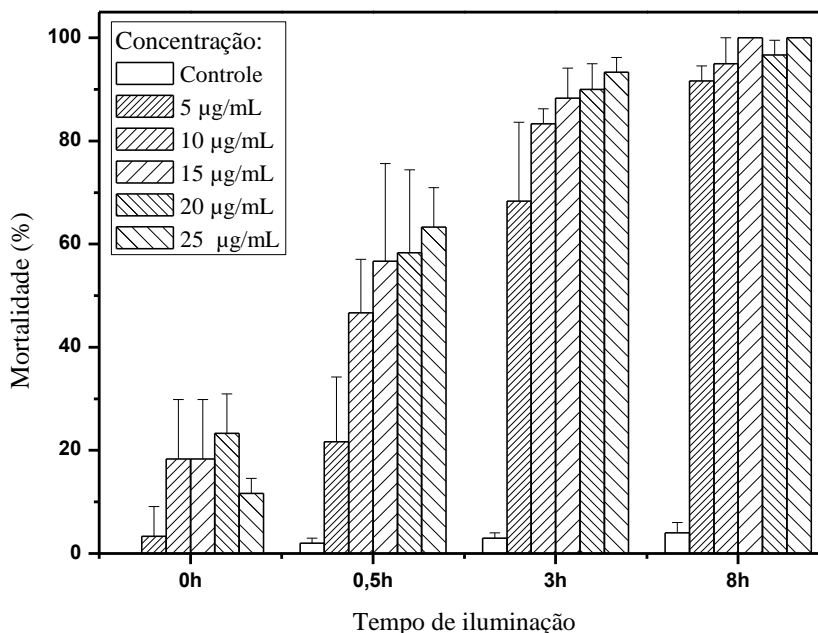


Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando curcumina nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, associado unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural, em condições similares de iluminação do período 1. O controle presente no gráfico é referente ao controle luz. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

A curcumina em sacarose (CS) apresentou valores de mortalidade de 21%, 46%, 56%, 58% e 63%, em 0,5 hora de iluminação natural, nas respectivas concentrações 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL. Em 3 horas, esses valores foram de 68%, 83%, 88%, 90% e 93% e em 8 horas de 91%, 94%, 99%, 96% e 99%, nas concentrações supracitadas. Diferente das outras composições de cúrcuma, a CS, apresentou toxicidade após 12 horas de incubação no escuro, com valores de mortalidade de 3%, 18%, 18%, 23% e 11%, nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL, respectivamente. O gráfico de mortalidade tendo como FS a curcumina em sacarose (CS) está representado na **Figura 23**.

Testes estatísticos foram realizados entre os grupos de IFD, com as três composições de cúrcuma, em 48 horas, na concentração de 25 µg/mL e não foi observada diferença significativa nestas condições.

Figura 23 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando curcumina em sacarose (CS) durante IFD – Iluminação natural.

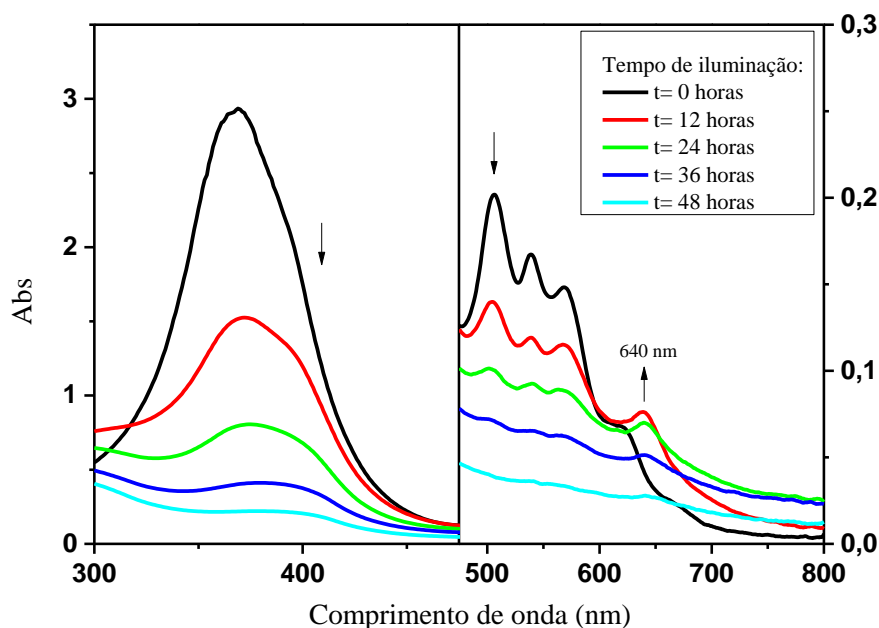


Porcentagem de mortalidade do *Aedes aegypti* utilizando curcumina em sacarose nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, associado unicamente com ração A. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural, em condições similares de iluminação do período 1. O controle presente no gráfico é referente ao controle luz. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

7.1.3. Estudo de fotodegradação dos fotossensibilizadores

O gráfico dos espectros de absorção do Photogem[®] em função do tempo de degradação no Sol está representado na **Figura 24**. Analisando o gráfico, percebe-se, que ao longo do tempo de exposição à luz solar, ocorre uma diminuição da banda de Soret (em 369) e das bandas – Q (em 507, 540, 570 e 620 nm). Com isto, podemos verificar a ocorrência de fotodegradação. Ao longo do processo de fotodegradação, observa-se o aparecimento de uma nova banda de absorção na região do 640 nm em 12 horas de iluminação, que degrada-se após 36 horas. A fotodegradação é caracterizada por transformações químicas, que ocorrem nas moléculas, levando à formação de fotoprodutos.

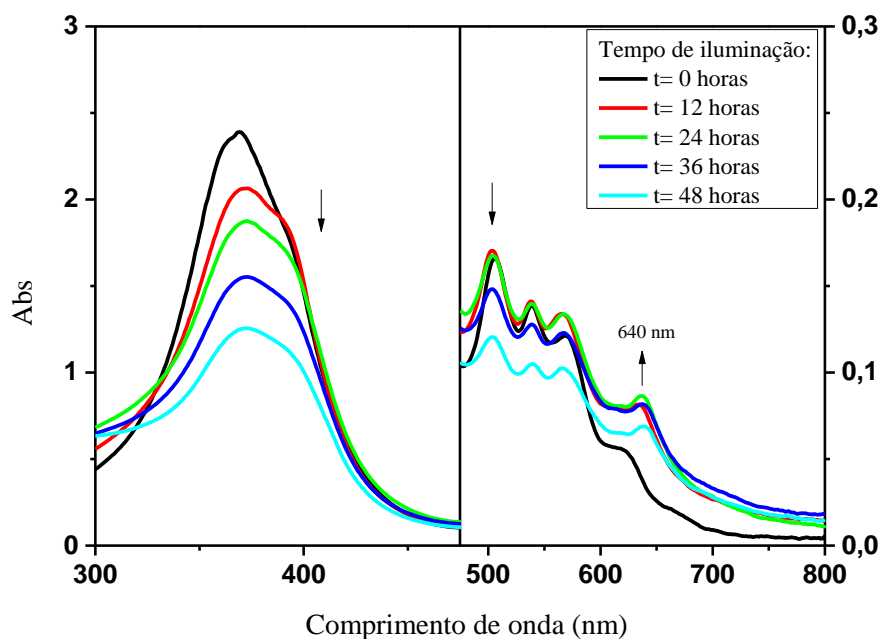
Figura 24 - Espectros de absorção óptica do Photogem[®] - Fotodegradação com iluminação natural.



Espectros de absorção óptica do Photogem[®] 20 µg/mL degradado em água, com tempo de iluminação no Sol variando de 0-48 horas. A seta representa a formação de um fotoproduto na região do 640 nm.

Analisando os gráficos de absorção do Photogem[®], fotodegradado no Sol e na lâmpada, foi possível verificar que a degradação deste FS ocorre de forma mais pronunciada quando é exposto às condições de iluminação natural, cuja fotodegradação total ocorre em 48 horas (**Figura 24**). Em contrapartida, nas condições de iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes), o decaimento das bandas de absorção do Photogem[®] é mais lento, não observando fotodegradação total em 48 horas de exposição à luz. Ao longo do processo de fotodegradação na lâmpada, também ocorreu a formação de fotoproduto na região do 640 nm, em 12 horas de iluminação (**Figura 25**).

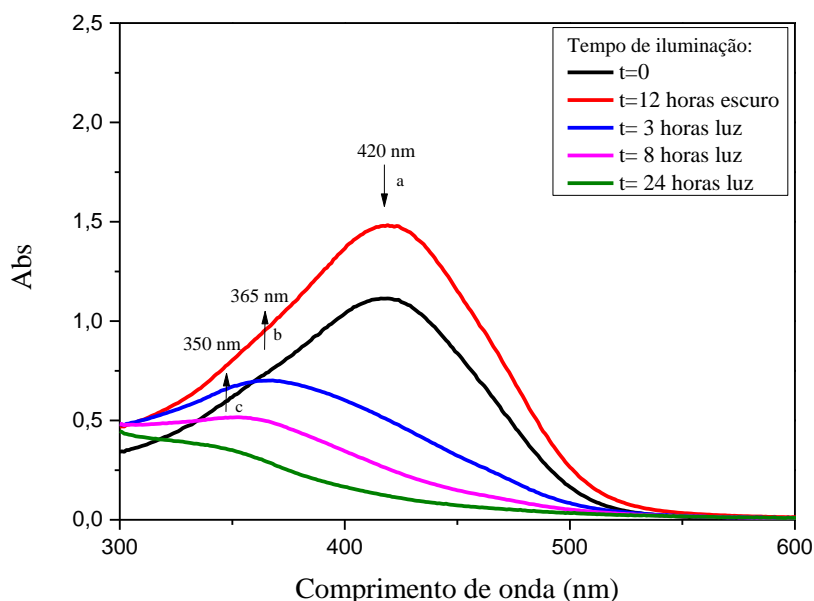
Figura 25 - Espectros de absorção óptica do Photogem[®] - Fotodegradação com iluminação artificial.



Espectros de absorção óptica do Photogem[®] 20 $\mu\text{g/mL}$ fotodegradado em água, com tempo de iluminação na lâmpada variando de 0-48 horas. A seta representa a formação de um fotoproduto na região do 640 nm.

O espectro de absorção da cúrcuma é caracterizado por apresentar uma intensa banda de absorção na região do 420 nm (**Figura 26**, seta a). O gráfico com os espectros de absorção da cúrcuma natural (CN) em função do tempo de fotodegradação na lâmpada está representado na **Figura 26**. Analisando o gráfico, observamos que a cúrcuma natural apresenta um decaimento da sua banda de absorção após o período de 12 horas no escuro, mostrando ser instável nesta condição. Após o período de 3 horas de iluminação, pode-se observar a formação de um fotoproduto na região do 365 nm (**Figura 26**, seta b), que degrada-se após este tempo. Em 8 horas de iluminação, ocorre o aparecimento de uma banda de absorção na região do 350 nm (**Figura 26**, seta c), o que condiz com a formação de um novo fotoproduto. Com essas observações, pode-se dizer que a fotodegradação da CN ocorre em até 3 horas, após o início da iluminação com lâmpada fluorescente.

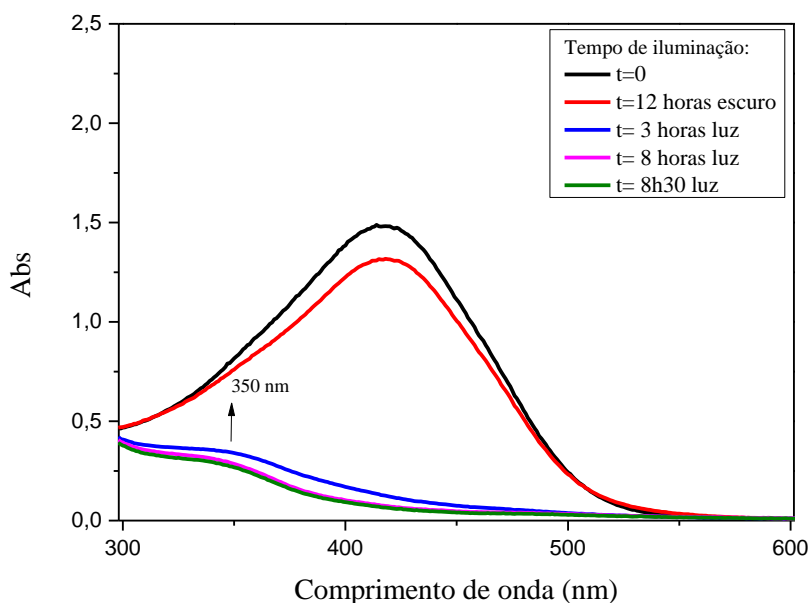
Figura 26 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma natural (CN)- Fotodegradação com iluminação artificial.



Espectros de absorção óptica da cúrcuma natural 25 $\mu\text{g/mL}$ fotodegradada em água, com tempo de iluminação na lâmpada variando de 0 - 24 horas. A seta a representa a banda característica da cúrcuma natural, a seta b representa a formação do fotoproduto na região do 365 nm e a seta c, o fotoproduto na região do 350 nm.

Na **Figura 27**, estão representados os espectros de absorção óptica da cúrcuma natural, submetida à fotodegradação com luz natural. Comparando os dois gráficos de fotodegradação da CN na lâmpada e no Sol, podemos observar que fotoproduto formado na região do 365 nm, visualizado nas três primeiras horas de iluminação artificial (**Figura 26**, seta b), não foi observado nas condições de iluminação natural. Nesta última condição, o fotoproduto em 365 nm provavelmente tenha sido degradado devido à alta intensidade de luz entregue à solução de CN. Em contrapartida, observamos a formação do fotoproduto com absorção em torno de 350 nm (**Figura 27**, seta), em três horas de iluminação solar, o mesmo encontrado no período de 8 horas na luz artificial (**Figura 26**, seta c). A fotodegradação da CN na luz solar, desta forma, aconteceu também em três horas de exposição à iluminação natural.

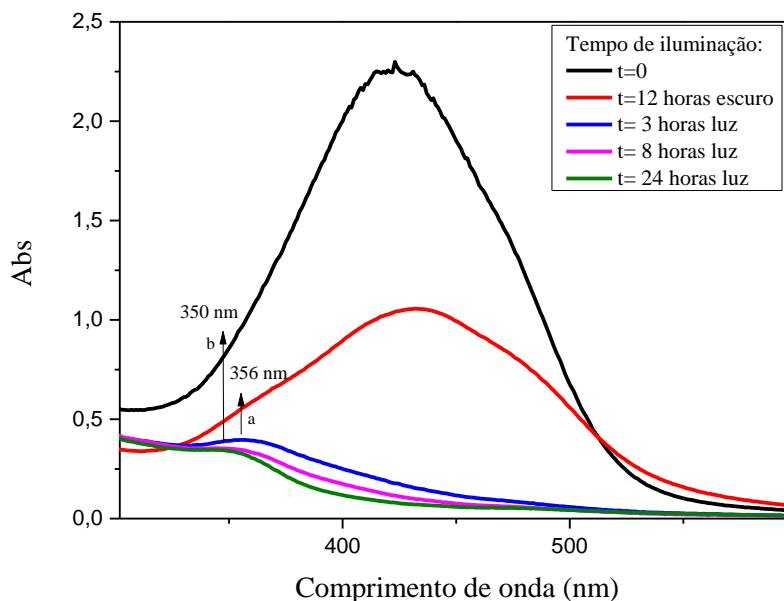
Figura 27 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma natural (CN) - Fotodegradação com iluminação natural.



Espectros de absorção óptica da cúrcuma natural 25 $\mu\text{g/mL}$ fotodegradada em água, com tempo de iluminação no Sol variando de 0 - 8 horas e meia. A seta a representa o fotoproduto formado na região do 350 nm, em 3 horas de iluminação.

Da mesma maneira que a cúrcuma natural, a curcumina (C) apresentou uma degradação total num período de 3 horas de exposição à iluminação artificial. De acordo com o gráfico, apresentado na **Figura 28**, podemos visualizar um decaimento da banda de absorção da curcumina no período de 12 horas no escuro, seguido de um deslocamento da banda de absorção após o início da iluminação na lâmpada. Desta forma, em 3 horas foi possível observar a formação de uma fotoproduto na região do 356 nm (**Figura 28**, seta a), sendo degradado a seguir. Em 8 horas de iluminação, ocorre o aparecimento do fotoproduto na região do 350 nm (**Figura 28**, seta b). Os resultados da fotodegradação da curcumina na luz artificial estão representados na **Figura 28**.

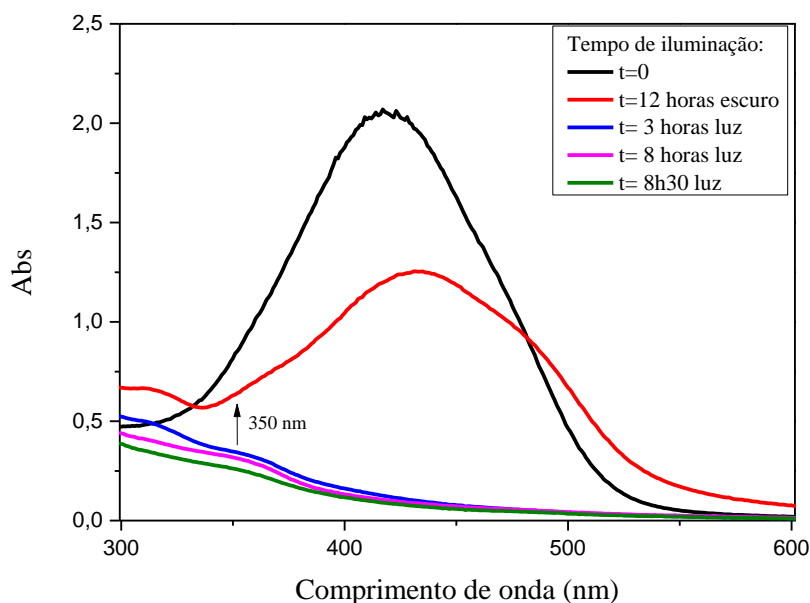
Figura 28 - Espectros de absorção óptica da curcumina (C)- Fotodegradação com iluminação artificial.



Espectros de absorção óptica da curcumina 25 $\mu\text{g/mL}$ fotodegradada em água, com tempo de iluminação na lâmpada variando de 0 - 24 horas. A seta a representa o fotoproduto formado na região do 356 nm e a seta b, o fotoproduto na região do 350 nm.

O gráfico de fotodegradação da curcumina (C), submetida às condições de iluminação natural, apresenta-se na **Figura 29**. Após 3 horas em contato com o Sol, foi possível observar a formação de um fotoproduto na região do 350 nm, que pode ser visualizado pela seta, na **Figura 29**. Da mesma forma que a cúrcuma natural, a curcumina apresentou um processo de degradação em torno de 3 horas de exposição às condições de iluminação natural. No gráfico, também é possível observar a instabilidade da curcumina no período de 12 horas no escuro, apresentando um decaimento da banda de absorção.

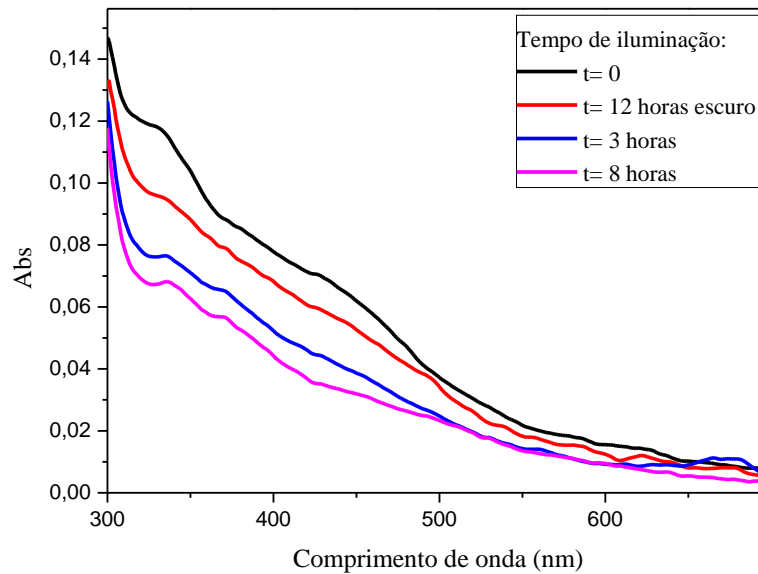
Figura 29 - Espectros de absorção óptica da curcumina (C)- Fotodegradação com iluminação natural.



Espectros de absorção óptica da curcumina 25 $\mu\text{g/mL}$ fotodegradada em água, com tempo de iluminação no Sol variando de 0 - 8 horas e meia. A seta a representa o fotoproduto formado na região do 350 nm, em três horas de iluminação natural.

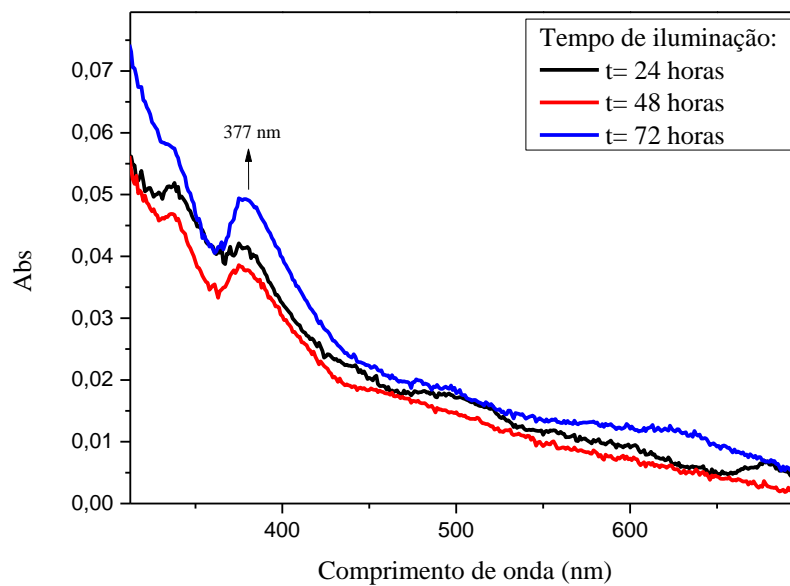
O espectro de absorção da curcumina em sacarose (CS) está representado na **Figura 30**. Observa-se que no tempo inicial ($t=0$), essa composição de cúrcuma não apresenta a banda de absorção característica na região do 420 nm, como na cúrcuma natural e na curcumina. Ao longo do tempo de iluminação artificial, percebe-se um decaimento da banda de absorção da CS, seguido da formação de um fotoproduto com banda de absorção na região do 377 nm (**Figura 31**, seta), em 24 horas de exposição à lâmpada fluorescente. Analisando os gráficos dos espectros de absorção das três composições de cúrcuma submetidas à fotodegradação na luz artificial, observa-se que a curcumina em sacarose (CS) apresentou maior estabilidade no escuro e na condição de iluminação, degradando-se totalmente após 8 horas.

Figura 30 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose (CS)- Fotodegradação com iluminação artificial.



Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose 25 $\mu\text{g/mL}$ fotodegradada em água, com tempo de iluminação na lâmpada variando de 0- 8 horas.

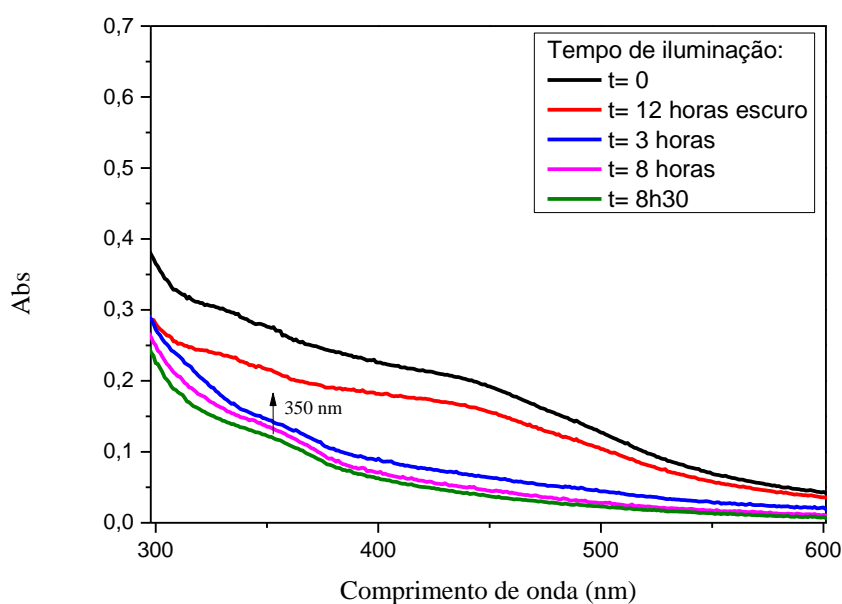
Figura 31- Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose (CS)- Fotodegradação com iluminação artificial.



Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose 25 $\mu\text{g/mL}$ fotodegradada em água, com tempo de iluminação na lâmpada variando de 24 - 72 horas. A seta no gráfico representa o fotoproduto formado na região do 377 nm, em 24 horas de iluminação artificial.

Nos estudos de fotodegradação realizados com a curcumina em sacarose, submetida à iluminação natural, pode-se observar a formação do fotoproduto na região do 350 nm (**Figura 32**, seta), em três horas de exposição ao Sol, bem como as outras composições de cúrcuma. O fotoproduto com banda de absorção na região do 377 nm, encontrado nas condições de iluminação artificial para a curcumina em sacarose (**Figura 31**, seta), não é observado nas condições de iluminação natural, podendo já ter sido fotodegradado. A curcumina em sacarose nas condições de iluminação natural apresentou degradação total em três horas de iluminação. Os resultados da fotodegradação da CS estão representados na **Figura 32**.

Figura 32 - Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose (CS)- Fotodegradação com iluminação natural.



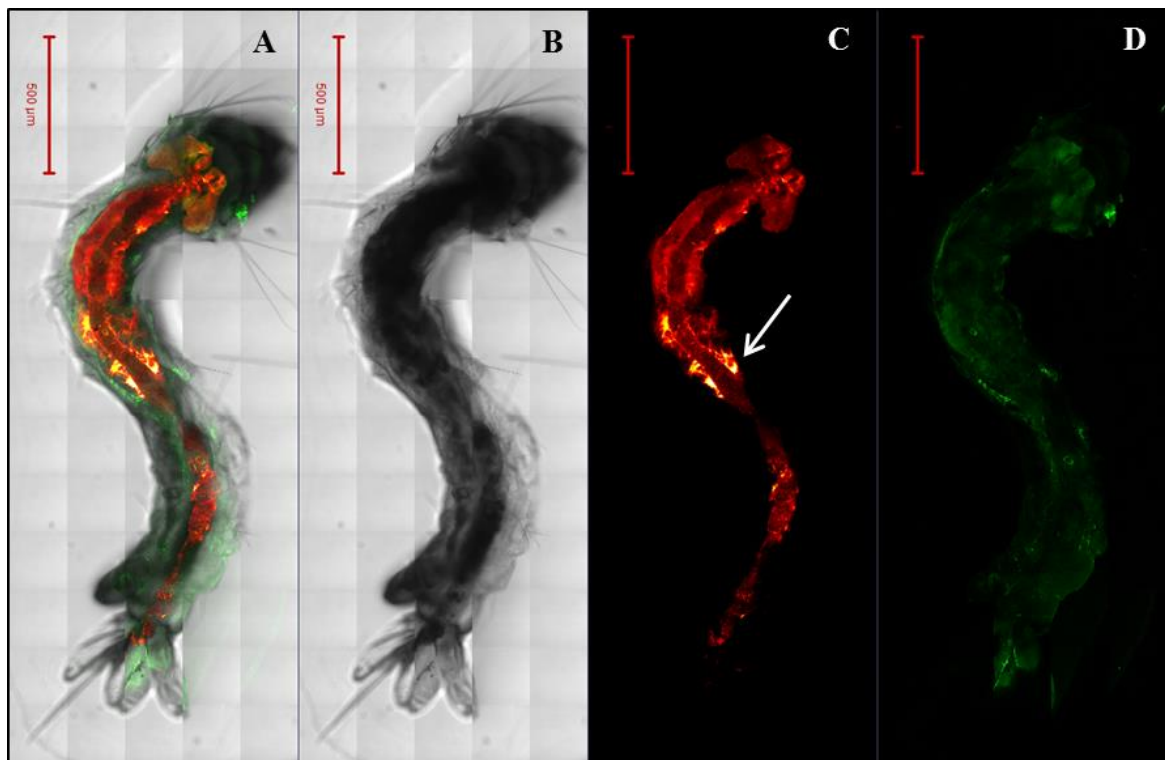
Espectros de absorção óptica da cúrcuma em sacarose 25 µg/mL fotodegradada em água, com tempo de iluminação no Sol variando de 0 - 8 horas e meia. A seta no gráfico representa o fotoproduto formado na região do 350 nm, em 3 horas de iluminação.

7.1.4. Microscopia de fluorescência

As imagens de fluorescência foram utilizadas para demonstrar a distribuição e a acumulação dos fotossensibilizadores em diversas regiões anatômicas das larvas do *Aedes aegypti*. As imagens das larvas que ficaram incubadas no escuro por 12 horas no FS Photogem[®] estão representadas pela **Figura 33** e **Figura 34**. Observando a **Figura**

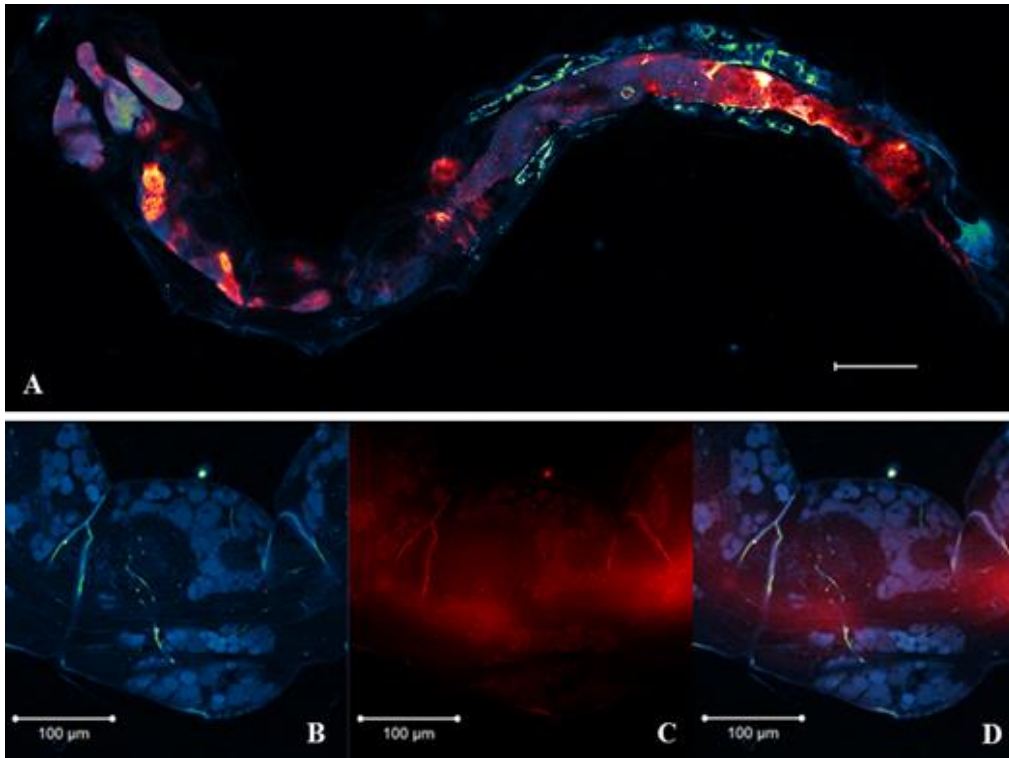
33, em C, nota-se que a fluorescência do Photogem[®], que ocorre entre 600-700 nm, está distribuída ao longo de todo canal alimentar da larva, sendo mais evidente na região torácica, onde estão localizados os cecos gástricos, glândulas salivares e o intestino médio (estômago). Com base nestas imagens, podemos dizer que o Photogem[®] foi prontamente ingerido pelas larvas, acumulando-se principalmente no sistema digestório, onde ocorreu o processo de IFD. Ainda na **Figura 33** (em C, seta), também podemos observar um pequeno extravasamento da fluorescência do Photogem[®] fora do canal alimentar, indicando assim, a penetração do FS para outras regiões da larva. Na **Figura 34**, (em C) podemos verificar a fluorescência do Photogem[®], em um dos segmentos abdominais das larvas, incubadas no FS.

Figura 33 – Imagens de microscopia confocal em larvas do *Aedes aegypti* – Incubação em Photogem[®].



Imagens de fluorescência de larva do *Aedes aegypti* incubada por 12 horas no Photogem[®] 20µg/mL, vista em microscopia confocal. Na imagem A, verifica-se uma sobreposição de imagens com a fluorescência do FS e da larva, em B, o controle, em C, a fluorescência do Photogem[®], em D a fluorescência da larva. A seta (em C) está representando o extravasamento do FS além do tudo digestório da amostra. Barra de escala de 500 µm.

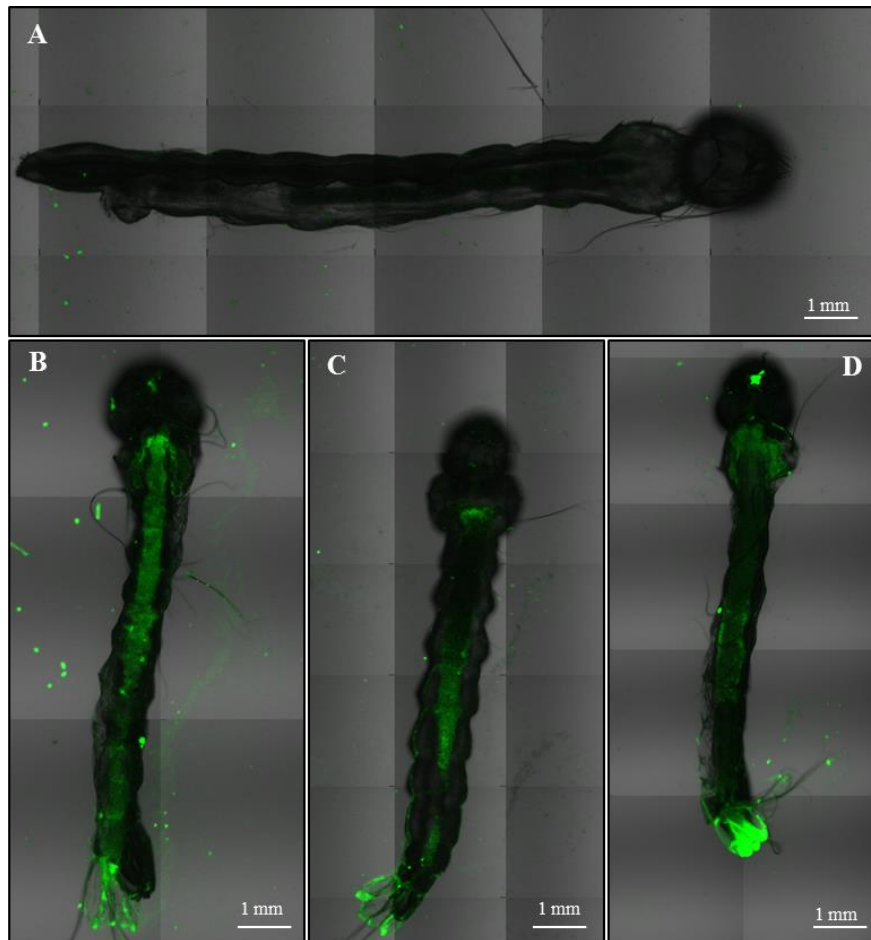
Figura 34 – Imagens de microscopia confocal da larva e dos segmentos larvais do *Aedes aegypti* – Incubação em Photogem[®].



Imagens de fluorescência da larva e de segmentos larvais do *Aedes aegypti* incubada por 12 horas no Photogem[®] 20μg/mL, vista em microscopia confocal. Na imagem A, verifica-se uma sobreposição das imagens com a fluorescência do FS e da larva, em B, a fluorescência de um dos segmentos abdominais da larva, em C, fluorescência do Photogem[®] dentro do segmento abdominal da larva, em D, sobreposição das imagens de fluorescência da larva e do FS. Barra de escala de 100 μm.

Observando as imagens de fluorescência realizadas com as larvas que foram expostas às três composições de cúrcuma (fluorescência entre 500- 600 nm), verificamos que essas substâncias, assim como o Photogem[®], acumularam-se ao longo de todo canal alimentar das larvas, após o período de incubação de 12 horas no escuro. Em contrapartida, nota-se que esses FSs permaneceram em contato apenas com o canal alimentar, não ocorrendo em outras regiões das larvas. As imagens de fluorescência das três composições de cúrcuma (CN, C e CS), estão representadas na **Figura 35**.

Figura 35 – Imagens de microscopia confocal em larvas do *Aedes aegypti* – Incubação em cúrcuma.



Imagens de fluorescência de larvas do *Aedes aegypti* incubadas por 12 horas em cúrcuma 25 $\mu\text{g/mL}$, vista em microscopia confocal. Na imagem A verifica-se o controle, em B, a fluorescência da cúrcuma natural (CN), em C, a fluorescência da curcumina (C) e em D, a fluorescência da curcumina em sacarose (CS). Barra de escala de 1 mm.

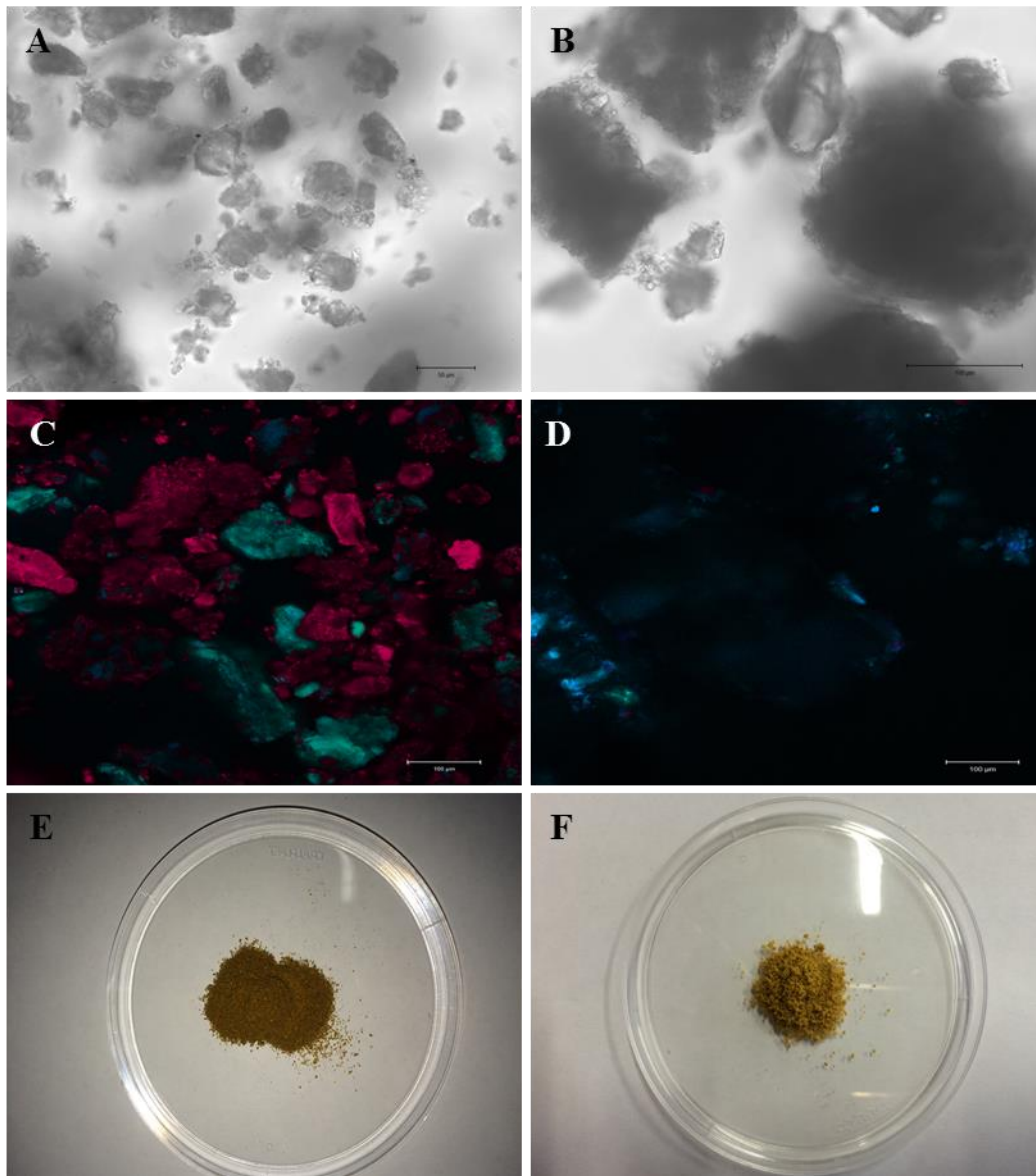
7.2. Segunda etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: incorporação da cúrcuma (CN, C e CS) em ração, obtendo-se um pó liofilizado

7.2.1. Caracterização das rações (puras e liofilizadas com os fotossensibilizadores): análise em microscópio confocal

De acordo com as observações das imagens obtidas por microscopia confocal, as rações puras, sem os FSs, apresentaram diferenças nas suas dimensões de partículas. As partículas referentes à ração A, apresentou diâmetros médios de 50 μm , enquanto que a ração B obteve partículas com diâmetros superiores a 150 μm . Através das imagens de fluorescência representadas na **Figura 36**, observamos para a ração A, uma

fluorescência na região entre 450 - 650 nm e outra na região entre 650 - 800 nm (**Figura 36**, em C). Na ração B, foi perceptível apenas um sinal de fluorescência na região do 450 - 650 nm (**Figura 36**, em D), que coincide com a região de fluorescência emitida pelas larvas do *Aedes aegypti*. A fluorescência encontrada para a ração A, na região entre 650 - 800 nm deve-se à presença de pigmentos empregados ao alimento no seu processo de fabricação.

Figura 36 - Imagens de microscopia óptica das rações A e B

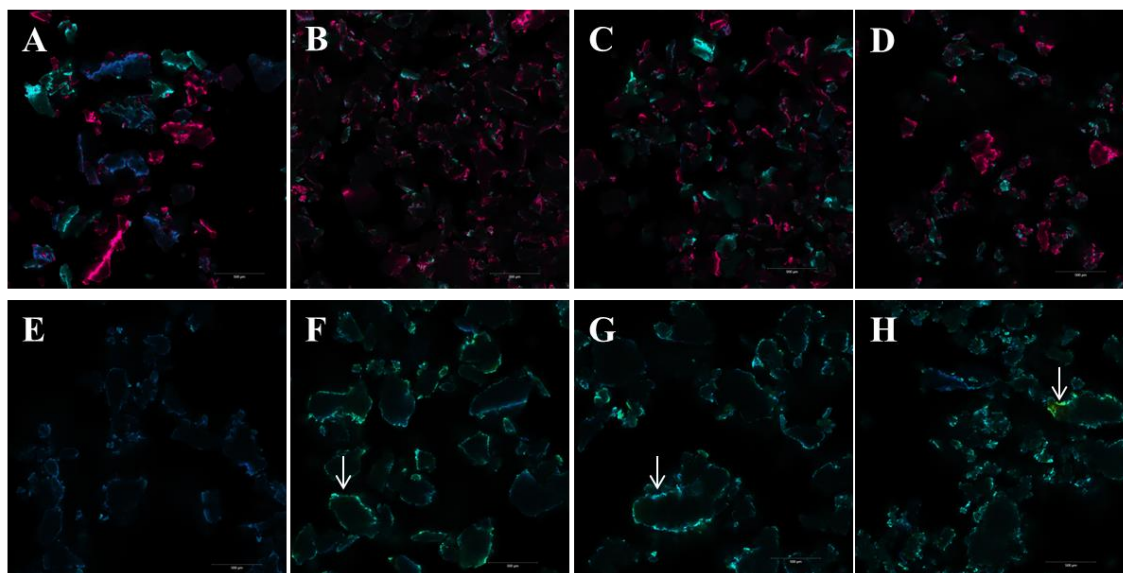


Imagens de microscopia óptica das rações A (AlconBASIC®) e B (Magnus cat), na forma pura, sem a presença dos FSs. A imagem A, representa a imagem da ração A em campo claro, em B, ração B em campo claro, em C, fluorescência da ração A (duas regiões de fluorescência, uma entre 450-650 nm e outra entre 650-800 nm), em D, fluorescência da ração B entre 650-800 nm, em E, imagem da ração A (controle) e F, imagem da ração B (controle). Barra de Escala de 100 µm (B e D) e 50 µm (A e C).

As imagens de fluorescência do pó liofilizado, com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS) em ração A e B estão representadas na **Figura 37**. Através da observação das imagens de fluorescência, não foi possível observar a incorporação dos FSs na ração A (**Figura 37**, em B, C e D), quando em comparação com o controle (**Figura 37**, em A). Em contrapartida, a incorporação é observada nas imagens da ração B, apresentando uma fluorescência mais intensa das três composições de cúrcuma nas

bordas das rações (**Figura 37**, setas em F, G e H), também em comparação com o controle (**Figura 37**, em E).

Figura 37 - Imagens de fluorescência das rações A e B liofilizadas com cúrcuma (CN, C e CS).



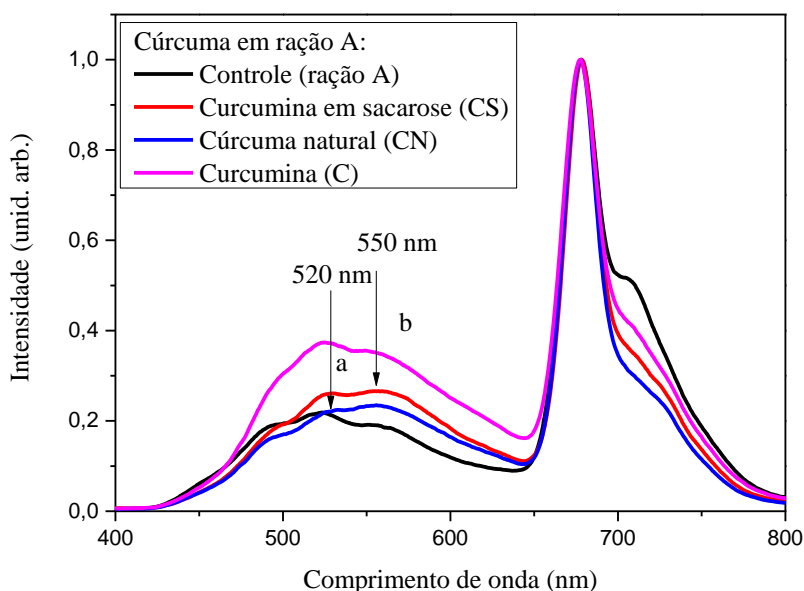
Imagens de fluorescência das rações A e B, incorporadas nas três composições de cúrcuma (CN, C e CS), sendo em A, o controle da ração A (ração pura), em B, ração A incorporada em cúrcuma natural, em C, ração A em curcumina, em D, ração A em curcumina com sacarose, em E, o controle da ração B (ração pura), em F, ração B incorporada em cúrcuma natural, em G, ração B em curcumina e em H, ração B em curcumina com sacarose. As setas representam a incorporação das composições de cúrcuma na ração B.

Através dos espectros de fluorescência das rações liofilizadas (**Figura 38** e **Figura 39**), foi possível observar uma alteração espectral naquelas rações que receberam as três composições de cúrcuma, quando comparadas com os espectros de fluorescência da ração na sua forma pura (controle). Com essa mudança espectral, pode-se dizer que as rações absorveram as três composições de cúrcuma, ocorrendo incorporação desses FSs nas rações A e B.

O espectro de fluorescência do pó liofilizado, constituído de ração A e curcumina (C) (**Figura 38**, espectro em rosa), mostra um aumento da intensidade de fluorescência, quando comparado com o espectro de fluorescência da ração A na sua forma pura (controle) (**Figura 38**, espectro em preto). Essa alteração na intensidade de fluorescência mostra que a curcumina foi eficientemente incorporada à ração A. Em contrapartida, nos espectros de fluorescência da ração A com a cúrcuma natural (**Figura 38**, espectro em azul) e a curcumina em sacarose (**Figura 38**, espectro em vermelho),

ocorre uma alteração espectral, ou seja, um deslocamento da banda de emissão de fluorescência no 520 nm (controle) (**Figura 38**, seta a) para o 550 nm (ração A com cúrcuma natural e curcumina) (**Figura 38**, seta b), indicando desta forma que ocorreu a incorporação desses FSs em ração A. Os espectros da ração A liofilizada com as três composições de cúrcuma e o espectro da ração A na forma pura (controle), estão representados na **Figura 38**.

Figura 38 – Espectros de fluorescência normalizados da cúrcuma natural (CN), curcumina (C) e curcumina em sacarose (CS), incorporadas em ração A.

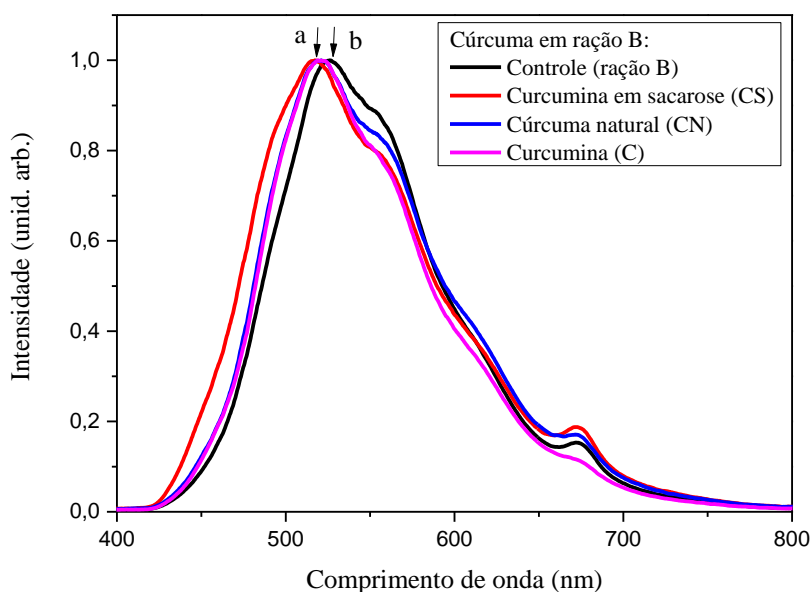


Espectros de fluorescência da ração A na sua forma pura (controle) e da ração A liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS). O espectro de fluorescência da ração A na sua forma pura (controle) está representado pela seta a, com banda de emissão no 520 nm e os espectros das rações liofilizadas com cúrcuma natural e curcumina em sacarose estão representados pela seta b, que após a incorporação dos FSs ocorre mudança espectral com banda de emissão de fluorescência no 520 nm para o 550 nm.

Analisando os espectros de fluorescência do pó liofilizado, constituído de ração B, foi possível verificar para as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), uma mudança espectral na emissão de fluorescência após a incorporação dos FSs, mostrando que esses compostos foram incorporados na ração B. A ração na sua forma pura (controle), apresentou banda de emissão no 525 nm (**Figura 39**, seta b), enquanto que as rações liofilizadas com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), apresentaram bandas de emissão no 520 nm (**Figura 39**, seta b). Vale ressaltar, nestas condições, que

dependendo dos meios de incorporação da cúrcuma e solubilização desses FSs, eles podem apresentar regiões de emissão de fluorescência diferentes. Os espectros apresentados na **Figura 39**, mostram a mudança espectral ocorrida após a incorporação dos FSs na ração B.

Figura 39 - Espectros de fluorescência normalizados da cúrcuma natural (CN), curcumina (C) e curcumina em sacarose (CS), incorporadas em ração B.



Espectros de fluorescência da ração B na sua forma pura (controle) e da ração B liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS). O espectro de fluorescência da ração B na sua forma pura (controle) está representado pela seta b, com banda de emissão no 525 nm e os espectros de fluorescência das rações liofilizadas estão representados pela seta a, com banda de emissão no 520 nm.

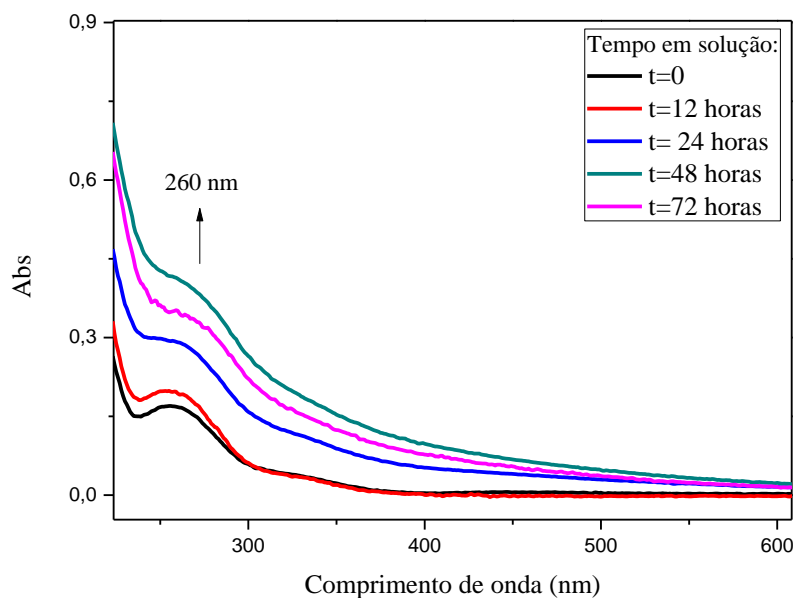
7.2.2. Caracterização das rações: ensaios de liberação das composições de cúrcuma em solução (ração liofilizada)

Analisando os gráficos de absorção da solução onde as rações liofilizadas foram deixadas por um período de 72 horas, foi possível observar que não ocorreu a liberação de nenhuma das composições de cúrcuma (CN, C e CS) em água. Através dos espectros de absorção da solução contendo o pó liofilizado constituído de ração A e cúrcuma natural (**Figura 40**), nota-se que não ocorre a formação da banda de absorção característica da CN (em 420 nm), para todos os tempos em que as medidas foram realizadas. Em contrapartida foi possível verificar o aparecimento de uma banda de

absorção na região do 260 nm (**Figura 40**, seta), que pode corresponder à outros compostos liberados pela ração A na sua forma pura. O grupo controle, que recebeu unicamente a ração A em solução (sem a incorporação do FS), também apresentou uma banda de absorção na região do 260 nm ao longo do experimento (**Figura 41**).

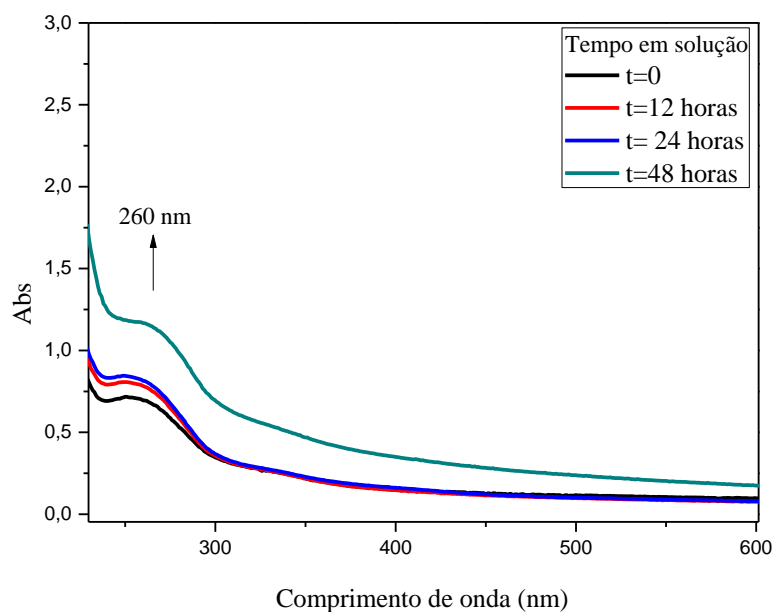
Os gráficos referentes às rações liofilizadas com as demais composições de cúrcuma (C e CS) e ração A, não foram apresentados por terem repetido o mesmo perfil de liberação do pó liofilizado com a CN.

Figura 40 – Espectros de absorção da solução com ração A liofilizada com cúrcuma natural.



Espectros de absorção da solução onde foi mantido o pó liofilizado de ração A com a cúrcuma natural. As medidas de absorção foram realizadas nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas após o início do experimento. A seta representa a formação das bandas de absorção na região do 260 nm.

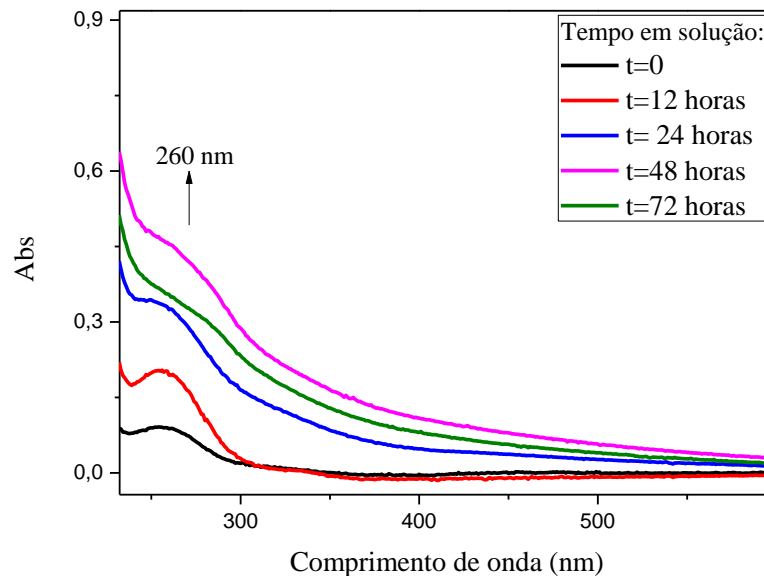
Figura 41- Espectros de absorção da solução com razão A (controle)



Espectros de absorção da solução onde foi mantida a razão A na sua forma pura (controle). As medidas de absorção foram realizadas nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas após o início do experimento. A seta representa a formação das bandas de absorção na região do 260 nm.

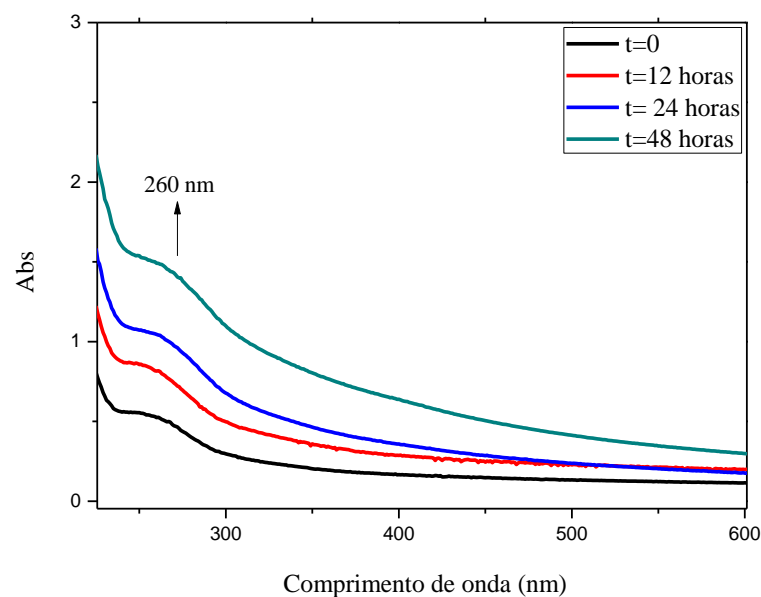
Os resultados de liberação em solução das três composições de cúrcuma (CN, CI e CS) incorporadas em razão B, foram os mesmos obtidos pela razão A, ou seja, não ocorreu liberação dos FSs em água, até 72 horas após o início do experimento. Analisando o gráfico de absorção da solução onde esteve presente a razão B liofilizada com a cúrcuma natural, foi possível observar a formação de uma banda de absorção na região do 260 nm (**Figura 42**), a mesma encontrada nos experimentos realizados com a razão A. Os espectros de absorção dos controles (**Figura 43**), mostraram que a razão B, na sua forma pura, libera em água a mesma substância liberada pelas razões liofilizadas com os FSs, com banda de absorção no 260 nm. Os gráficos referentes às razões liofilizadas com as demais composições de cúrcuma (C e CS) e razão B, não foram apresentados por terem repetido o mesmo perfil de liberação do pó liofilizado com a CN.

Figura 42- Espectros de absorção da solução com ração B liofilizada com cúrcuma natural.



Espectros de absorção da solução onde foi mantido o pó liofilizado de ração B com a cúrcuma natural. As medidas de absorção foram realizadas nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas após o início do experimento. A seta representa a formação das bandas de absorção na região do 260 nm.

Figura 43 - Espectros de absorção da solução com ração B (controle)



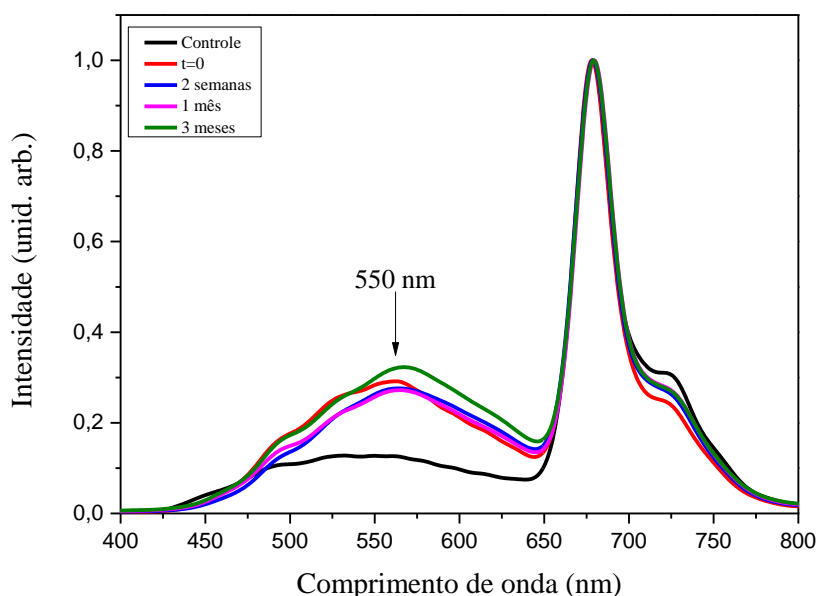
Espectros de absorção da solução onde foi mantida a ração B na sua forma pura (controle). As medidas de absorção foram realizadas nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas após o início do experimento. A seta representa a formação das bandas de absorção na região do 260 nm.

7.2.3. Caracterização das rações: análise de estabilidade preliminar das rações liofilizadas armazenadas em temperatura de 2° a 8° C

Nesta seção, os estudos foram realizados com o objetivo de avaliar um determinado período de tempo em que os FSs permaneceriam estáveis nas rações (ração A e ração B), armazenadas em geladeira com temperatura entre 2 a 8° C . Os espectros de fluorescência das rações liofilizadas foram investigados imediatamente após o seu preparo, realizando novas medidas após um período de 2 semanas, 1 mês e 3 meses.

Analisando os espectros de fluorescência do pó liofilizado, constituído de ração A e curcumina (C), nota-se ao longo do experimento, que essa formulação manteve-se estável por 3 meses, não ocorrendo desta forma, uma mudança expressiva nos espectros de fluorescência neste período de tempo. Os resultados dos estudos de estabilidade da curcumina (C) incorporada em ração A, estão representados na **Figura 44**.

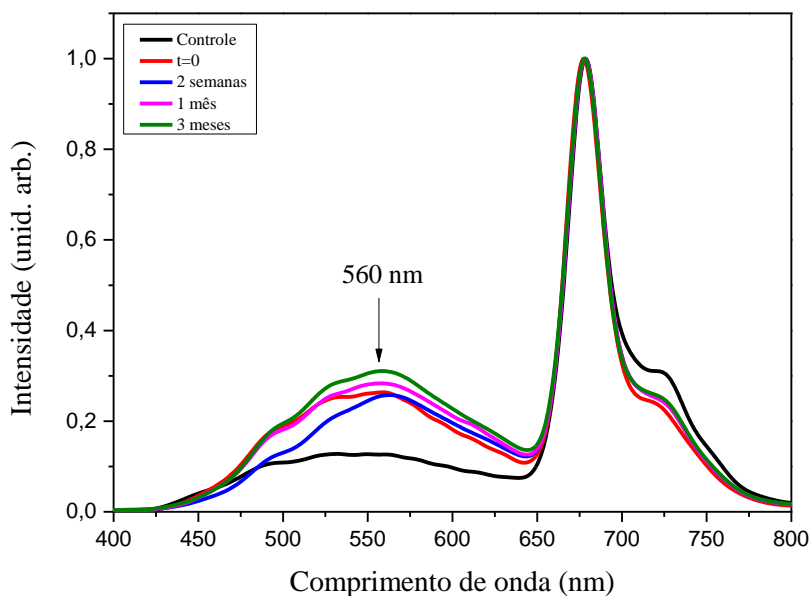
Figura 44 - Espectros de fluorescência normalizados da curcumina (C) incorporada em ração A.



Espectros de fluorescência da curcumina (C) incorporada em ração A, armazenada em geladeira por 3 meses. As medidas de fluorescência foram realizadas nos tempo 0, 2 semanas, 1 mês e 3 meses. A seta representa o espectro de fluorescência da ração A liofilizada com curcumina (C), com banda de emissão em torno de 550 nm.

A **Figura 45**, mostra os espectros de fluorescência do pó liofilizado, constituído de ração A e cúrcuma natural (CN), para todos os tempos em que foram realizadas as medidas (0, 2 semanas, 1 mês e 3 meses). Analisando o gráfico, percebe-se ao longo do tempo que não ocorre mudança espectral nesta condição, mostrando que esta formulação também se mantém estável por 3 meses, após armazenamento em geladeira. A seta na **Figura 45**, representa a banda de emissão de fluorescência da ração A liofilizada com cúrcuma natural (CN), com banda de absorção na região do 560 nm.

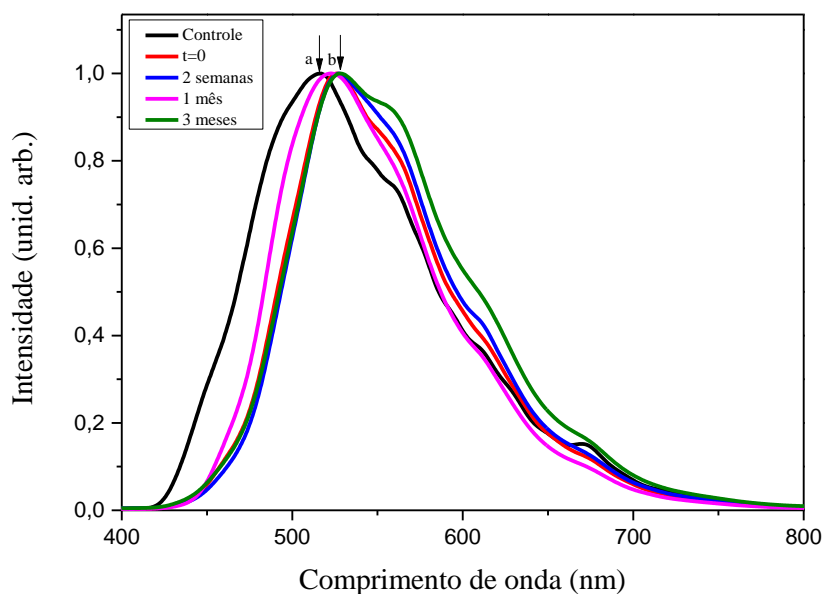
Figura 45 - Espectros de fluorescência normalizados da cúrcuma natural (CN) incorporada em ração A.



Espectros de fluorescência da cúrcuma natural (CN), incorporada em ração A, armazenada em geladeira por 3 meses. As medidas de fluorescência foram realizadas nos tempo 0, 2 semanas, 1 mês e 3 meses. A seta representa o espectro de fluorescência da ração A liofilizada com cúrcuma natural (CN), com banda de emissão em torno de 560 nm.

Os resultados dos experimentos de estabilidade utilizando o pó liofilizado, constituído de ração B e curcumina (C), encontram-se na **Figura 46**. Durante os intervalos de medida, após a incorporação da curcumina em ração B (2 semanas, 1 mês e 3 meses), também não se observou mudanças espectrais nesta condição, indicando que esta formulação permaneceu estável por 3 meses, armazenada em geladeira.

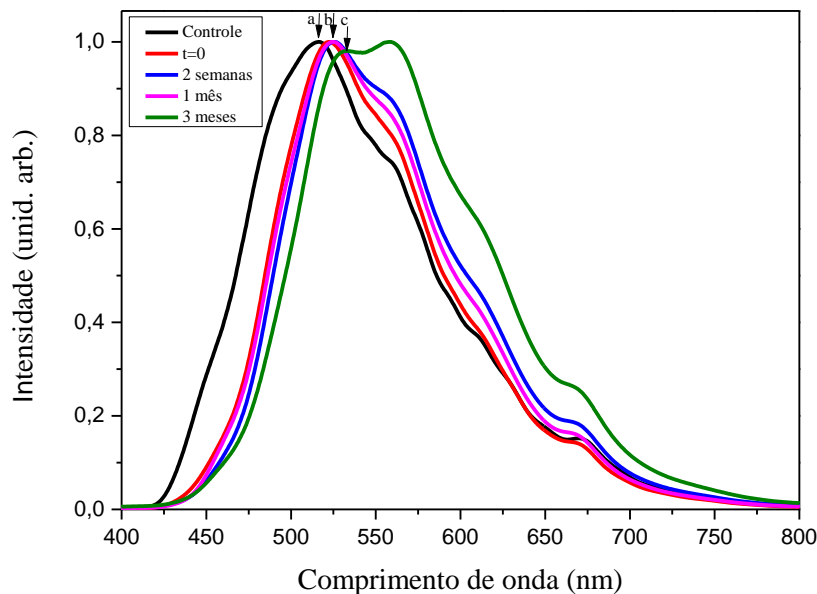
Figura 46 - Espectros de fluorescência normalizados da curcumina (C) incorporada em ração B.



Espectros de fluorescência da curcumina (C), incorporada em ração B, armazenada em geladeira por 3 meses. As medidas de fluorescência foram realizadas nos tempo 0, 2 semanas, 1 mês e 3 meses. A seta a representa o espectro de fluorescência da ração B (controle), com banda de emissão em torno de 516 nm e a seta b, o espectro de fluorescência da curcumina incorporada em ração B, com banda em torno em torno de 527 nm.

Na **Figura 47**, analisando os espectros de fluorescência do pó liofilizado constituído de ração B e cúrcuma natural (CN), nota-se que a formulação permanece estável até 1 mês após o seu preparo. Analisando o espectro obtido em 3 meses de experimento, cuja ração ficou armazenada em geladeira, é possível observar uma alteração no espectro, quando comparado as medidas realizadas em 2 semanas e 1 mês. A mudança do espectro de fluorescência, mostrada pela seta c (**Figura 47**), pode indicar a ocorrência de degradação desta formulação.

Figura 47 - Espectros de fluorescência normalizados da cúrcuma natural (CN) incorporada em ração B.



Espectros de fluorescência da cúrcuma natural (CN), incorporada em ração B, armazenada em geladeira por 3 meses. As medidas de fluorescência foram realizadas nos tempo 0, 2 semanas, 1 mês e 3 meses. A seta a representa o espectro de fluorescência da ração B (controle), com banda de emissão em torno de 516 nm, a seta b, o espectro de fluorescência da CN incorporada em ração B nas medidas de 2 semanas e 1 mês, com banda de emissão em torno de 527 nm, e a seta c o espectro de fluorescência da CN incorporada em ração B na medida de 3 meses, com banda de emissão em torno de 533 nm.

7.2.4. Mortalidade de larvas do *Aedes aegypti*

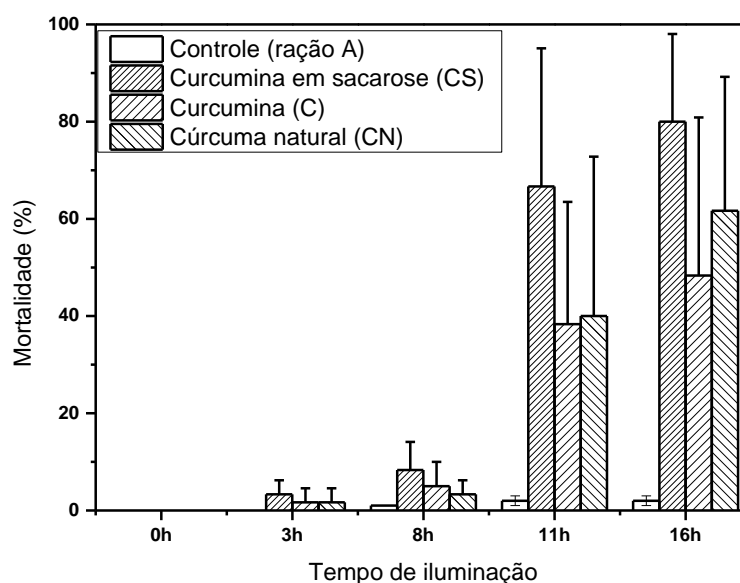
Os resultados da eficácia de inativação fotodinâmica utilizando rações liofilizadas com cúrcuma em larvas de *Aedes aegypti* foram representados na **Figura 48**, **Figura 49**, **Figura 50** e **Figura 51**. Assim como os experimentos utilizando os FSs na forma de solução, as rações liofilizadas com a cúrcuma demonstraram bons índices de mortalidade (superior a 80%), após 16 horas de exposição à luz solar.

Os resultados referentes à IFD, utilizando as três composições de cúrcuma em ração A, com período de incubação de 12 horas no escuro foram apresentados na **Figura 48**. Analisando o gráfico foi possível observar um aumento nos valores de mortalidade após um período de 8 horas de iluminação. Os valores de mortalidade encontrados nas 3 primeiras horas de experimento foram de 2%, 2% e 3% para a cúrcuma natural (CN), curcumina (C) e curcumina em sacarose (CS), respectivamente.

Em 8 horas de iluminação, os FSs apresentaram mortalidade de 3% (CN), 5% (C) e 8% (CS), e em 11 horas ocorreu um aumento desses valores de mortalidade, sendo de 39% (CN), 38% (C), 66% (CS). No final da exposição à luz solar, num período de iluminação de 16 horas, as porcentagens de mortalidade encontradas foram de 61%, 48% e 80%, para CN, C e CS (**Figura 48**). No escuro, as três composições de cúrcuma em ração A, não apresentaram atividade larvicida (mortalidade menor que 5%), mostrando ser atóxica nestas condições.

Apesar da curcumina em sacarose ter apresentado melhor atividade fotodinâmica em todos os tempos de iluminação (3, 8, 11 e 16 horas), não ocorreu diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as três composições de cúrcuma.

Figura 48 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando ração A liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), com período de incubação.

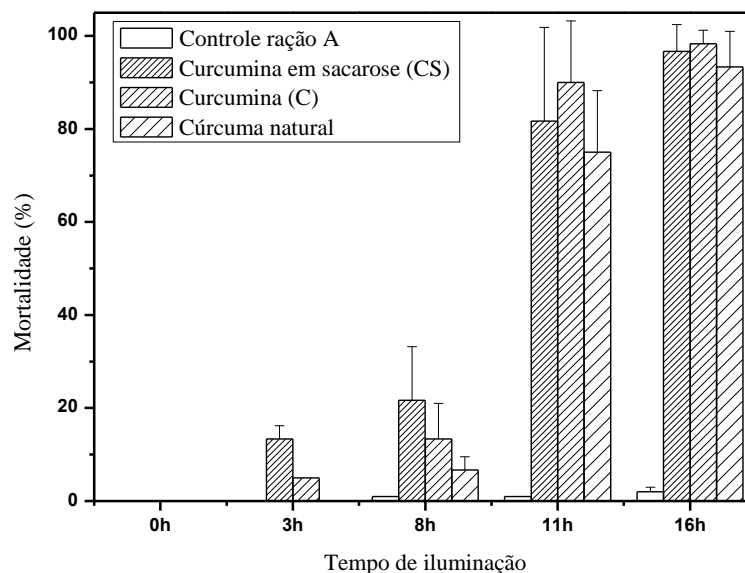


Porcentagem de mortalidade de larvas do *Aedes aegypti* utilizando ração A liofilizada com as três composições de cúrcuma. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural após período de incubação de 12 horas no escuro. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

Os grupos que não foram submetidos ao período de incubação no escuro, que receberam as três composições de cúrcuma incorporadas em ração A, apresentaram mortalidades de 5%, 3% e 0%, para cúrcuma natural (CN), curcumina (C) e curcumina em sacarose (CS), em 3 horas de iluminação. Em 8 horas de iluminação as porcentagens

de mortalidade foram de 6% (CN), 13% (C) e 21% (CS), e em 11 horas de 74% (CN), 89% (C) e 81% (CS). No final de exposição à luz solar, no período de iluminação de 16 horas, os valores de mortalidade encontrados foram de 93%, 98% e 96%, para cúrcuma natural (CN), curcumina (C) e curcumina em sacarose (CS), respectivamente. De acordo com a análise estatística, não encontramos diferença significativa na mortalidade de larvas entre as três composições de cúrcuma em todos os tempos (3, 8, 11 e 16 horas), bem como na mortalidade de larvas entre os grupos submetidos ou não ao período de incubação no escuro, no tempo de 16 horas de iluminação.

Figura 49 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando ração A liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), sem período de incubação.



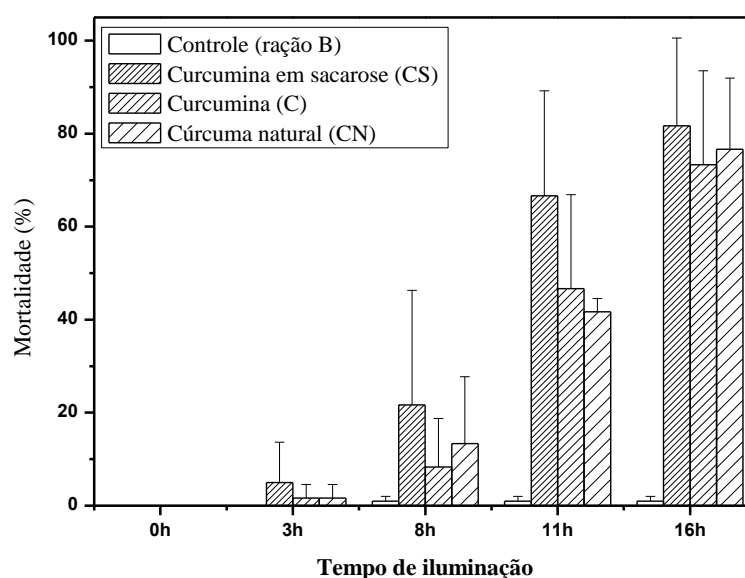
Porcentagem de mortalidade de larvas do *Aedes aegypti* utilizando ração A liofilizada com as três composições de cúrcuma. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural imediatamente após a aplicação das rações liofilizadas, sem período de incubação. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

Os resultados dos experimentos envolvendo a aplicação da ração B incorporada nas três composições de cúrcuma, com período de incubação de 12 horas no escuro estão representados na **Figura 50**. Analisando o gráfico, observamos que as porcentagens de mortalidade para 3 horas de exposição à luz solar foram de 1%, 1% e 5%, para a cúrcuma natural (CN), curcumina (C) e curcumina em sacarose. Em 8 horas de iluminação, ocorreu um aumento da mortalidade, sendo de 13%, 8% e 21%, para

CN, C e CS, respectivamente. Em 11 horas e 16 horas de exposição solar, foi possível observar alta mortalidade para CN, C e CS, sendo elas de 41%, 46%, 66% e 76%, 73% e 81%, respectivamente. No escuro, as três composições de cúrcuma em ração B, não apresentou atividade larvicida (mortalidade menor que 5%), mostrando não ser tóxica nestas condições.

Os testes estatísticos mostraram que não houve diferença significativa na mortalidade de larvas tratadas com as três composições de cúrcuma, em todos os tempos analisados (3, 8, 11 e 16 horas).

Figura 50 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando ração B liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), com período de incubação.

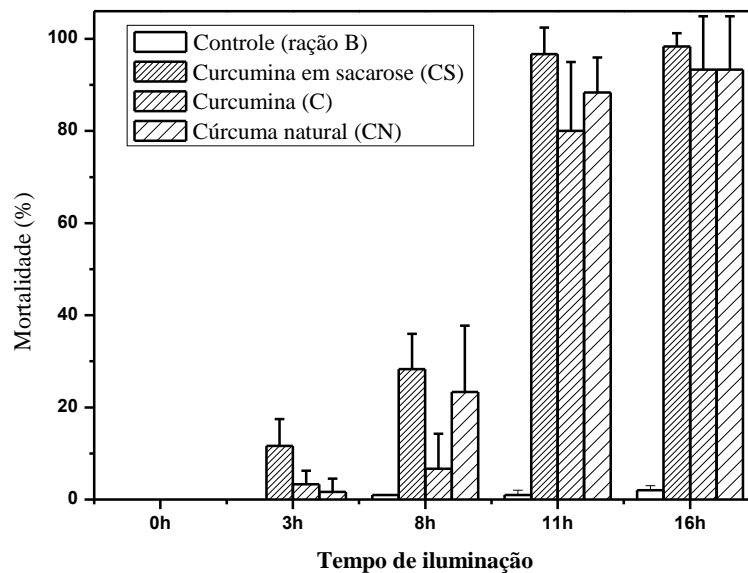


Porcentagem de mortalidade de larvas do *Aedes aegypti* utilizando ração B liofilizada com as três composições de cúrcuma. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural após período de incubação de 12 horas no escuro. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

Os resultados referentes à IFD, utilizando as três composições de cúrcuma em ração B, sem o período de incubação de 12 horas no escuro estão representados na **Figura 51**. Analisando o gráfico nota-se que esse grupo também exibiu baixa mortalidade nas primeiras 8 horas de experimento, sendo elas de 1%, 3% e 11%, em 3 horas de iluminação e 23%, 6% e 28%, em 8 horas de iluminação, para as respectivas composições de cúrcuma: CN, C e CS. Após as 8 horas de iluminação, os valores de

mortalidade foram de 96%, 80%, 88%, em 11 horas de iluminação e 98%, 93%, 93% em 16 horas de iluminação. De acordo com análise estatística, mais uma vez, não ocorreu diferença significativa na mortalidade de larvas entre os grupos submetidos ou não ao período de incubação no escuro, em 16 horas de iluminação, e também entre as composições de cúrcuma em todos os tempos avaliados (3, 8, 11 e 16 horas).

Figura 51 - Mortalidade do *Aedes aegypti* em função do tempo de iluminação utilizando ração B liofilizada com as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), sem período de incubação.



Porcentagem de mortalidade de larvas do *Aedes aegypti* utilizando ração B liofilizada com as três composições de cúrcuma. A irradiação das amostras foi realizada com luz natural imediatamente após a aplicação das rações liofilizadas, sem período de incubação. Os valores mostrados nos gráficos são as médias e as barras representam o desvio padrão.

8. DISCUSSÃO

8.1. Primeira etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: fotossensibilizadores aplicados diretamente em meio aquoso

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar os efeitos fototóxicos dos FSs contra larvas de insetos, neste caso, as larvas do *Aedes aegypti*. Para isto, fez-se uso de substâncias em condições não nocivas para o homem e ao meio ambiente, que quando iluminadas, provocariam uma diminuição expressiva na sobrevivência das larvas. O Photogem[®] e as variações moleculares de cúrcuma, em especial a curcumina (C) e a curcumina em sacarose (CS), demonstraram possuir, em menor ou em maior escala, alta atividade fotolarvicida contra o *Aedes aegypti*.

Neste trabalho, os estudos iniciais de IFD consistiram em determinar uma veiculação adequada para o Photogem[®] aplicado na forma de solução, para que se promovesse uma rápida internalização deste FS nas larvas do *Aedes aegypti*, garantindo assim uma alta mortalidade quando esses organismos estivessem em contato com a luz. Para isto, as larvas receberam duas fontes alimentares que foram dispersas nas soluções de Photogem[®], denominadas ração A, com tamanhos de partículas em torno de 50 µm e ração B, com tamanhos de partículas superiores a 150 µm.

De acordo com os resultados obtidos utilizando ração A ou B, aplicadas nas soluções de FS, a ração A em específico, exibiu altas porcentagens de mortalidade em comparação com os experimentos realizados com a ração B. Algumas abordagens são encontradas na literatura, para explicar esse acontecimento. Em trabalhos realizados por Clements (1992), foi avaliado o mecanismo de alimentação de larvas de insetos pertencentes à família Culicidae, variando o tamanho das partículas que foram ofertadas para esses organismos. Os resultados mostraram que partículas pequenas, com dimensões inferiores a 50 µm, são aquelas susceptíveis de serem captadas e ingeridas por larvas que utilizam o sistema de filtros na sua alimentação. Ainda de acordo com Clements (1992), as larvas que se alimentam por esse sistema de filtragem não discriminam qualitativamente as partículas a serem ingeridas, o que mostra que a ingestão pode depender exclusivamente das dimensões das partículas.^{59; 65} Neste estudo, podemos dizer então, que as larvas tenham ingerido mais partículas finas provenientes da ração A, do que àquelas provenientes da ração B, o que teria facilitado a internalização do FS dissolvido em meio aquoso. Sabe-se que larvas de Culicidae, ao

se alimentar de partículas dispersas no meio, acabam ingerindo concomitantemente um volume substancial de água.⁶⁵

Outra abordagem que pode ser discutida quanto aos tipos de rações que foram associadas ao Photogem[®], é questão da palatabilidade desses compostos.¹¹⁵ Fabris *et al* (2012), em um dos seus estudos de IFD em *Anopheles gambiae* e *Anopheles arabiensis*, associou dois diferentes tipos de partículas ao FS C12, uma porfirina. De acordo com o autor, essas partículas auxiliariam no transporte do FS até o tubo digestório das larvas. As partículas associadas ao C12 foram: *i*) partículas de Eudragit[®] (EU-C12), que consiste em um copolímero em forma de pó, muito utilizado para liberação controlada de fármacos e *ii*) partículas de Friskies[®] (CF-C12), uma ração comercial para gatos.

Os resultados mostraram que tanto EU-C12, como CF-C12, em condições de laboratório, provocaram alta mortalidade após o período de exposição solar, sendo que as larvas de *Anopheles arabiensis*, apresentaram maior resistência ao uso de CF-C12. Em contrapartida, quando EU-C12 e CF-C12 foram colocadas em competição com outros recursos alimentares, tal como partículas de ração comercial para peixes (TetraMin[®]), não ocorreu mortalidade com o uso de EU-C12, e uma mortalidade de 90% foi atingida utilizando CF-C12. Desta forma, o autor concluiu que em condições de campo, onde muitas vezes envolve outros recursos alimentares, como bactérias e microalgas, a EU-C12 não seria susceptível à IFD e enfatizou também, a importância da palatabilidade desses compostos para o desenvolvimento de novos larvicidas orais.¹⁹

A principal motivação em se utilizar moléculas derivadas de hematoporfirina, como o Photogem[®], contra as larvas do *Aedes aegypti*, partiu do princípio de muitas famílias desses FSs já serem conhecidas e exploradas no ramo da IFD contra pragas e insetos vetores.

Segundo Amor *et al* (1999), os derivados de porfirina, são desprovidos de qualquer citotoxicidade intrínseca na ausência de irradiação (como observado nos estudos com o Photogem[®]) e podem apresentar propriedades favoráveis para aplicações em criadouros reais de larvas. Os derivados de porfirina, por exemplo, são capazes de absorver a maioria dos comprimentos de onda próximos ao ultravioleta e, também, a porção visível do espectro solar emitido ao longo do dia. Como já mencionado, as porfirinas possuem uma intensa banda de absorção na região do violeta-azul, denominada banda de Soret, e outras regiões de absorção no visível (bandas-Q), isso faz com que grande parte da luz solar seja absorvida por essas moléculas, otimizando os efeitos da IFD.³⁴

Além da energia solar ser utilizada na IFD causando mortalidade larval, ela também induz a fotodegradação dos FSs num curto período de tempo, reduzindo desta forma às contaminações ambientais que poderiam ser provocadas por estas substâncias. Neste contexto, o Photogem[®] apresentou um tempo de degradação relativamente rápido quando exposto à luz solar, sendo o tempo de permanência das moléculas em solução de 48 horas. Este aspecto, mais uma vez se sobressai à utilização de inseticidas convencionais, que podem permanecer ativos no meio ambiente por longos períodos, afetando os ecossistemas. Outras observações importantes, relatadas por Jori *et al* (2000), é que os fotoprodutos originados da degradação de porfirinas não apresentam toxicidade contra uma variedade de sistemas biológicos e que vários ensaios toxicológicos comprovaram a segurança desses compostos à saúde humana.⁹¹ Ainda de acordo com Jori *et al* (2000), essas moléculas podem ser tóxicas se absorvidas em concentrações superiores a 100 mg/kg do peso corporal, o que é muito maior que a concentração necessária para causar alta toxicidade em larvas de insetos.³⁴

Nos estudos com o Photogem[®], a melhor mortalidade foi alcançada com a concentração de 80 µg/mL nas condições de iluminação natural, onde em meia hora obteve-se 100% de mortalidade. Em contrapartida, nas condições de iluminação artificial esse valor de mortalidade foi observado em um período de tempo mais longo, alcançando mortalidade total, após 24 horas de iluminação. Desta forma, podemos dizer que o fator responsável por essa variação na mortalidade, foi principalmente a diferença na irradiância emitida às amostras por cada fonte de luz e também pela diferença no espectro de emissão desses aparatos.

Neste trabalho, procuramos avaliar também duas condições diferentes de iluminação solar (período 1 e período 2), a fim de verificar a influência dessa variável sobre os valores de mortalidade das larvas expostas ao Photogem[®]. Esses resultados foram extremamente importantes para determinar a eficiência da IFD em dois tipos de criadouros de larvas: *i*) aqueles na presença de altas intensidades de luz e *ii*) aqueles encontrados em regiões com pouca entrega de luz, apresentando baixas intensidades. O Grupo 1, que foi submetido às condições de iluminação do período 1, atingiu alta mortalidade (superior a 80%) num período de tempo mais curto (2 horas) em relação ao Grupo 2, submetido às condições do período 2 (24 horas). Esse fato pode ser explicado, mais uma vez, pela alta intensidade de luz entregue ao FS no período 1, cuja irradiância solar média foi de 43 mW/cm² contra 9 mW/cm², referente ao período 2.

Apesar do grupo 2, ter alcançado alta mortalidade (superior a 80%) num período de tempo mais longo (24 horas), as condições de iluminação aplicadas à esse grupo mostraram que a IFD é eficaz até mesmo em baixas intensidades de luz. De acordo com um estudo realizado por Lucantoni *et al* (2011), áreas sombreadas ao ar livre, onde geralmente são encontrados os criadouros de larvas, apresentam intensidades de luz entre 1 a 9 mW/cm², que de acordo com os resultados encontrados para o período 2, é o suficiente para ocasionar alta mortalidade em larvas do *Aedes aegypti*.⁸⁶

De acordo com a literatura, várias moléculas semelhantes ao Photogem[®] foram avaliadas neste âmbito para eliminar larvas de insetos vetores, como por exemplo, a hematoporfirina (HP), substância pela qual o Photogem[®] é originado. Karunaratne *et al* (2005), testou os efeitos da HP contra larvas do terceiro instar do *Aedes aegypti*, em luz solar difusa (condição correspondente ao período 2 deste estudo), nas concentrações de 1,25, 2,5, 5,0, 10 e 20 µg/mL e obteve nesta última concentração uma mortalidade de 100%, após 24 horas de iluminação. Em nosso trabalho, o Photogem[®] apresentou mortalidade de 100%, na concentração de 80 µg/mL, também em 24 horas de iluminação (resultados representados na **Figura 20**). Karunaratne *et al* (2005), além de obter bons resultados da utilização da HP contra larvas do *Aedes aegypti*, também fez observações importantes quanto à susceptibilidade de alguns estágios das larvas em relação à técnica. Larvas de estágios mais avançados, por sua vez, apresentam uma cutícula corpórea mais espessa, dificultando a penetração da luz para a ativação do FS, portanto esses organismos são menos susceptíveis à fototoxicidade.¹⁸ No presente estudo, larvas de quarto estágio não apresentaram mortalidade em nenhuma das concentrações utilizadas para o Photogem[®], tanto na condição de luz artificial como na luz natural (dados não apresentados), o que corrobora também com os resultados obtidos pelo autor supracitado.

As atividades biológicas dos derivados de porfirina e hematoporfirina são conhecidas principalmente pela relação com suas estruturas moleculares. Sabe-se que FSs hidrofílicos são ineficientes para serem utilizados como fotolarvicidas, pois não possuem uma boa interação com a camada lipídica das membranas celulares e, conseqüentemente acabam não atravessando do meio extra-celular para o meio intra-celular. Compostos hidrofóbicos, em contrapartida, podem atravessar essas membranas e atingir outros compartimentos celulares, como o plasma, membranas mitocondriais e retículo endoplasmático rugoso, mas possui a desvantagem de formar agregados fotobiologicamente inativos, o que gera uma limitação quando sua aplicação se refere a

organismos aquáticos.^{34; 86} Os FSs anfifílicos, como o Photogem[®], são os que possuem melhor atividade fotolarvicida, pois podem atravessar as membranas biológicas e distribuir-se pelos tecidos. De acordo com essas informações e em observação a **Figura 33** (em C, seta), foi verificado que o Photogem[®] teve uma melhor distribuição dentro e fora do canal alimentar das larvas, o que possibilitou uma rápida resposta à IFD.

As imagens de fluorescência com o Photogem[®], por sua vez, mostraram que as larvas teriam ingerido prontamente a solução do FS. O FS acumulou-se na maior parte do trato digestório, mostrando uma fluorescência mais evidente nos cecos gástricos e intestino médio. Essas mesmas observações foram feitas por Lucantoni *et al* (2011), utilizando como FS uma porfirina catiônica (C14).⁸⁶ Além do estudo de localização e acumulação desses FSs em larvas de mosquitos, outros trabalhos foram realizados através de análises histopatológicas, a fim de avaliar o dano causado por esses FSs em determinadas estruturas e tecidos larvais. Em trabalhos realizados por Salama *et al* (2002) foram avaliadas, através de microscopia eletrônica, as regiões afetadas pelo efeito fotodinâmico da hematoporfirina em larvas de quarto estágio de *Culex pipiens*, irradiadas com luz artificial. A análise ultra-estrutural, por sua vez, mostrou diversas alterações causadas na cutícula, mitocôndrias, células epiteliais do intestino médio, membrana peritrófica, entre outras. Em vista da localização da hematoporfirina, a mesma encontrada para o Photogem[®] em larvas do *Aedes aegypti*, os danos encontrados por Salama *et al* (2002) em *Culex pipiens* poderiam ser os mesmos para este estudo, no entanto, essas avaliações seriam necessárias.¹¹⁴

Embora os efeitos desta primeira geração de FSs sejam muito efetivos para o controle de larvas do *Aedes aegypti*, ainda apresentam algumas dificuldades quanto à sua aplicação, devido ao alto custo de produção e distribuição, se tornando desta forma, inacessíveis para regiões mais carentes, que possuem maior incidência de doenças transmitidas por insetos vetores.¹⁰⁸ Em vista disso, surgiu a necessidade da busca por novos FSs, igualmente efetivos, que não provocassem danos a outros organismos e que fossem então, atrativos às questões socioeconômicas.

Atualmente, uma das tendências para se tratar a maioria destas preocupações é a prospecção de compostos naturais derivados de plantas com atividade larvicida, como por exemplo, os pigmentos curcuminóides, extraídos do rizoma da *Curcuma longa*. Os efeitos larvicida dessas substâncias já foram avaliados por Sagnou *et al* (2012) em larvas de *Culex pipiens*, no entanto, os resultados deste trabalhos revelaram pela primeira vez a alta eficácia da curcumina como um agente fotolarvicida contra larvas do

Aedes aegypti.¹⁰⁸ Embora existam muitos relatos na literatura mostrando a atividade larvicida da cúrcuma, poucos discutem a relação estrutura *versus* ação da luz de seus constituintes (pigmentos curcuminóides).

Ao contrário do Photogem[®], que apresentou mortalidade larval de 100% em 2 horas de exposição à luz solar (período 1) em todas as concentrações, a cúrcuma (em especial a curcumina e a curcumina em sacarose), apresentaram porcentagens semelhantes em torno de 8 horas de iluminação natural (período 1). Em contrapartida, para que se atingissem esses índices, foram necessárias concentrações inferiores àquelas utilizadas para o Photogem[®]. A cúrcuma natural (CN), por sua vez, não chegou a reduzir totalmente a sobrevivência das larvas tratadas em condições de iluminação artificial, apresentando um efeito fotodinâmico pouco eficaz, quando em comparada com as outras composições de cúrcuma nestas condições. De acordo com a análise estatística, nas condições de iluminação artificial, ocorreu diferença significativa entre a mortalidade final (25 µg/mL em 48 horas) dos grupos tratados com CN e CS, e CN e C ($p \leq 0,05$). Entre CS e C, não ocorreu diferença estatística nas mesmas condições, com $p > 0,05$.

Em trabalhos realizados por Sagnou *et al* (2012), foi testada a atividade larvicida dos pigmentos curcuminóides contra as larvas de *Culex pipiens*. Após 24 horas, a curcumina apresentou uma LC50 de 19,07 mg/L, enquanto que os outros pigmentos curcuminóides (demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina) apresentaram valores de LC50 superiores a 150 mg/L.¹⁰⁸ Isso serve para reforçar que a curcumina tem uma ótima atividade larvicida em comparação aos demais pigmentos curcuminóides. O trabalho de Sagnou *et al* (2012), sugere que a alta atividade larvicida da curcumina esteja relacionada com a presença de dois grupos metoxila ligados ao anel aromático, e que a baixa toxicidade apresentada pelos demais curcuminóides ocorreu principalmente pelo padrão de substituição do anel, que afetou de alguma forma a sua atividade nesses organismos. Essas informações podem ser utilizadas para explicar o baixo efeito produzido pela cúrcuma natural em condições de iluminação artificial, já que essa mistura de curcuminóides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina), apresenta em sua composição 50% de curcumina (C), sendo este curcuminóide o mais efetivo como larvicida/fotolarvicida.

Abbas *et al* (2015) também estudou a atividade larvicida dos pigmentos curcuminóides em larvas do *Aedes aegypti* e encontrou valores de LC50 de 2,5 ppm para a turmerona aromática, 8,7 ppm para bis-demetoxicurcumina, 50 ppm para a

curcumina e 60 ppm para a demetoxicurcumina.¹¹⁶ Os resultados encontrados pelo autor supracitado não corroboram com os resultados obtidos por Sagnou *et al* (2012), que obteve um valor de LC50 menor para a curcumina, e valores maiores de LC50 para os demais curcuminóides. As diferenças encontradas nestes estudos, são creditadas por Sagnou *et al* (2012) devido à diferença da origem e da composição do solo onde a cúrcuma foi cultivada. Contudo, acreditamos que esta diferença, pode estar relacionada também com outras condições experimentais, tais como, a variedade da raça utilizada na alimentação das larvas e a diferença no fotoperíodo apresentada nos dois trabalhos. Outro ponto importante é que nesses estudos, a influência da luz na mortalidade larval não é devidamente controlada.

No que tange aos experimentos realizados com iluminação natural, o grupo tratado com CN obteve mortalidade superior aos grupos expostos às condições de luz artificial, exibindo em 8 horas uma mortalidade de 78%, na concentração de 25 µg/mL. Em contrapartida, a mortalidade encontrada para o grupo que recebeu a CN e iluminação artificial foi inferior à 10%, nas mesmas condições. Isso, muito provavelmente tenha ocorrido devido à alta intensidade de luz emitida pelo Sol, que potencializou desta forma o efeito fotodinâmico desta substância. Nos estudos utilizando as três composições de cúrcuma (CN, C e CS), em iluminação natural, não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) na mortalidade final entre os grupos tratados (25 µg/ml, em 8 horas).

Algumas das dificuldades em se utilizar a cúrcuma para o controle integrado de vetores é que essas moléculas apresentam baixa solubilidade em água, pois possuem um caráter hidrofóbico.¹⁰³ Desta maneira, em alguns estudos empregamos a utilização de sacarose em curcumina (C), com a finalidade de melhorar as características de solubilidade dessa substância e reduzir os danos de solventes orgânicos, como o etanol e o DMSO, que poderiam ser provocados ao meio ambiente em futuras aplicações. Em outros trabalhos, como o de Awad *et al* (2008), a sacarose foi aplicada em combinação com outros FSs, com o objetivo de promover uma melhor internalização desses compostos por larvas de *Culex pipiens*, uma vez que os açúcares são conhecidos como estimulantes da alimentação para alguns insetos.¹⁰⁷ O autor em questão, testou a atividade fotodinâmica da hematoporfirina (HP) em sacarose contra larvas de *Culex pipiens* e observou um aumento da mortalidade larval nesta condição, quando comparado com a fórmula pura da HP, sugerindo assim um efeito sinérgico entre o FS e a sacarose. Esses resultados, no entanto, não corroboram com os estudos de IFD

utilizando curcumina e curcumina em sacarose, pois estes grupos não apresentaram diferença significativa nas porcentagens finais de mortalidade ($p > 0,05$). Em contrapartida, nos controles, a curcumina com sacarose foi a única composição de cúrcuma que apresentou alta toxicidade no escuro (**Figura 18**).

As composições de cúrcuma utilizadas neste estudo mostraram ter baixa estabilidade na luz, exibindo fotodegradação total em 3 horas de iluminação. Essa característica, mais uma vez, mostra-se favorável às questões ambientais, uma vez que essas moléculas são eliminadas rapidamente do meio ambiente. Apesar da fotodegradação desses FSs acontecer de forma rápida, estudos bem delineados com os produtos de fotodegradação são necessários, tanto em organismos não-alvo, como nas larvas do *Aedes aegypti*, a fim de avaliar os reais impactos que podem ser gerados em condições naturais nesses organismos.

8.2. Segunda etapa dos estudos de Inativação Fotodinâmica: incorporação da cúrcuma (CN, C e CS) em ração, obtendo-se um pó liofilizado

A incorporação de FSs com tipos específicos de iscas, como rações, vem provando aperfeiçoar a forma de aplicação desses compostos contra larvas de insetos vetores, uma vez que sua aplicação na forma de solução pode não ser viável para alguns tipos de criadouros. Com base nisto, o nosso estudo realizou a incorporação das três composições de cúrcuma (CN, C e CS) em dois tipos de ração, ração A e ração B, obtendo desta forma, um produto na forma de um pó liofilizado. Através de imagens de fluorescência e análises espectrais, observamos que as composições de cúrcuma foram absorvidas de forma eficiente pelas rações utilizadas no estudo.

De acordo com Lucantoni *et al* (2011), a utilização de formulações que contem em sua composição o FS e o alimento larval, pode ser mais interessante para a aplicação prática do que o uso de FSs na sua forma pura em solução. Esse fato pode ser explicado pelas larvas do *Aedes aegypti* viverem muitas vezes em ambientes com água limpa, apresentando escassez de matéria orgânica. A deposição de FSs incorporados em alimentos seria então um atrativo para as larvas, que passariam a ingerir esses FSs em maiores quantidades, provocando assim melhor efetividade da técnica. Além disso, esta forma de aplicação pode ser mais seletiva quanto às larvas e mais segura quanto a outras formas de vida que podem coexistir nos criadouros com as larvas do *Aedes aegypti*. Ainda quanto à seletividade, podemos dizer que essas formulações podem ter suas

características físicas ajustadas ao comportamento alimentar de uma determinada espécie de inseto, como por exemplo, desenvolver um fotolarvicida com dimensões de partículas específicas para um organismo que está adaptado a uma alimentação na camada superficial da água.

Em vista dos estudos realizados com as rações liofilizadas, obtivemos resultados promissores para a aplicação destes compostos contra larvas do *Aedes aegypti*, que em 16 horas de exposição à luz solar apresentou mortalidade superior a 90%. Observando os gráficos de mortalidade pode-se dizer que tanto a ração A, como a ração B, empregadas no FS, foram efetivas, não apresentando diferença estatística em 16 horas de iluminação ($p > 0,05$). A ração A, no entanto, por apresentar pigmentos em sua composição pode não ter absorvido de forma eficiente o FS, porém suas partículas por apresentarem as menores dimensões podem ter facilitado o processo de ingestão pelas larvas. Já a ração B, como mostra a **Figura 37**, apresentou uma absorção mais eficiente em relação à ração A, porém as dimensões das suas partículas podem ter sido desfavoráveis no processo de ingestão.

Outra consideração importante a se fazer é em relação ao tempo de incubação que as larvas permaneceram em contato com as rações liofilizadas. Os resultados desses experimentos mostraram que tanto as larvas que ficaram em contato por 12 horas com a formulação, como aquelas que receberam o composto e foram expostas imediatamente ao Sol, apresentaram valores de mortalidade semelhantes ($p > 0,05$), mostrando desta forma que o tempo de incubação não é essencial para a efetividade da técnica nestas condições. Finalmente, podemos concluir com os ensaios de liberação destes compostos, que o FS teve uma boa interação com as rações, não sendo liberados em solução durante um período de 72 horas, o que mais uma vez, sugere que esses compostos terão baixo impacto sobre o meio ambiente.

9. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstraram que tanto o Photogem[®], como os derivados de cúrcuma (em especial a curcumina e curcumina em sacarose) tiveram um efeito fotodinâmico potente contra as larvas do *Aedes aegypti*.

Em relação à forma de entrega dos FSs, concluímos que em solução, esses compostos são capazes de promover altas porcentagens de mortalidade em comparação aos resultados obtidos através da utilização dos FSs incorporados em ração (pó liofilizado). No entanto, a aplicação desses compostos em solução, pode se tornar inviável quanto ao tipo de criadouro a ser tratado, podendo afetar outras formas de vida que estejam presentes neste ambiente. Os FSs incorporados na ração, por sua vez, podem promover maior seletividade quanto às larvas do *Aedes aegypti*. No caso dos experimentos em solução também observados que a mortalidade é extremamente depende do tipo de alimento ofertado à larva. Na comparação entre dois tipos específicos de ração, observamos que um tipo de ração (ração A) promove uma mortalidade mais eficiente.

A efetividade da IFD contra as larvas do *Aedes aegypti*, foi verificada tanto em condições com altas intensidades de luz (período 1), como em condições com baixas intensidades de luz (período 2 e lâmpada fluorescentes), comprovando a viabilidade da técnica em criadouros de larvas que recebem baixa incidência de luz.

A visualização das larvas em microscopia confocal mostrou uma distribuição dos FSs (Photogem[®] e as composições de cúrcuma) em várias regiões do trato digestório desses organismos, indicando que os danos da IFD teriam ocorrido nestas regiões, provocando a mortalidade do *Aedes aegypti*.

Neste estudo também verificamos que os FSs são degradados à medida que são expostos à luz, apresentando maior degradação em condições de iluminação com altas intensidades. A rápida degradação desses FSs é um fator positivo para a aplicação da IFD no controle de vetores, pois esses compostos serão eliminados rapidamente do ambiente, não oferecendo riscos a outros organismos.

Embora os estudos de IFD em larvas do *Aedes aegypti* tenham sido promissores em condições de laboratório, estudos em criadouros reais são necessários para avaliar a verdadeira efetividade da técnica nessas condições. Neste sentido, novas pesquisas também precisam ser elaboradas para o melhoramento do desenho experimental da

formulação contendo o FS, para que estes possam ser entregues de forma mais efetiva e seletiva em criadouros de larvas do *Aedes aegypti*.

10. REFERENCIAS

- 1 FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: identificação, biologia, epidemiologia.** São Paulo: EDUSP, 2002.
- 2 HENCHAL, E.; PUTNAK, J. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, Oct. 1990. ISSN 0893-8512.
- 3 GUBLER, D. Cities spawn epidemic dengue viruses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 2, p. 129-130, Feb. 2004. ISSN 1078-8956.
- 4 WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** Geneva : World Health Organization, 2009.
- 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, dez.2007.
- 6 BARATA-SILVA, C. et al. Exposição ocupacional ao difluobenzuron: avaliação de metemoglobina após a jornada de trabalho dos guardas de endemias atuantes na região do grande Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 22, p. 142-9, 2014.
- 7 BOYCE, R. et al. Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 5, p. 564-577, May 2013. ISSN 1360-2276.
- 8 SCHNEPF, E. et al. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-, Sep. 1998, ISSN 1092-2172.
- 9 CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C. Mosquitocidal bacterial toxins: diversidade, mode of action and resistance phenomena. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, p. 201-206, 2000.
- 10 FEDERICI, B. et al. Recombinant bacteria for mosquito control. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 21, p. 3877-3885, Nov. 2003. ISSN 0022-0949.
- 11 ARAÚJO, A. P. D. **Análise da resistência a inseticidas químicos em populações de Aedes aegypti (Diptera: culicidae), de municípios do estado de Pernambuco.** 2013. p.120 Teses de Doutorado - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Recife, 2013.
- 12 MINISTÉRIO DA SAÚDE: FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. **Dengue – instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas - 3º edição**, Brasília: Ministério da Saúde, 84p. 2001
- 13 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 160 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 978-85-334-1602-4
- 14 GARCEZ, W. S. et al. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra Aedes aegypti. **Revista Virtual de Química**. 5: 363-393 p. 2013.

-
- 15 WILKE, A. B. B. et al . Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. **Revista de Saúde Pública**. v. 43: 869-74 p. 2009.
- 16 DONDJI, B. et al. 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, Jul 2005. ISSN 0022-2585.
- 17 KARUNARATNE, V. et al. Phototoxic effect of some porphyrin derivatives against the larvae of *Aedes aegypti*, a major vector of dengue fever. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 170-173, Jul.2005. ISSN 0011-3891.
- 18 FABRIS, C. et al. Efficacy of sunlight-activatable porphyrin formulates on larvae of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *An. arabiensis*: A potential novel biolarvicide for integrated malaria vector control. **Acta Tropica**, v. 123, n. 3, p. 239-243, Sep 2012. ISSN 0001-706X.
- 19 SCHUITMAKER, J. et al. Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 34, n. 1, p. 3-12, Jun. 1996. ISSN 1011-1344.
- 20 TRIESSCHEIJN, M. et al. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034-1044, 2006. ISSN 1083-7159.
- 21 BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 8, p. 497-508, Aug. 2004. ISSN 1470-2045.
- 22 JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 468-481, Jun 2006. ISSN 0196-8092.
- 23 CALIN, M. A.; PARASCA, S. V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 453-460, May 2009. ISSN 0268-8921.
- 24 PERLIN, M. et al. Photodynamic inactivation of influenza and herpes viruses by hematoporphyrin. **Antiviral Research**, v. 7, n. 1, p. 43-51, Jan 1987. ISSN 0166-3542.
- 25 NITZAN, Y.; WEXLER, H. M.; FINEGOLD, S. M. Inactivation of anaerobic-bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin. **Current Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 125-131, Sep. 1994. ISSN 0343-8651.
- 26 DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, Jun 17 1998. ISSN 0027-8874.
- 27 LUKSIENE, Z.; PECIULYTE, D.; LUGAUSKAS, A. Inactivation of fungi in vitro by photosensitization: Preliminary results. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 11, n. 2, p. 215-220, 2004. ISSN 1232-1966.
- 28 GIESE, A. C. Protozoa in photobiological research. **Physiological Zoology**, v. 26, n. 1, p. 1-22, 1953 1953. ISSN 0031-935X.
- 29 GOBLE, F. C.; BOYD, J. L. Action of certain tetrapyrrole derivatives in experimental trypanosoma-congolense infections. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 100, n. 4, p. 745-750, 1959. ISSN 0037-9727.
-

- 30 SOUZA, L. M.; PRATAVIEIRA, S.; INADA, N. M.; KURACHI, C.; CORBI, J.; GUIMARÃES, F. E. G.; BAGNATO, V. S. Efficacy of photodynamic therapy against larvae of: confocal microscopy and fluorescence-lifetime imaging. In: **Proceedings of SPIE BiOS**, San Francisco: OSA, 2014. p. 89472D.
- 31 ELIANA ALVES, M. A. F. F., MARIA G.P.M.S. NEVES, ÂNGELA CUNHA, HELENA NADAIS, ADELAIDE ALMEIDA,. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 22, p. 34-57, 2015.
- 32 AZIZULLAH, A. et al. Chlorophyll derivatives can be an efficient weapon in the fight against dengue. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4321-4326, Dec. 2014. ISSN 0932-0113.
- 33 BEN AMOR, T.; JORI, G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 10, p. 915-925, Oct 2000. ISSN 0965-1748.
- 34 GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, Jul-Aug 2002. ISSN 0188-4409.
- 35 LIMA, M. D. R. Q. **Antígeno NS1 dos Vírus Dengue: desempenho de testes disponíveis comercialmente e aplicações alternativas para o diagnóstico precoce das infecções por dengue**. 2014. 198 (Doutorado). INSTITUTO OSWALDO CRUZ, Rio de Janeiro.
- 36 BARTZOKAS, C. A. A WORLD GEOGRAPHY OF HUMAN-DISEASES - HOWE,GM. **Social Science & Medicine Part E-Medical Psychology**, v. 15, n. 1, p. 95-95, 1981 1981. ISSN 0271-5384.
- 37 GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symposium**, 16-22, 71-3, 251-3. 2006.
- 38 GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-485, Jul 1998. ISSN 0893-8512.
- 39 RUSH, B. Reprints of historical interest - an account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780 (reprinted from medical inquiries and observations, vol 2, 1809). **American Journal of Medicine**, v. 11, n. 5, p. 546-550, 1951 1951. ISSN 0002-9343.
- 40 GUBLER, D.; CLARK, G. Dengue hemorrhagic-fever - the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55-57, Apr-Jun 1995.
- 41 SILER, J. F.; HALL, M. W.; HITCHENS, A. P. Transmission of dengue fever by mosquitoes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 23, n. 3, p. 197-201, Dec 1925. ISSN 0037-9727.
- 42 GRAHAM, H. **The dengue: a study of its pathology and mode of propagation**. 1903.
- 43 SILER JF, H. M., HITCHENS AP. **Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention**. 1926. 3-22.
-

- 44 SOUZA, R. V. D. **Contribuição ao estudo da infecção pelo vírus dengue tipo 1,2 e 3, no estado do Rio de Janeiro**. 2008. 101 p. Tese (Doutorado em Pesquisas Clínicas em Doenças Infecciosas). Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2008.
- 45 MARTINEZ-TORRES, M. E. **Dengue hemorrágico em crianças: editorial**. 1990.
- 46 HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, Oct 1990. ISSN 0893-8512.
- 47 SABIN, A. Research on dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, p. 30-50, 1952.
- 48 HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 3407, p. 1102-1103, 1960. ISSN 0036-8075.
- 49 GUBLER, D.; TRENT, D. Emergence of epidemic dengue hemorrhagic-fever as a public-health problem in the Americas. **Infectious Agents and Disease-Reviews Issues and Commentary**, v. 2, n. 6, p. 383-393, DEC 1993. ISSN 1056-2044.
- 50 Pan American Health Organization. Disponível em: <<http://www.paho.org/hq/>>. Acesso em: 20 maio 2014.
- 51 Pérez, G. L. Dengue, un problema social reemergente en América Latina. Estrategia para su erradicación. **Biotecnología Aplicada**, v. 23, p. 130-136, 2006.
- 52 FRANCO, O. **História da febre amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Superintendência de Campanhas de Saúde Pública, 1976.
- 53 FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, Nov 2000. ISSN 1286-4579.
- 54 SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48-53, Jan 2005. ISSN 1080-6040.
- 55 BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, p. 53-72, 2008.
- 56 RIBEIRO NOGUEIRA, R. M.; GALVAO DE ARAUJO, J. M.; SCHATZMAYRI, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana De Salud Publica-Pan American Journal of Public Health**, v. 22, n. 5, p. 358-363, Nov 2007. ISSN 1020-4989.
- 57 NOGUEIRA, R. M. R.; EPPINGHAUS, A. L. F. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 255-256, May 2011. ISSN 0074-0276.
- 58 FORATTINI, O. P. **Entomologia medica**. Entomologia medica., p. 1-658, 1973 1973.
- 59 NATAL, D. The bioecology of *Aedes aegypti*. **Biológico (São Paulo)**, v. 64, n. 2, p. 205-207, 2002 2002. ISSN 0366-0567.
- 60 GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 37, p. 29-36, 1985 1985. ISSN 0034-7256.

- 61 DANTAS, E. S. **Avaliação da influência de algumas características do criadouro e da água na frequência de formas imaturas e no tamanho e peso de adultos do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no Rio de Janeiro.** 2011. 103 (Mestrado Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- 62 BESERRA, E. B. et al. Biology and thermal exigency of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera : Culicidae) from four bioclimatic localities of Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 6, p. 853-860, Nov-Dec 2006. ISSN 1519-566X.
- 63 WIDAHL, L. E. Flow patterns around suspension-feeding mosquito larvae (DIPTERA, CULICIDAE). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, n. 1, p. 91-95, Jan 1992. ISSN 0013-8746.
- 64 WIDAHL, L. E. Production of Feeding Flow Patterns In Mosquito Larvae (Diptera, Culicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 4, p. 482-485, Jul 1994. ISSN 0013-8746.
- 65 CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes.** Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction. Universidade de Michigan: Chapman & Hall, 1992.
- 66 OLIVEIRA FILHO, A. M., 1997. **General overview on vector control in relation to the organic insecticides pollution in Brazil.** In: International Workshop on Organic Micropollutants in the Environment, *Proceedings*, p. 1-3, Rio de Janeiro: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 67 CONSOLI, R. A. G. B., PEREIRA, J.P., DA SILVEIRA, J.N., DE CASTRO, M.T.M. Suscetibilidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* Say e *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Díptera, Culicidae) a diversos inseticidas em laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 30, p. 79-85, 1986.
- 68 CARSON, R. **Primavera silenciosa.** São Paulo: Gaia, 2010.
- 69 D'AMATO, C.; TORRES, J.; MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.
- 70 CHAVASSE, D.; YAP, H. **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance.** Geneve: World Health Organization. 1997.
- 71 CENTRE NATIONAL DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE - ITALY. Coppellotti O. et. al. **Composition comprising a photoactivatable larvicide (PCT).** WO 2012046214 A3. Data de publicação: 21 jun. 2012, Data de depósito: 7 out. 2011, Data da prioridade: 8 out. 2010.
- 72 GAD, F. et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2173-2178, Jun 2004. ISSN 0066-4804.
- 73 FERREIRA, S. et al. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS4. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 4, p. 207-212, Mar 2004. ISSN 0268-8921.
- 74 MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v. 22, n. 2, p. 83-91, Jun 2007. ISSN 0268-8921.

- 75 DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008. ISSN 0944-5013.
- 76 HUANG, L. et al. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 490-499, Aug 2012. ISSN 0196-8092.
- 77 ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2013 2013. ISSN 2234-2400.
- 78 ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, Nov 2001. ISSN 0031-8655.
- 79 MERCHAT, M. et al. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 32, n. 3, p. 153-157, Feb 1996. ISSN 1011-1344.
- 80 MINNOCK, A. et al. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 32, n. 3, p. 159-164, Feb 1996. ISSN 1011-1344.
- 81 KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755-767, Sep 2011. ISSN 0196-8092.
- 82 DOUGHERTY, T. J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin-II. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, n. 5, p. 569-573, Nov 1987. ISSN 0031-8655.
- 83 MIRONOV, A. F.; NIZHNIK, A. N.; NOCKEL, A. Y. Hematoporphyrin derivatives - an oligomeric composition study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 4, n. 3, p. 297-306, Jan 1990. ISSN 1011-1344.
- 84 WILSON, B. C. Advanced Photodynamic Therapy. **Biophotonics**, p. 315-334, 2008 2008. ISSN 1618-7210.
- 85 BAGNATO, V. S. **Novas técnicas ópticas para as áreas de saúde**. Livraria da Física, 2008.
- 86 LUCANTONI, L. et al. Novel, Meso-Substituted Cationic Porphyrin Molecule for Photo-Mediated Larval Control of the Dengue Vector *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, Dec 2011. ISSN 1935-2727.
- 87 SILVA, A. P. et al. Development and comparison of two devices for treatment of onychomycosis by photodynamic therapy. **Journal Biomedical Optics**, v. 20, n. 6, p. 61109, Jun 2015. ISSN 1560-2281.
- 88 GIUSTI, J. S. M. et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 4, p. 281-287, Aug 2008. ISSN 1549-5418.
- 89 DOVIGO, L. N. et al. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 54, n. 2, p. 123-130, Mar 2011. ISSN 0933-7407.

- 90 GOIS, M. M. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 3, p. 391-395, May 2010. ISSN 0268-8921.
- 91 MENEZES, P. F. C. de. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006. p. 157. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 92 MIQUEL, J. et al. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 34, n. 1, p. 37-46, Jan-Feb 2002. ISSN 0167-4943.
- 93 EPSTEIN, J.; SANDERSON, I. R.; MACDONALD, T. T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 11, p. 1545-1557, Jun 14 2010. ISSN 0007-1145.
- 94 DIAS RIBEIRO, A. P. et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 391-398, Feb 2013. ISSN 0268-8921.
- 95 MCGOWAN, M.; SRINIVASAN, V. S. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 198, p. 1-AGFD, Sep 10 1989. ISSN 0065-7727.
- 96 KAUR, S. et al. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ - A structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 4209-4214, Sep 2010. ISSN 0223-5234.
- 97 CORRÊA, T.Q. **Estudo da ação fotodinâmica em *Acanthamoeba polyphaga***. 2013. p.57, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- 98 CECÍLIO FILHO, A. B. **Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Curcuma longa*)**. 1996. p. 100. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- 99 SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicinal medicine with antioxidant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 23-43, 2000.
- 100 MARTINS, M.C., RUSIG, O. Cúrcuma: um corante natural. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 56-65, 1992.
- 101 VIASAN, A. C. et al. Chemical-analysis of some cultivars of curcuma-longa linn. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v. 26, n. 5, p. 293-295, Sep-Oct 1989. ISSN 0022-1155.
- 102 MESA, M. D. et al. Efectos farmacológicos e nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los curcuminoides. **Ars Pharmaceutica**, v. 41, n. 3, p. 307-321, 2000.
- 103 ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, Nov-Dec 2007. ISSN 1543-8384.
- 104 TONNESEN, H. H.; MASSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical

stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1-2, p. 127-135, Sep 5 2002. ISSN 0378-5173.

105 BARBIERI, A. Sensibilizadores fluorescentes como larvicidas. Action fotodinamica de la luz. **Rivista di Malariologia**, v. 7, p. 456-463, 1928.

106 AMOR, T. B.; BORTOLOTTI, L.; JORI, G. Porphyrins and related compounds as photoactivatable insecticides. 3. Laboratory and field studies. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 2, p. 124-128, Feb. 2000. ISSN 0031-8655.

107 EL-TAYEB, T. A.; ABD EL-AZIZ, N. M.; AWAD, H. H. A study on the dynamics of *Aedes caspius* larval uptake and release of novel haematoporphyrin. **African Entomology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, Mar 2013. ISSN 1021-3589.

108 SAGNOU, M. et al. Evaluation of naturally occurring curcuminoids and related compounds against mosquito larvae. **Acta Tropica**, v. 123, n. 3, p. 190-195, Sep 2012. ISSN 0001-706X.

109 KALAIVANI, K.; SENTHIL-NATHAN, S.; MURUGESAN, A. G. Biological activity of selected Lamiaceae and Zingiberaceae plant essential oils against the dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1261-1268, Mar 2012. ISSN 0932-0113.

110 ANSTROM, D. M. et al. Mosquitocidal Properties of Natural Product Compounds Isolated from Chinese Herbs and Synthetic Analogs of Curcumin. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 2, p. 350-355, Mar 2012. ISSN 0022-2585.

111 TRIPATHI, A. K. et al. Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma longa* (Var. Ch-66) on three species of stored-product beetles (Coleoptera). **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 1, p. 183-189, Feb 2002. ISSN 0022-0493.

112 ZHU, J. et al. Mosquito larvicidal activity of botanical-based mosquito repellents. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 24, n. 1, p. 161-168, Mar 2008. ISSN 8756-971X.

113 PITASAWAT, B. et al. Repellency of aromatic turmeric *Curcuma aromatica* under laboratory and field conditions. **Journal of Vector Ecology**, v. 28, n. 2, p. 234-240, Dec 2003. ISSN 1081-1710.

114 SALAMA, E. M. et al. Site of action of hematoporphyrin (a photo-activated insecticide) in *Culex pipiens* larvae. **Egyptian Journal of Biology**, v. 4, p. 133-141, 2002.

115 DAVID, J. P. et al. Mosquito larval consumption of toxic arborescent leaf-litter, and its biocontrol potential. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 2, p. 151-157, 2003.

116 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 Medical Entomology**, v. 1, n. 8, 2015.