UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

NATASHA FERREIRA MEZZACAPPO

Avaliação dos efeitos subletais da inativação fotodinâmica em larvas de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) e fotodegradação da curcumina em D-manitol

São Carlos
2020

NATASHA FERREIRA MEZZACAPPO

Avaliação dos efeitos subletais da inativação fotodinâmica em larvas de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) e fotodegradação da curcumina em D-manitol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Física do Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestra em Ciências.
Área de Concentração: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador
Bagnato

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mezzacappo, Natasha Ferreira

Avaliação dos efeitos subletais da inativação fotodinâmica em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e fotodegradação da curcumina em D-manitol / Natasha Ferreira Mezzacappo; orientador Vanderlei Salvador Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2020. 86 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. *Aedes aegypti*. 2. Curcumina. 3. Inativação fotodinâmica. I. Bagnato, Vanderlei Salvador, orient. II. Título.

*Aos meus pais,
por todo o investimento e apoio na minha jornada agora e sempre;
À tia Dani,
por ser minha inspiração intelectual desde meus primeiros passos.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me incentivarem desde criança a buscar conhecimento e a sempre dar o melhor de mim, e pelo apoio fundamental no meu mestrado. Sem a ajuda de vocês, muitos experimentos não teriam dado certo. À minha irmã, e minha família de quatro patas (Amendoim, Amora, Cacau e Pirulito).

Ao meu namorado, Guilherme, por ser minha melhor companhia e sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por todo o seu carinho e amor.

Às minhas amigas Letícia e Carol, pelos melhores momentos e risadas, pela amizade sincera de anos.

Ao meu orientador, Prof.^o Vanderlei, pela oportunidade de ser sua aluna e fazer parte de um projeto tão importante. Obrigada por confiar na minha capacidade!

À Dra. Natália (Nat), pela co-orientação, dedicação e acompanhamento do meu trabalho. Obrigada pela sua disponibilidade e atenção!

Ao pessoal do Zika: à Dra. Larissa, por me guiar e permitir que eu continuasse seu trabalho; ao Matheus, pela parceria nos experimentos e congresso.

Às pessoas que, ao longo do caminho, me deram ferramentas para que eu pudesse evoluir na pesquisa: à Giulia, por me ensinar a usar estatística e pelas dicas amigas; à Lídia, por me ensinar a análise de asas; ao Dr. Lucas, por me ajudar nos experimentos de fotodegradação; à Dra. Thaila por contribuir nas correções deste trabalho.

À Prof.^a Cristina Kurachi e à Dra. Lili, por sempre estarem à disposição para ajudar em qualquer problema.

Ao suporte técnico de todos do CEPOF (secretaria, oficina, LAT e LIEPO) e dos funcionários da pós-graduação e da biblioteca do IFSC.

À Luciana dos Santos Dias e ao LAFICAVE do IOC-Fiocruz no Rio de Janeiro, pela doação dos ovos que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação do IFSC e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Laura Marise de Freitas e Prof.^o Juliano José Corbi, por aceitarem participar e contribuir na avaliação deste trabalho.

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*

Marie Curie

RESUMO

MEZZACAPPO, N.F. **Avaliação dos efeitos subletais da inativação fotodinâmica em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e fotodegradação da curcumina em D-manitol.** 2020. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

As arboviroses transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* têm sido um grande problema enfrentado pelo Brasil nos últimos anos, com alto número de casos notificados. O principal método atual de controle vetorial se baseia no uso de inseticidas químicos, levando à seleção de populações altamente resistentes. Diante disso, a inativação fotodinâmica (IFD) em larvas de *Aedes aegypti* tem sido testada como uma alternativa aos larvicidas convencionais. Com isso, um dos principais objetivos deste estudo foi analisar os possíveis efeitos subletais da IFD sobre primeiro e terceiro instars (L1 e L3) de larvas de *Aedes aegypti*, utilizando a curcumina em D-manitol (CDM). Foram avaliados parâmetros como desenvolvimento larval, proporção sexual, longevidade e tamanho das asas, empregando três concentrações subletais (CL₂₅, CL₅₀ e CL₇₅), dois grupos controle (água e D-manitol) e lâmpadas fluorescentes foram utilizadas como fonte de iluminação. No tratamento com as larvas L1, houve atrasos no desenvolvimento larval, com maior taxa de fêmeas e redução significativa na longevidade dos adultos. O tratamento nas larvas L3 levou à atrasos na pupação, maior taxa de machos no grupo CL₇₅, redução da longevidade nos grupos tratados e redução dos adultos emergentes no grupo CL₂₅. Foi investigado também o processo de fotodegradação da CDM em lâmpadas fluorescentes e LEDs azuis, utilizando a técnica de espectrometria em UV-vis. A fotodegradação mostrou tendências diferentes na luz branca e na luz azul, ocorrendo mais lentamente na luz branca. Além disso, foi verificada a ação ovicida da CDM, que resultou em alta redução da viabilidade dos ovos. A persistência da atividade fotolarvicida da CDM em duas concentrações também foi analisada, e se mostrou baixa quando comparada a larvicidas convencionais. Assim, é possível concluir que a CDM, mesmo em condições subletais, pode afetar negativamente o desenvolvimento e sobrevivência do *Aedes aegypti*, destacando o potencial do seu uso como fotolarvicida no controle vetorial.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Curcumina. Inativação fotodinâmica.

ABSTRACT

MEZZACAPPO, N.F. **Evaluation of sublethal effects of photodynamic inactivation on *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) larvae and photodegradation of curcumin in D-mannitol.** 2020. 86 p. Dissertation (Master in Science) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Arboviruses transmitted by *Aedes aegypti* mosquito have been a major problem in Brazil recently, with high number of reported cases. Vector control has been made mostly by chemical insecticides, leading to the selection of highly resistant populations. Regarding this, photodynamic inactivation (PDI) in *Ae. aegypti* larvae has been tested as an alternative to conventional larvicides. Thus, one of the main aims of this study was to analyze the possible sublethal effects of PDI on first and third instars (L1 and L3) of *Aedes aegypti* larvae, using curcumin in D-mannitol (CDM). Parameters such as larval development, sexual proportion, longevity and wing size were evaluated, employing three sublethal concentrations (LC₂₅, LC₅₀ and LC₇₅), two control groups (water and D-mannitol) and fluorescent lamps were used as illumination source. In the treatment with L1 larvae, there were delays in larval development, with a higher rate of females and a significant reduction in adult longevity. Treatment in L3 larvae led to delayed pupation, a higher rate of males in LC₇₅ group, reduced overall longevity and size of emergent adults in LC₂₅ group. Photodegradation process of CDM under fluorescent lamps and blue LEDs was also studied, using the UV-vis spectrometry technique. Photodegradation showed different trends in white and blue light, occurring more slowly in white light. Moreover, ovicidal action of CDM was verified, which resulted in a high reduction in egg viability. Persistence of CDM photolarvicidal activity in two concentrations was also analyzed, and was shown to be low when compared to conventional larvicides. Overall, it is possible to state that CDM, even in sublethal conditions, can negatively affect the development and survival of *Ae. aegypti*, highlighting its potential use as a photolarvicide in vector control.

Keywords: *Aedes aegypti*. Curcumin. Photodynamic inactivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	30
Figura 2 –	Morfologia geral da larva de <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 3 –	Diagrama de Jablonski esquematizando as reações da Inativação Fotodinâmica.	37
Figura 4 –	A: Estrutura química da curcumina. B: Espectros de absorbância e fluorescência da curcumina em diferentes solventes (1: acetonitrila, 2: tolueno, 3: etanol, a: absorbância, f: fluorescência).....	39
Figura 5 –	Perfis espectrais normalizados da solução CDM (em azul) e da curcumina em etanol (em vermelho), com a absorbância no UV-vis representada pela linha cheia e a emissão de fluorescência representada pela linha pontilhada. Espectro de emissão de fluorescência com excitação em $\lambda = 450$ nm para a CDM e em $\lambda = 430$ nm para a curcumina em etanol.	44
Figura 6 –	A: Absorbância no UV-vis da solução CDM em diferentes concentrações (linha tracejada: absorbância máxima em 446 nm); B: Curva de calibração da solução CDM, com base na absorbância máxima em 446 nm. Inserto: Equação linear da reta ajustada, com respectivo fator de ajuste R^2	44
Figura 7 –	Sobreposição normalizada dos perfis espectrais do sol (em azul) e da lâmpada fluorescente (em vermelho), excluindo-se as linhas de mercúrio. Inserto: Espectro completo da lâmpada fluorescente.	45
Figura 8 –	A: Espectros de absorção UV-vis da solução CDM durante a fotodegradação em lâmpada fluorescente; B: Decaimento exponencial da área dos espectros de absorção ao longo do tempo ($R^2 = 0,91$); C: Porcentagem de degradação da solução CDM ao longo do tempo, comparada à solução inicial, com relação à absorção em 446 nm.	46
Figura 9 –	Espectros de absorção UV-vis da solução CDM durante a fotodegradação em luz azul. As setas indicam o aumento de picos de fotoprodutos nos λ correspondentes.....	47
Figura 10 –	A: Cartela de papel filtro contendo ovos de <i>Ae. aegypti</i> fixados. B: Bandeja de criação das larvas.	50
Figura 11 –	A: Montagem experimental das lâmpadas fluorescentes e distribuição dos copos. B: Distribuição dos recipientes utilizados como gaiolas durante a análise da longevidade. C: Detalhes, das gaiolas de criação dos mosquitos.	52
Figura 12 –	Asa de <i>Ae. aegypti</i> com os 18 pontos anatômicos selecionados segundo Vidal e Suesdek. ¹¹⁴	53
Figura 13 –	Curvas de mortalidade da CDM após 24h para larvas L1 (A) e L3 (B). A curva vermelha corresponde à regressão não-linear por uma curva de dose resposta ajustada aos pontos ($R^2_{L1}=0,98$; $R^2_{L3}=0,99$) e a área em cinza delimitada pelas linhas tracejadas corresponde ao intervalo de previsão de 95%.	54
Figura 14 –	A: Período médio de desenvolvimento a partir do L1 até a emergência dos adultos, sob exposição crônica subletal à CDM. As letras acima dos grupos na legenda do gráfico (a e b) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$). Os símbolos (*), (**), (***) e (****) mostram diferença estatística significativa entre cada grupo e o controle água em cada estágio	

	de vida, sendo correspondentes a $p \leq 0,05$; 0,01; 0,001 e 0,0001, respectivamente. B: Mortalidade média ao longo do desenvolvimento.....	56
Figura 15 –	Proporção sexual dos adultos emergidos a partir do L1. Estão representados o total de mosquitos emergidos (N) e a taxa de emergência para cada grupo. As letras acima dos grupos no eixo vertical do gráfico (a,b e c) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (χ^2 ; $p \leq 0,05$).....	58
Figura 16 –	Curvas de sobrevivência dos adultos, sendo N o número total de indivíduos analisados em cada grupo. A: Machos; B: Fêmeas. As letras acima dos grupos na legenda do gráfico (a, b e c) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Mantel-Cox; $p \leq 0,05$).....	59
Figura 17 –	Tamanho dos centróides das asas dos adultos A: Machos; B: Fêmeas.	61
Figura 18 –	Tempo de pupação sob exposição crônica subletal à CDM. As letras acima dos grupos na legenda do gráfico (a, b, c e d) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$).	62
Figura 19 –	Efeitos morfológicos durante o desenvolvimento sob exposição crônica subletal à CDM a partir do L3. A: Larva L3 do Controle Água; B: Larva morta durante a ecdise do L3 para L4, presa ao seu exoesqueleto (seta vermelha: cabeça do exoesqueleto L3 presa ao abdômen); C: Larva com intestino comprimido após a morte; D: Larva distendida após a morte (seta azul: ruptura entre a cabeça e o tórax); E: Pupa do Controle Água; F: Pupa jovem morta durante a ecdise do L4 para a fase de pupa (seta laranja: cabeça do exoesqueleto L4 conectada à cabeça da pupa); G, H: Pupas intermediárias mortas presas dentro de seus exoesqueletos L4 (seta verde: parte inferior do exoesqueleto rompida).	63
Figura 20 –	Proporção sexual dos adultos emergidos a partir do L3. Estão representados o total de mosquitos emergidos (N) e a taxa de emergência para cada grupo. As letras acima dos grupos no eixo vertical do gráfico (a e b) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (χ^2 ; $p \leq 0,05$).	64
Figura 21 –	Curvas de sobrevivência dos adultos, sendo N o número total de indivíduos analisados em cada grupo. A: Machos; B: Fêmeas. As letras acima dos grupos na legenda do gráfico (a, b, c) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Mantel-Cox; $p \leq 0,05$).....	65
Figura 22 –	Tamanho dos centróides das asas dos adultos A: Machos; B: Fêmeas. O símbolo (*) indica diferença estatística com o Controle Água (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$).	67
Figura 23 –	Atividade ovicida da solução CDM em ovos embrionados de <i>Ae. aegypti</i> . As letras acima das colunas no gráfico (a, b, c, d, e) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$).	68
Figura 24 –	Eclosão anormal dos ovos após exposição à solução CDM. A: Ovo do grupo controle, com opérculo aberto após emergência da larva; B: Emergência pelo opérculo no grupo controle; C, D, E: Emergência anormal e incompleta da larva, emergindo pela lateral do ovo ao invés do opérculo. Escala: 500 μm	69

Figura 25 – Persistência da ação fotolarvicida da solução CDM ao longo dos dias. O símbolo (*) indica significância estatística com o grupo controle D-manitol (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$). 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais gêneros de mosquitos vetores e doenças transmitidas, com seus respectivos patógenos.	27
Tabela 2 – Aspectos clínicos da Dengue, Chikungunya e Zika, com as principais diferenças entre sintomas e possíveis complicações.	28
Tabela 3 – Métodos utilizados atualmente no Brasil no controle das diferentes fases de vida do <i>Aedes aegypti</i> , considerando os diversos tipos de intervenção possíveis e os respectivos modos de ação.	32
Tabela 4 – Concentrações letais (CL ₂₅ , CL ₅₀ e CL ₇₅) da CDM para larvas L1 e L3 em 24h.	55
Tabela 5 – Sobrevivência média (tempo em que 50% dos adultos morreram) em cada grupo.	60
Tabela 6 – Tamanho médio dos centróides das asas dos adultos ($\pm$ desvio padrão).	61
Tabela 7 – Sobrevivência média (tempo em que 50% dos adultos morreram) em cada grupo.	66
Tabela 8 – Tamanho médio dos centróides das asas dos adultos ($\pm$ desvio padrão).	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BTI	<i>Bacillus thuringiensis israelenses</i>
CDM	Curcumina com D-manitol
CHIKV	Vírus Chikungunya
CL	Concentração letal
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV	Vírus Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
IFD	Inativação fotodinâmica
LED	Do inglês, <i>light-emitting diode</i>
LIC	Limite inferior de confiança
LSC	Limite superior de confiança
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
RCI	Reguladores de crescimento de insetos
RGB	Do inglês, <i>red, green, blue</i>
RIDL	Do inglês, <i>release of insects carrying a dominant lethal gene</i>
SIT	Do inglês, <i>sterile insect technique</i>
TC	Tamanho do centróide
TFD	Terapia fotodinâmica
UV-vis	Luz ultravioleta e visível
WNV	Vírus da febre do Nilo
YFV	Vírus da febre amarela

LISTA DE SÍMBOLOS

$10x$	Concentração 10 vezes maior que a CL_{99}
1O_2	Oxigênio singleto
$1x$	Concentração correspondente à CL_{99}
3O_2	Oxigênio no estado tripleto fundamental
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
L1	Primeiro instar larval
L2	Segundo instar larval
L3	Terceiro instar larval
L4	Quarto instar larval
L:E	Luz:Escuro
$m_{Curcumina}$	Massa de curcumina
$m_{D-manitol}$	Massa de D-manitol
$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxila
R^2	Coeficiente de determinação
λ	Comprimento de onda
τ	Tempo de decaimento
χ^2	Teste do chi-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	Objetivos	26
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	Epidemiologia das doenças transmitidas por mosquitos	27
2.2	O vetor <i>Aedes aegypti</i>	29
2.2.1	Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	29
2.3	Métodos de controle do <i>Aedes aegypti</i>	32
2.4	Inativação fotodinâmica aplicada ao controle de vetores	36
2.4.1	Mecanismos de ação da IFD	37
2.4.2	Fotossensibilizadores	38
2.4.3	Curcumina	39
3	ESTUDOS DA FOTODEGRADAÇÃO DA CURCUMINA COM D-MANITOL	41
3.1	Contextualização	41
3.2	Material e métodos	41
3.2.1	Preparo da formulação de curcumina com D-manitol (CDM)	41
3.2.2	Caracterização da formulação de curcumina com D-manitol (CDM) por espectroscopia de UV-vis e fluorescência	41
3.2.3	Determinação do espectro da lâmpada fluorescente	42
3.2.4	Fotodegradação em lâmpada fluorescente	42
3.2.5	Fotodegradação em luz azul.....	42
3.2.6	Análise dos dados	43
3.3	Resultados e Discussão	43
3.3.1	Caracterização da formulação de curcumina com D-manitol (CDM) por espectroscopia de UV-vis e fluorescência	43
3.3.2	Fotodegradação em lâmpada fluorescente	45
3.3.3	Fotodegradação em luz azul.....	47
3.4	Conclusão.....	48

4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS CRÔNICOS DA IFD COM CURCUMINA NO DESENVOLVIMENTO DO <i>Ae. aegypti</i> EM LABORATÓRIO	49
4.1	Contextualização	49
4.2	Materiais e métodos.....	49
4.2.1	Obtenção de ovos e criação de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	49
4.2.2	Curvas de mortalidade	50
4.2.3	Estudos de desenvolvimento sob exposição crônica subletal	50
4.2.3.1	Montagem experimental e parâmetros analisados.....	50
4.2.3.2	Análise do tamanho das asas.....	52
4.2.4	Atividade ovicida	53
4.2.5	Estudos de persistência da ação fotolarvicida.....	53
4.2.6	Análise estatística	54
4.3	Resultados e Discussão	54
4.3.1	Curvas de mortalidade e determinação das concentrações letais	54
4.3.2	Análise dos parâmetros de desenvolvimento a partir do L1	55
4.3.2.1	Desenvolvimento das formas imaturas sob exposição crônica subletal	55
4.3.2.2	Proporção sexual dos adultos emergidos após exposição crônica subletal	57
4.3.2.3	Longevidade dos adultos	59
4.3.2.4	Análise do tamanho das asas.....	60
4.3.3	Análise dos parâmetros de desenvolvimento a partir do L3	62
4.3.3.1	Tempo de pupação após exposição crônica subletal	62
4.3.3.2	Proporção sexual dos adultos emergidos após exposição crônica subletal	64
4.3.3.3	Longevidade dos adultos	65
4.3.3.4	Análise do tamanho das asas.....	66
4.3.4	Atividade Ovicida.....	67
4.3.5	Estudos de persistência da ação fotolarvicida.....	70
4.4	Conclusão.....	71
5	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, doenças transmitidas por mosquitos representam um grande fardo na saúde ao redor do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. O *Aedes aegypti* é o mosquito vetor de várias arboviroses, como dengue, zika, chikungunya e febre amarela. Estima-se que cerca de 390 milhões de casos de dengue ocorram por ano no mundo, com cerca de 3,9 bilhões de pessoas em risco de contrair dengue.¹ Em 2015, o Brasil teve o maior surto de dengue, com aproximadamente 1,7 milhão de casos notificados.² Além disso, nesse mesmo ano foi reportado o surto de infecção pelo vírus Zika no país, sendo associado a complicações como síndrome de Guillain-Barré e microcefalia em recém nascidos.²⁻³

Embora exista uma vacina para a prevenção de febre amarela e uma em desenvolvimento para a dengue,⁴ o controle vetorial ainda é a principal estratégia para superar e prevenir a transmissão das arboviroses. Por muitos anos, as estratégias de controle têm se baseado majoritariamente na remoção mecânica de criadouros artificiais e no uso de inseticidas químicos, como organofosforados, piretróides e carbamatos. No entanto, os métodos químicos levaram à seleção de populações resistentes de mosquitos,⁵⁻⁶ dificultando ainda mais o controle dos surtos das doenças. Devido a isso, a busca por novas alternativas de controle, que sejam mais viáveis economicamente e ecologicamente, se tornou urgentemente necessária.

Desde 2013, nosso grupo de pesquisa estuda a aplicação da inativação fotodinâmica (IFD) no controle das larvas de *Aedes aegypti*. A IFD consiste na associação de uma molécula fotossensível, chamada de fotossensibilizador (FS), luz em um comprimento de onda (λ) específico e oxigênio molecular (O_2). O processo gera espécies reativas de oxigênio (EROs), induzindo a morte celular através da oxidação simultânea de diversas biomoléculas. Estudos mostraram que a IFD atua danificando as membranas do intestino médio da larva,⁷⁻⁸ prejudicando a digestão e, eventualmente, levando à morte. Esse método aplicado à insetos foi previamente estudado por outros grupos de pesquisa utilizando diferentes FS.⁸⁻¹²

Em 2019, nosso grupo demonstrou que a curcumina, um FS natural originado dos rizomas da planta *Curcuma longa*, atua como fotolarvicida sobre larvas de *Aedes aegypti* sob exposição da luz solar, resultando em altas taxas de mortalidade. A curcumina acumula-se no trato digestório da larva e, após irradiação, essa área é completamente danificada.⁷

Para viabilizar a aplicação da curcumina como um fotolarvicida, é necessário entender as consequências resultantes da ação da IFD quando não é possível atingir a eliminação completa das larvas. Portanto, surge a motivação para o estudo dos efeitos subletais da IFD sobre as larvas

de *Ae. aegypti*, investigando dessa forma diversos parâmetros relativos à formulação utilizada e ao desenvolvimento das larvas e dos mosquitos sobreviventes.

1.1 Objetivos

Os principais objetivos desse trabalho foram investigar a fotodegradação da curcumina em D-manitol e seus efeitos subletais considerando a inativação fotodinâmica em larvas de *Aedes aegypti*. Para isso, foram propostos:

- Verificar o processo de fotodegradação da formulação de curcumina em D-manitol utilizando lâmpadas fluorescentes e LEDs azuis;
 - Avaliar a ação de doses subletais crônicas da curcumina em D-manitol nas larvas, investigando diferentes parâmetros de desenvolvimento;
 - Avaliar a atividade ovicida da curcumina em D-manitol;
 - Determinar o tempo de persistência da ação fotolarvicida da curcumina em D-manitol em condições de laboratório.
-

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia das doenças transmitidas por mosquitos

Os mosquitos são insetos da ordem Diptera, da família Culicidae, presentes em quase todas as regiões do mundo, sendo mais encontrados nas regiões tropicais e subtropicais. Na grande maioria das espécies, as fêmeas são hematófagas¹³ e, devido à isso, são vetores de transmissão de diversas doenças à população humana. As doenças são transmitidas através da picada das fêmeas que, ao coletarem o sangue do hospedeiro, acabam viabilizando a troca de patógenos entre mosquito e hospedeiro. Na Tabela 1 estão alguns dos principais gêneros de mosquitos que são de grande importância para os sistemas de saúde pública mundial, bem como algumas das doenças transmitidas, com seus respectivos patógenos. A maioria desses patógenos são os denominados arbovírus, que são vírus capazes de serem replicados e transmitidos por insetos.¹⁴ Os arbovírus podem ser de diversos gêneros, sendo mais emergentes no Brasil os *Flavivirus* (causadores de dengue, febre amarela e zika) e *Alphavirus* (chikungunya). Os principais vetores de interesse epidemiológico no Brasil são os mosquitos do gênero *Aedes*, transmissores dessas quatro arboviroses em circulação no país. Além disso, estudos em laboratório mostraram que as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* podem ser capazes de transmitir o arbovírus selvático Mayaro (MAYV)¹⁵⁻¹⁶, indicando um potencial para a transmissão do MAYV em regiões urbanas.

Tabela 1 – Principais gêneros de mosquitos vetores e doenças transmitidas, com seus respectivos patógenos.

Doença	Patógeno	Gêneros de mosquitos		
		<i>Aedes</i> spp.	<i>Anopheles</i> spp.	<i>Culex</i> spp.
Malária Humana	<i>Plasmodium</i> spp.	-	+	-
Dengue	Vírus DENV (1 a 4)	+	-	-
Febre Amarela	Vírus YFV	+	-	-
Febre Chikungunya	Vírus CHIKV	+	+	+
Febre Zika	Vírus ZIKV	+	-	-
Febre do Nilo	Vírus WNV	-	+	+
Filariose Linfática	<i>Wuchereria bancrofti</i>	+	+	+

Fonte: Adaptada de MOLINA-CRUZ *et al.*¹⁷; MEHLHORN.¹⁸

Em 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou uma estimativa mundial de cerca de 390 milhões de infecções por dengue a cada ano, e aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas em risco de serem infectadas¹. No Brasil, o Ministério da Saúde registrou cerca de 1,4 milhão de casos prováveis de dengue no país em 2019, um aumento de quase 600% em relação

à 2018.¹⁹ Esse aumento é bem preocupante, considerando que o surto mais recente no país foi em 2015, com quase 1,7 milhão de casos notificados.² Para chikungunya e zika, os números de casos prováveis em 2019 foram 110,6 mil e 9,8 mil, respectivamente.¹⁹ Para febre amarela, foram notificados 327 casos suspeitos.²⁰

Atualmente, a febre amarela é a única das arboviroses com campanha de vacinação no país, para as regiões afetadas. Para as outras arboviroses, somente contra a dengue há uma vacina aprovada para uso, a Dengvaxia® (*Sanofi Pasteur*, França). Essa é uma vacina tetravalente, com uma eficácia geral de cerca de 76% para pessoas soropositivas e de 39% para soronegativas.²¹ Devido ao risco da Dengvaxia® em induzir severidade da doença em pessoas soronegativas que venham a se infectar, a OMS recomenda que a aplicação seja realizada somente em pessoas que foram previamente infectadas.²² Há também uma vacina para dengue em desenvolvimento no Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), com estudos em fase III.²³

As arboviroses têm grande impacto social e econômico, afetando a vida cotidiana da população. Em 2016, o Governo Federal reportou um gasto total de 2,3 bilhões com o manejo das arboviroses naquele ano, representando 2% do orçamento previsto para a saúde no país.²⁴ Considerando os aspectos clínicos, a Tabela 2 descreve os sintomas e complicações das doenças. Embora os sintomas sejam similares, as complicações podem ser severas, como no caso da chikungunya, em que há possibilidade de dor crônica após a remissão do vírus, e da zika, associada a complicações neurológicas. Em 2015, devido ao surto do vírus ZIKV no Brasil, foram reportados diversos casos de microcefalia em recém-nascidos, que posteriormente foram relacionados a infecções maternas pelo vírus.³

Tabela 2 – Aspectos clínicos da Dengue, Chikungunya e Zika, com as principais diferenças entre sintomas e possíveis complicações.

Sintomas	Dengue	Chikungunya	Zika
Febre	Alta (39 a 49°C) e súbita	Alta (39 a 49°C) e súbita	Leve ou ausente
Dores	Músculos, articulações, cabeça e atrás dos olhos	Inchaço nas articulações e dores intensas	Dores menos intensas nas articulações, olhos vermelhos e aversão à luz
Manchas Vermelhas	Sim, às vezes com coceira	Sim, com coceira intensa	Sim, com coceira intensa
Atenção	Náuseas, vômitos e diarreia persistentes, dor abdominal intensa, acúmulo de líquidos, tontura,	Idade acima de 45 anos, lesões prévias nas articulações,	Dormência nas extremidades, dificuldade

(continua)

(continuação)

	aumento do fígado, sangramento de mucosa, letargia, aumento de hematócritos	doenças crônicas ou autoimunes	para caminhar, alterações neurológicas, paralisia facial
Complicações	Comprometimento de órgãos (pulmões, coração, fígado, rins e sistema central)	Persistência da dor (meses até anos), com queda de produtividade	Comprometimento neurológico, reação autoimune (Síndrome de Guillain-Barré), microcefalia em neonatos

Fonte: Adaptada de MINISTÉRIO DA SAÚDE/FIOCRUZ.²⁵

2.2 O vetor *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é o principal vetor de arboviroses no Brasil e no mundo, como mostrado na Tabela 1. De acordo com Santos e Meneses²⁶, foram registradas ocorrências de *Ae. aegypti* em 87 países, a maioria delas no sul da Ásia/América. Kraemer *et al.*²⁷ atribui a dispersão do *Ae. aegypti* pelo mundo à migração de pessoas e à difusão do comércio mundial. O *Ae. aegypti* é um mosquito de climas tropicais e subtropicais, necessitando de temperaturas médias a elevadas e alta umidade. Devido à urbanização das cidades, a espécie se adaptou e encontrou condições favoráveis à sua sobrevivência, como a abundância de fontes alimentares (sangue humano) e de criadouros ideais (acúmulo de água).^{27,28} Atualmente, a grande maioria de seus criadouros são artificiais, como pequenos recipientes com água parada, pneus, ralos, tanques, poços, barcos e até esgotos.³⁰ Segundo Liu-Helmersson *et al.*²⁹, com o aumento da temperatura global, a incidência de *Ae. aegypti* no mundo aumentou 9,5% em relação ao século passado, e está prevista para aumentar cerca de 20 até 30% nas próximas décadas, dependendo dos níveis de emissão de carbono. Um modelo formulado por Kraemer *et al.*²⁷ estima que até 2080, cerca de 159 países terão a presença do *Ae. aegypti*.

2.2.1 Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

O ciclo biológico do *Ae. aegypti* consiste nas seguintes fases de metamorfose: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto (Figura 1). Os estágios larvais e pupa compreendem a fase aquática, enquanto que o mosquito adulto corresponde a fase terrestre. A duração do ciclo, da eclosão até a emergência do mosquito adulto, depende muito das condições térmicas, nutricionais e populacionais enfrentadas na fase larval. Em condições ótimas, a fase larval dura entre 6 a 8 dias,³⁰ podendo durar até 23 dias dependendo das variações nas condições dos

criadouros.³¹ Em situações de inanição ou baixas temperaturas, o período larval pode se estender em até 100 dias.³⁰

Os ovos do *Ae. aegypti* são ovais, alongados, de coloração preta e medindo cerca de 0,6 mm de comprimento.³⁰ De acordo com Farnesi *et al.*³², a coloração preta é devido à um processo de melanização, sendo responsável por conferir aos ovos uma grande resistência à dessecação. Sendo assim, os ovos dessa espécie são muito resistentes mesmo em ambientes secos, podendo permanecer viáveis por até 1 ano. No entanto, a eclosão dos ovos só é possível quando há água no local onde estão depositados, para que as larvas possam sobreviver.

Figura 1 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.
Fonte: Elaborada pela autora.

A fase larval consiste em 4 estágios ou instars (L1, L2, L3 e L4), com o comprimento da larva variando de 1 mm no L1 até cerca de 7 mm no L4. O processo de transição de instar é chamado de ecdise ou muda, em que a larva elimina o seu exoesqueleto de quitina (exúvia). O corpo da larva é cilíndrico e alongado, se dividindo em três partes (cabeça, tórax e abdômen), e é transparente, sendo possível identificar algumas estruturas internas, o que se torna mais evidente logo após a ecdise (Figura 2).

A larva é um organismo aquático, que se alimenta basicamente de microrganismos e matéria orgânica particulada presentes no ambiente.³³ O modo de alimentação das larvas varia entre três tipos, segundo Clements:³³ *collecting filtering*, em que a larva filtra partículas suspensas na coluna de água; *collecting gathering*, que consiste no uso das mandíbulas para ressuspender e coletar partículas sedimentadas no fundo do criadouro; e *scraping*, com uso das escovas orais para raspagem das paredes, do fundo ou até mesmo das partículas que possam

formar um filme na superfície do criadouro. A respiração ocorre, na maior parte do tempo, através do sifão respiratório, em que a larva sobe até a superfície para obter oxigênio do ar, mas pode ocorrer também de forma cutânea em alguns casos, utilizando o oxigênio dissolvido na água.³³

Figura 2 – Morfologia geral da larva de *Aedes aegypti*.
Fonte: Adaptada de CHRISTOPHERS;³⁰ CONSOLI¹³

Após a transição para a pupa, o corpo passa a apresentar um formato característico de vírgula.¹³ Nessa fase, o organismo se prepara para se tornar um mosquito adulto e não se alimenta, permanecendo flutuando na superfície da água e se movendo quando perturbado. A duração do estágio de pupa pode variar de 2 a 4 dias, e é comum os machos emergirem primeiro que as fêmeas. É possível identificar o sexo das pupas, seja pelo tamanho, em que a fêmea é levemente maior, ou pela identificação do formato da genitália.^{30,34}

O mosquito adulto é um inseto alado, com o corpo característico por apresentar escamas brancas, que formam listras a olho nu. Os machos possuem antenas plumosas, se alimentam de seiva das plantas ou outras fontes de açúcares e são, em geral, menores que as fêmeas. Somente as fêmeas são hematófagas, necessitando dos aminoácidos fornecidos pela alimentação sanguínea para o desenvolvimento dos ovos.¹³ O repasto sanguíneo pode ocorrer antes ou após a cópula, e a fêmea realiza a oviposição cerca de 4 dias após a alimentação. A fêmea deposita seus ovos na superfície da água ou nas paredes do criadouro, porém, não deposita todos os ovos de uma vez, procurando diferentes locais para a postura. Cada fêmea é capaz de depositar mais

de 100 ovos a cada repasto sanguíneo.³⁰ A longevidade dos adultos depende de fatores como nutrição larval, temperatura, umidade e disponibilidade de carboidratos para sua nutrição, sendo comum que as fêmeas tenham maior longevidade que os machos.^{13,35}

2.3 Métodos de controle do *Aedes aegypti*

Atualmente, o controle do *Ae. aegypti* ainda é a ferramenta mais importante para prevenir a transmissão das doenças.³⁵ No Brasil, o controle é realizado seguindo as normas do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), criado em 2002.³⁶ O PNCD impõe, além das normas para controle vetorial, ações como vigilância epidemiológica, saneamento ambiental, educação em saúde e mobilização social.³⁷ Na prática, os responsáveis pelas ações são os agentes comunitários de saúde e os agentes de combate a endemias, instruídos a detectar, destruir, tratar ou destinar os potenciais criadouros do mosquito, além de identificar focos de doenças e levar informações à população.

O controle vetorial pode acontecer tanto nas formas imaturas (ovo, larva ou pupa) quanto no mosquito adulto, de acordo com a Tabela 3. Os métodos utilizados são normalmente divididos em três categorias:

- Controle mecânico ou ambiental, que consiste em ações físicas com a finalidade de eliminar o vetor ou prevenir seu contato com o homem, como a manipulação de criadouros (limpeza, eliminação, destinação correta) e recobrimento com telas, tanto em criadouros não elimináveis quanto em portas e janelas;
- Controle químico, caracterizado pelo uso de substâncias químicas, seja no tratamento das formas imaturas ou dos mosquitos adultos;
- Controle biológico, que utiliza predadores, como peixes e pequenos invertebrados que se alimentam de larvas e pupas, e patógenos como a bactéria *Bti* (*Bacillus thuringiensis israelenses*), que produz toxinas com ação larvicida, e a *Wolbachia*, que interfere no ciclo reprodutivo do mosquito.

Tabela 3 – Métodos utilizados atualmente no Brasil no controle das diferentes fases de vida do *Aedes aegypti*, considerando os diversos tipos de intervenção possíveis e os respectivos modos de ação.

Intervenção		Tipo	Modo de ação
Estágios imaturos	Manipulação de possíveis criadouros	Limpeza (água sanitária)	Eliminação/Morte
		Remoção	Prevenção de oviposição
		Recobrimento com telas	

(continua)

(continuação)

	Tratamento de criadouros	Reguladores de crescimento de insetos – RCI (Piriproxifen, Methoprene, Diflubenzuron, etc.) Biolarvicidas (<i>Bti</i> , Spinosad) Organofosforados (Temephos, Fenthion, etc) Biológicos (peixes larvívoros, copépodes, larva de libélula)	Interferência no desenvolvimento <i>Bti</i> : lise do epitélio intestinal Spinosad: neurotóxico Neurotóxicos Predação
Mosquito adulto	Inseticidas químicos	Caminhão “fumacê”, sprays portáteis, etc. (organofosforados e piretróides)	Neurotóxicos
	Proteção pessoal	Repelentes (Picaridin, DEET, etc.) Telas em janelas, portas e camas Armadilhas de oviposição (“ovitrapas”) e de mosquitos adultos	Prevenção do contato com o mosquito Captura de ovos e mosquitos
	Modificações biológicas	<i>Wolbachia</i> * Transgenia*, SIT (<i>sterile insect technique</i>)	Esterilização, letalidade e/ou supressão da transmissão viral

*: Em fase de testes.

Fonte: Adaptada de ZARA *et al.*; ³⁷ ACHEE *et al.* ³⁸

Historicamente, o controle químico sempre foi o mais utilizado para combater o *Ae. aegypti*. O DDT (diclorodifeniltricloroetano) foi o primeiro químico utilizado no controle do vetor, tanto como adulticida quanto como larvicida. No entanto, a longa ação residual do DDT no ambiente, além de ser nociva para organismos não-alvo, provocou a disseminação da resistência entre as populações de *Ae. aegypti*, contribuindo para a rápida reemergência da espécie. Com a intenção de substituir o uso do DDT, foram empregados compostos organofosforados, carbamatos e piretróides.³⁹ Porém, o uso contínuo novamente acarretou o aparecimento de resistência nas populações de *Ae. aegypti*, resultando na diminuição da eficácia desses compostos.⁴⁰

O surgimento da resistência à inseticidas ocorre devido à pressão seletiva sobre indivíduos que já são geneticamente resistentes. A proporção desses indivíduos numa população geralmente é pequena, e os inseticidas são os responsáveis por selecionar esses indivíduos, eliminando os mais suscetíveis.³⁵ Assim, as próximas gerações de indivíduos resistentes terão uma maior taxa de sobrevivência e longevidade, fazendo com que, eventualmente, os indivíduos resistentes tornem-se maioria numa população, diminuindo a

diversidade genética.⁶ A eficácia do inseticida estará comprometida caso não haja migração entre populações, com acasalamento entre resistentes e suscetíveis.

A resistência também está relacionada ao modo de ação dos inseticidas utilizados. A maioria dos inseticidas aprovados pela OMS são neurotóxicos,³⁵ com mecanismos de ação diferentes, mas todos com o mesmo alvo: o sistema nervoso. Os principais mecanismos de resistência estudados são o aumento no metabolismo para a detoxificação do inseticida (resistência metabólica), onde ocorrem modificações nas atividades de certas enzimas, prevenindo que a molécula do inseticida atinja seu sítio-alvo; e a diminuição na sensibilidade das proteínas-alvo do inseticida (insensibilidade do sítio-alvo), fazendo com que o inseticida não consiga mais se ligar ao sítio-alvo.^{6,35,41} Como exemplos de alvos mais comuns que resultam em resistência aos inseticidas, estão os canais de sódio das bainhas nervosas, alvos do DDT e de piretróides; e a enzima acetilcolinesterase das sinapses nervosas, afetada por organofosforados e carbamatos.⁴²⁻⁴⁴

Com os problemas enfrentados devido à resistência aos inseticidas químicos, a busca por novas alternativas de controle vetorial se tornou urgente. Uma das primeiras alternativas foi a bactéria *Bti*, um bacilo que produz cristais que, quando ingeridos pela larva, liberam toxinas que são ativadas e interagem com as membranas celulares do intestino, levando à lise celular, septicemia e, conseqüentemente, à morte da larva.⁴⁴ Esse efeito é seletivo para insetos da ordem Diptera,⁴⁵ não sendo nocivo para organismos como peixes ou humanos, mas pode afetar outras espécies não-alvo dessa mesma ordem.³⁵ Além disso, embora o *Bti* tenha múltiplos e complexos mecanismos de ação, há evidências de indução de resistência em *Ae. aegypti*,⁴⁶⁻⁴⁷ devido à persistência a longo prazo de algumas das toxinas no ambiente.⁴⁴

Outra alternativa foram os reguladores de crescimento de insetos (RCI), que podem ser de dois tipos: análogos de hormônio juvenil (piriproxifen, metopreno), que interferem no desenvolvimento normal do inseto; e inibidores da síntese de quitina (diflubenzuron, novaluron), que atuam na produção desse polissacarídeo, prejudicando a formação de várias estruturas do inseto, bem como interferindo em seu metabolismo.^{35,40} Estudos ecotoxicológicos com esses compostos mostraram ausência de efeitos nocivos em organismos não-alvo como vertebrados, peixes e plantas, embora outros insetos ou até mesmo outros artrópodes possam sofrer danos, por compartilharem dos mesmos processos endócrinos e fisiológicos.^{35,48-49} O risco do desenvolvimento de resistência aos RCI é relativamente baixo, mas deve ser monitorado continuamente, por ser um produto de recente introdução no controle de mosquitos.^{46,50-52}

Atualmente, quando se trata do controle do *Ae. aegypti*, a OMS recomenda a prática do controle integrado, que consiste em empregar simultaneamente os diferentes métodos, dando preferência para aqueles não químicos.⁵³ Para os compostos químicos, recomenda-se o uso conjunto de inseticidas com diferentes modos de ação, que atuem tanto nas fases imaturas quanto no adulto, bem como a rotação de inseticidas com objetivo de evitar o fortalecimento de populações resistentes.⁵⁴

Recentemente, têm surgido muitas novas pesquisas em estratégias de controle não químicos, visando a diminuição de produtos tóxicos no meio ambiente. Uma delas é o desenvolvimento de inseticidas botânicos e compostos naturais, baseado no uso de óleos essenciais e extratos de plantas. Essa é uma ferramenta ecologicamente positiva, uma vez que esses compostos com ação inseticida já estão presentes na natureza e podem ser facilmente biodegradados.⁵⁶⁻⁵⁸

A estratégia criada pelo *World Mosquito Program*⁵⁸ foi utilizar a *Wolbachia*, um gênero de bactérias endossimbiontes naturalmente encontradas em várias espécies de mosquitos e outros artrópodes, mas que não compõe a microbiota do *Ae. aegypti*.⁵⁹ Essa bactéria se localiza em tecidos de órgãos reprodutores do hospedeiro, e é transmitida maternalmente para a prole.⁵⁹ O efeito da *Wolbachia* pode ocorrer das seguintes maneiras: fêmeas contendo *Wolbachia*, ao cruzarem com machos com ou sem a bactéria, geram prole infectada; e machos infectados, quando cruzam com fêmeas normais, não ocorre a geração de prole, devido à incompatibilidade citoplasmática, que leva o embrião à letalidade.^{58,60} Há evidências de que a *Wolbachia* atua também na redução da capacidade vetorial nos mosquitos, contribuindo para a diminuição da transmissão viral.⁶²⁻⁶⁴

O emprego de técnicas genéticas no controle do *Ae. aegypti* também tem tido sucesso, com o desenvolvimento de mosquitos transgênicos. As modificações genéticas podem ser de dois tipos: produção de genes letais ou de esterilidade, com o objetivo de reduzir ou até mesmo eliminar a população; e produção de genes que reduzam ou bloqueiem a transmissão dos vírus.^{60,64} Uma das primeiras técnicas utilizada na modificação de genes foi a SIT (do inglês, *sterile insect technique*), que utiliza radiação para provocar danos ao DNA, resultando em mutações aleatórias que podem provocar letalidade ou esterilidade.⁶⁰ Atualmente, os avanços em engenharia genética permitiram a criação de linhagens de *Ae. aegypti* com genoma modificado, utilizando a técnica RIDL (do inglês, *Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene*), que eliminou a necessidade do uso da radiação.³⁴⁻³⁵

2.4 Inativação fotodinâmica aplicada ao controle de vetores

O uso da luz para tratamentos diversos tem sua origem nas civilizações antigas, onde era conhecida como helioterapia.⁶⁵ No entanto, caiu no esquecimento por vários séculos, até que, no final do século 19, Niels Finsen desenvolveu o uso da luz para tratar doenças como catapora e tuberculose,⁶⁶ se tornando o pioneiro da fototerapia moderna, recebendo um prêmio Nobel em 1903. Em 1900, Oscar Raab introduziu o conceito de utilizar corantes no processo fotodinâmico, examinando os efeitos da luz em paramécios com acridina.⁶⁷ Esse foi o primeiro passo na descoberta do processo da terapia fotodinâmica em microrganismos. Em 1903, Hermann von Tappeiner tratou tumores de pele com luz branca e eosina aplicada topicamente,⁶⁸ processo que ele descreveu como “ação fotodinâmica”, introduzindo pela primeira vez o termo “fotodinâmico”.^{65,69-70}

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é o nome que se dá quando a técnica é utilizada no tratamento do câncer e de doenças de pele. Quando aplicada à microrganismos, como bactérias, fungos e vírus, é chamada de Inativação Fotodinâmica (IFD).⁷¹ A técnica é aprovada em vários países para o uso no tratamento de diversos tipos de câncer e infecções de pele.⁶⁹ Mais recentemente, a IFD tem sido estudada como alternativa para o problema dos microrganismos resistentes à antibióticos.⁷²⁻⁷³

A aplicação da IFD em insetos foi sugerida pela primeira vez em 1928 por Antonio Barbieri, que testou misturas de corantes como rosa bengala e eritrosina em larvas de mosquito na presença de luz solar e elétrica.⁷⁴ Em 1950, Schildmacher continuou os estudos de Barbieri, demonstrando a alta toxicidade de diversos corantes derivados de xanteno à larvas de três espécies de mosquitos.⁷⁵ Ao longo dos anos, diversas moléculas fotossensíveis foram testadas em diferentes espécies de insetos, principalmente nas formas aquáticas, variando as fontes de luz.

Estudos mais recentes de Ben Amor, Giulio Jori e colaboradores têm empregado porfirinas e clorinas como fotolarvicidas.^{9,76-77} Lucantoni *et al.* utilizou porfirina C14 em larvas de *Ae. aegypti* em condições de laboratório, obtendo ótimos resultados.¹⁰ Fabris *et al.* demonstrou a eficácia em luz solar de formulações contendo porfirina C12 sobre larvas de *Anopheles gambiae* e *Anopheles arabiensis*, espécies de mosquitos vetores da malária.¹² Shiao *et al.* testou 16 diferentes FS e encontrou três ftalocianinas e dois derivados de porfirina com alta atividade fotolarvicida em *Ae. aegypti*, em condições de laboratório.¹¹ Esses estudos demonstram o potencial da IFD no controle de mosquitos vetores.

2.4.1 Mecanismos de ação da IFD

O processo fotodinâmico consiste na iluminação do FS em um λ específico para que este absorva a energia do fóton, se tornando excitado. No estado singlete excitado, o FS pode perder energia e voltar para o estado singlete fundamental, processo chamado de fluorescência; ou pode sofrer um cruzamento intersistema, onde há transição para o estado tripleto excitado. No estado tripleto, o FS pode perder energia e retornar ao estado fundamental, no processo chamado de fosforescência; ou pode reagir com o O_2 de duas maneiras diferentes, nas chamadas reações Tipo I ou Tipo II.⁷⁸ Essas reações são ilustradas pelo diagrama de Jablonski na Figura 3. A reação Tipo I ocorre quando o FS no estado tripleto excitado reage com biomoléculas (lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), transferindo elétrons para gerar radicais livres ou íons radicais que interagem com o O_2 , ocorrendo a geração das EROs, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\bullet$) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Na reação Tipo II, o FS no estado tripleto interage diretamente com o O_2 , através da transferência de energia para o oxigênio em seu estado tripleto fundamental (3O_2), fazendo com que este se torne oxigênio singlete (1O_2), uma molécula altamente reativa e citotóxica. A reação Tipo II é considerada a mais predominante, embora seja possível que as duas reações ocorram ao mesmo tempo, dependendo do tipo de FS utilizado e do O_2 disponível.^{72,79}

Figura 3 – Diagrama de Jablonski esquematizando as reações da Inativação Fotodinâmica.

Fonte: Adaptada e traduzida de KASHEF; HAMBLIN⁸⁰

As respostas celulares provocadas pelas espécies reativas formadas durante a IFD podem seguir diversos caminhos, levando à morte por necrose, apoptose ou autofagia, dependendo de qual espécie reativa estará presente. O mecanismo de morte celular é influenciado também pelo tipo de célula alvo (célula tumoral, bacteriana, etc.), pela concentração de oxigênio presente no meio e o tipo de FS utilizado, bem como da sua localização dentro da célula no momento da iluminação, afetando membranas, mitocôndrias e outras organelas.^{70,81}

Em insetos, tem sido demonstrado desde Barbieri⁷⁴ que o principal dano provocado pela IFD ocorre no trato digestivo.⁸ Estudos de De Souza *et al.* com Photogem^{®82} e curcumina⁸³ em larvas de *Ae. aegypti* identificaram a presença de cada FS no interior do intestino médio por microscopia de fluorescência confocal, destacando o dano nessa região. À nível celular, as principais alterações ocorrem nas membranas celulares da parede do intestino médio, dificultando a digestão, o que leva à inibição da alimentação e consequente estresse no organismo do inseto, resultando em sua morte.^{8-9,78} Uma das vantagens em utilizar a IFD no controle de vetores está justamente no mecanismo de ação da técnica, em que a morte celular ocorre por diferentes vias e não há indícios de efeitos mutagênicos, minimizando os riscos do desenvolvimento de resistência.⁹

2.4.2 Fotossensibilizadores

Os FSs são moléculas que possuem cromóforos em sua estrutura, capazes de absorver a luz em λ específicos, desencadeando reações fotoquímicas ou fotofísicas.^{71,84} Para ser considerado um FS para aplicações *in vivo*, a molécula deve obedecer à alguns critérios que variam conforme a aplicação da IFD, como não apresentar toxicidade no escuro, ter boa solubilidade em tecidos biológicos e ser seletivo para a célula alvo.⁸⁵ A classificação tradicional dos FSs considerava apenas as especificações para aplicação no tratamento de tumores, sendo dividida em três gerações: a primeira geração compreende o primeiro FS comercializado, uma mistura de derivados de hematoporfirina; a segunda geração inclui FSs sintéticos, como ácido 5-aminolevulínico, ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas; e a terceira geração consiste em FSs modificados (imobilizados ou encapsulados), com o objetivo de aumentar a seletividade em tecidos tumorais.⁸⁴ Apesar da classificação ser para FSs antitumorais, muitos deles têm também atividade antimicrobiana. Além dessas classes de FSs, há também os compostos sintéticos derivados de corantes como eritrosina, azul de metileno, rosa bengala e indocianina verde; e os derivados de produtos naturais, como a curcumina, riboflavina e perilenequinonas.⁸⁵

Para a aplicação como fotoinseticida, é essencial que o FS absorva luz na região entre UV e visível do espectro eletromagnético, pois a fonte de iluminação nesse caso será sempre a natural, vinda da luz solar, já que o objetivo é aplicar o FS no ambiente como forma de controle vetorial. Dentre as principais classes de compostos já testados como fotolarvicidas, estão os derivados de xantenos, acridinas, clorinas curcumina e porfirinas.⁹

2.4.3 Curcumina

A curcumina é o principal curcuminóide encontrado nos rizomas de plantas do gênero *Curcuma*, da família *Zingiberaceae*, sendo a *Curcuma longa* a mais comumente encontrada no mundo. Também chamada de Açafrão-da-Índia, a *Curcuma* é conhecida por suas propriedades medicinais anti-inflamatórias, e como tempero e corante alimentício na culinária.⁸⁶ A coloração amarela da *Curcuma* deve-se aos curcuminóides presentes, sendo em grande parte a curcumina (~77%), a demetoxicurcumina (~17%) e a bisdemetoxicurcumina (~3%).⁸⁷ Apesar de ser possível isolar esses compostos a partir dos rizomas, eles também podem ser sintetizados quimicamente através de diversos processos.⁸⁸⁻⁸⁹

O nome químico da curcumina é 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona, e sua fórmula $C_{21}H_{20}O_6$. Em sua estrutura, estão presentes dois anéis fenólicos (Figura 4-A), que conferem à molécula a propriedade de absorver luz. A luz é absorvida na região do azul, com um λ máximo de absorção que costuma variar entre 420 e 450 nm, uma vez que suas propriedades espectrais e fotoquímicas são influenciadas pelo solvente em que se encontra (Figura 4-B).⁹⁰ A curcumina é altamente hidrofóbica, sendo praticamente insolúvel em água, mas é solúvel em diversos solventes orgânicos como metanol, etanol e dimetilsulfóxido.⁸⁷

Figura 4 – A: Estrutura química da curcumina. B: Espectros de absorbância e fluorescência da curcumina em diferentes solventes (1: acetonitrila, 2: tolueno, 3: etanol, a: absorbância, f: fluorescência).

Fonte: Adaptada de CHIGNELL *et al.*⁹⁰

Apesar de vários estudos mostrarem suas propriedades anticâncer, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antivirais,^{87,91} devido à sua capacidade de atuar como um cromóforo, a curcumina tem sido estudada também como um FS,⁷¹ tendo seus efeitos potencializados na presença da luz. A IFD utilizando a curcumina como FS tem se mostrado eficiente contra diversos tipos de microrganismos, desde os estudos *in vitro*⁹²⁻⁹³ até estudos aplicados, como em

tratamentos na odontologia.⁹⁴ em infecções de garganta,⁹⁵ na descontaminação de alimentos⁹⁶ e de utensílios hospitalares,⁹⁷ entre outras aplicações.

Alguns estudos mostram que extratos e óleos essenciais de *Curcuma longa* possuem atividade larvícida e repelente,^{56,98} bem como os curcuminóides isolados.⁹⁹ No entanto, nosso grupo foi o pioneiro em demonstrar a ação da curcumina aplicando a técnica da IFD em larvas de *Ae. aegypti*, identificando o potencial em utilizar a curcumina como fotolarvícida.⁷

3 ESTUDOS DA FOTODEGRADAÇÃO DA CURCUMINA COM D-MANITOL

3.1 Contextualização

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa realizou diversos testes com a curcumina em diferentes formulações, visando simultaneamente aumentar a solubilidade da curcumina em água e melhorar a palatabilidade da formulação para as larvas, otimizando seu efeito fotolarvicida. Entre as formulações testadas, a mistura física da curcumina com o D-manitol foi a que apresentou melhores resultados, considerando a eficácia fotolarvicida.¹⁰⁰ O D-manitol é um carboidrato poliol encontrado naturalmente em diversos vegetais, sendo muito utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica.¹⁰¹⁻¹⁰² Além disso, o D-manitol é considerado um eficiente transportador de fármacos, aumentando a biodisponibilidade de partículas e formulações em até 50%.¹⁰³

Nesse capítulo, a formulação de curcumina junto ao D-manitol foi analisada e caracterizada a partir da investigação de seu processo de fotodegradação (“*photobleaching*”) tanto em luz branca, com objetivo de simular a luz solar, como em luz azul.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Preparo da formulação de curcumina com D-manitol (CDM)

A curcumina foi sintetizada pelo Laboratório de Química Bio-orgânica da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos- SP, Brasil), seguindo o protocolo descrito por Carmona-Vargas *et al.*⁸⁹ A curcumina foi misturada e triturada manualmente com D-manitol (*Sigma-Aldrich*®), na proporção 1:99 ($m_{\text{Curcumina}}:m_{\text{D-manitol}}$), utilizando gral e pistilo para a trituração. A mistura foi solubilizada em água destilada (pH = 7) e sonicada por 5 a 7 minutos, para melhor homogeneização. A concentração da solução estoque de curcumina com D-manitol (CDM) foi aferida por um espectrofotômetro UV-vis *Varian Cary*® (*Varian Medical Systems, EUA*), utilizando uma curva padrão de concentrações. Uma nova solução CDM foi preparada a cada experimento realizado para evitar efeitos de degradação.

3.2.2 Caracterização da formulação de curcumina com D-manitol (CDM) por espectroscopia de UV-vis e fluorescência

A formulação CDM, a 100 mg.L⁻¹, foi analisada por espectroscopia UV-vis, para obtenção do espectro de absorbância, e por espectrofluorimetria, para obtenção do espectro de

fluorescência, com excitação em $\lambda = 450$ nm. Foi analisada também, para fins de comparação, a curcumina dissolvida em etanol absoluto (100 mg.L^{-1}), com obtenção de seu espectro no UV-vis e fluorescência, com excitação em $\lambda = 430$ nm.

3.2.3 Determinação do espectro da lâmpada fluorescente

O espectro da lâmpada fluorescente (18W) foi obtido utilizando-se um espectralradiômetro *Ocean Optics*® USB 4000-UV-Vis (*Ocean Optics, EUA*), com a fibra óptica à 90° da superfície. Para fins de comparação, também foi obtido espectro da luz solar.

3.2.4 Fotodegradação em lâmpada fluorescente

Inicialmente, foi obtida uma curva padrão de calibração utilizando diferentes concentrações de CDM ($15, 30, 50, 100, 150$ e 250 mg.L^{-1}), com medida espectral por UV-vis. Em seguida, o estudo de fotodegradação da CDM, a uma concentração de 100 mg.L^{-1} , foi realizado em recipientes plásticos transparentes contendo 200 mL da solução. Como fonte de iluminação, foram utilizadas duas lâmpadas brancas fluorescentes (18W, irradiância média = $0,5 \text{ mW.cm}^{-2}$), com fotoperíodo 12:12h luz:escuro (L:E), em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$). A solução permaneceu nessas condições durante 14 dias, e alíquotas de cada amostra foram recolhidas a cada 24h para análise por espectrofotometria UV-vis. Para o cálculo da porcentagem de degradação em relação à solução inicial, utilizou-se a curva de calibração padrão obtida anteriormente. Para obter o tempo (t) de degradação da solução (τ), calculou-se uma curva de decaimento exponencial ajustada aos pontos relativos à área dos espectros de absorção, utilizando a equação (1):

$$Y(t) = Y_0 e^{\frac{-t}{\tau}} \quad (1)$$

3.2.5 Fotodegradação em luz azul

A fotodegradação da CDM, a uma concentração de 100 mg.L^{-1} , foi realizada em placas de cultivo celular de 6 poços, com volume total de 15 mL . Como fonte de iluminação azul, foi utilizada uma *Biotable*®, composta por LEDs comerciais de $\lambda = 450$ nm (irradiância média = 40 mW.cm^{-2}). O processo de fotodegradação foi acompanhado por espectrofotometria UV-vis, recolhendo-se alíquotas periodicamente a cada 1h.

3.2.6 Análise dos dados

Todos os dados foram processados e analisados utilizando o software *Origin 2020* (*OriginLab*[®], EUA). Para o cálculo da curva padrão de calibração, foi utilizada a função de ajuste de regressão linear. Para o cálculo do tempo de decaimento da CDM, foi utilizada a função ExpDec1, correspondente à Equação (1), com integração dos espectros de absorção para obtenção dos dados da curva de decaimento.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Caracterização da formulação de curcumina com D-manitol (CDM) por espectroscopia de UV-vis e fluorescência

Os espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência da CDM estão representados na Figura 5, juntamente com os espectros da curcumina em etanol, para comparação. Os espectros da CDM são característicos da curcumina, com um máximo de absorção em 446 nm e máximo de emissão de fluorescência em 543 nm.⁹⁰ Embora a mistura física com o D-manitol aumente visivelmente a solubilidade da curcumina em meio aquoso, há um desvio espectral para o vermelho quando comparado com a curcumina em etanol, principalmente na absorção, em que ocorre também um alargamento considerável da banda. Isso provavelmente ocorreu devido à interação entre as moléculas de curcumina e de D-manitol na solução. Desvios semelhantes foram encontrados na absorção da curcumina quando conjugada à albumina de soro bovino (450 nm)¹⁰⁴ e na emissão da fluorescência quando dissolvida em etanol (550 nm), DMSO (550 nm), entre outros.¹⁰⁵

Figura 5 – Perfis espectrais normalizados da solução CDM (em azul) e da curcumina em etanol (em vermelho), com a absorbância no UV-vis representada pela linha cheia e a emissão de fluorescência representada pela linha pontilhada. Espectro de emissão de fluorescência com excitação em $\lambda = 450$ nm para a CDM e em $\lambda = 430$ nm para a curcumina em etanol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a construção de uma curva de calibração padrão da CDM, foram obtidos espectros de absorção no UV-vis em diferentes concentrações (15, 30, 50, 100, 150 e 250 mg.L^{-1}) (Figura 6 – A). Observou-se uma relação linear entre as concentrações e o aumento da absorbância em 446 nm (Figura 6 – B), sendo possível ajustar uma reta aos dados e calcular a equação correspondente, que foi utilizada para calibrar as concentrações de todos os experimentos realizados com a solução CDM.

Figura 6 – A: Absorbância no UV-vis da solução CDM em diferentes concentrações (linha tracejada: absorbância máxima em 446 nm); B: Curva de calibração da solução CDM, com base na absorbância máxima em 446 nm. Inserto: Equação linear da reta ajustada, com respectivo fator de ajuste R^2 .

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2 Fotodegradação em lâmpada fluorescente

Para serem eficazes em criadouros no meio ambiente, fotolarvicidas devem apresentar eficácia ótima na luz solar. Sabe-se que a curcumina é eficaz na luz solar, como foi demonstrado em experimentos de semi-campo e campo por Souza.¹⁰⁰ Assim, para comparar a irradiância da luz solar com a das lâmpadas fluorescentes utilizadas em laboratório, os espectros de ambas foram sobrepostos (Figura 7). Na região de interesse para a absorção da curcumina (entre 400 e 500 nm), foi observado que os espectros se sobrepõem em cerca de 80%. Dessa maneira, concluiu-se que as lâmpadas fluorescentes são suficientes para simular as condições de irradiância da luz solar em laboratório.

Figura 7 – Sobreposição normalizada dos perfis espectrais do sol (em azul) e da lâmpada fluorescente (em vermelho), excluindo-se as linhas de mercúrio. Inseto: Espectro completo da lâmpada fluorescente.
Fonte: Elaborada pela autora.

A solução CDM foi fotodegradada durante 14 dias utilizando as lâmpadas fluorescentes como fonte de iluminação, que foram mantidas em fotoperíodo de 12:12h (L:E). A cada dia, o espectro de absorção no UV-vis da solução foi registrado (Figura 8 – A). A dose total de energia recebida pela solução nesse período foi de $302,4 \text{ J.cm}^{-2}$. A Figura 8 – B mostra a curva do decaimento da área dos espectros, e a equação utilizada para verificar a tendência exponencial resultou em um tempo de decaimento $\tau = 2,44 \pm 0,60$ dias.

Figura 8 – A: Espectros de absorção UV-vis da solução CDM durante a fotodegradação em lâmpada fluorescente; B: Decaimento exponencial da área dos espectros de absorção ao longo do tempo ($R^2 = 0,91$); C: Porcentagem de degradação da solução CDM ao longo do tempo, comparada à solução inicial, com relação à absorção em 446 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 8 – C, observa-se a taxa de fotodegradação ao longo dos dias. No segundo dia, a degradação já chega à 67%, aumentando gradualmente até o sétimo dia (96%), onde se mantém quase constante, chegando à 100% no 14º dia. A fotodegradação da curcumina ocorre devido a uma cascata de processos fotofísicos e fotoquímicos na presença de O_2 , como descrito no diagrama de Jablonski. As EROs e o oxigênio singleto formados durante esses processos, promovem reações de oxidação na própria estrutura molecular da curcumina, formando produtos de degradação.

Ademais, comparando com a literatura, uma taxa menor de fotodegradação foi observada, quando comparada ao estudo de fotodegradação da curcumina em outros solventes.^{7,106} Isso ocorreu pois provavelmente houve uma degradação e dissolução simultânea da curcumina junto ao D-manitol, já que a curcumina não está completamente solubilizada. Além disso, não foi possível identificar formação de fotoprodutos nos espectros de absorção da Figura 8 – A, o que pode ter ocorrido devido à degradação lenta, fazendo com que os fotoprodutos formados não apresentassem concentração suficiente para serem detectados pela técnica de espectrofotometria UV-vis.

3.3.3 Fotodegradação em luz azul

A fotodegradação da solução CDM foi realizada também utilizando uma fonte de luz azul (LED 450 nm). Essa fotodegradação durou um período de 6h, acompanhada a cada hora com registro do espectro de absorção no UV-vis (Figura 9), até que o máximo de absorção (446 nm) da amostra decaísse consideravelmente. A dose total de energia absorvida pela amostra nesse período foi de 864 J.cm^{-2} .

Figura 9 – Espectros de absorção UV-vis da solução CDM durante a fotodegradação em luz azul. As setas indicam o aumento de picos de fotoprodutos nos λ correspondentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar que o perfil de degradação da curcumina é diferente nas duas condições de iluminação (lâmpada fluorescente e luz azul). Na primeira (Figura 8), a degradação ocorre mais lentamente, devido à menor irradiância fornecida pela lâmpada ($0,5 \text{ mW.cm}^{-2}$) e por esta emitir luz num amplo espectro (Figura 7). Já na segunda (Figura 9), a fotodegradação ocorre muito mais rapidamente, devido à alta irradiância da fonte de luz (40 mW.cm^{-2}) e por esta ser monocromática, emitindo toda a intensidade de luz na faixa em que há máxima absorção da molécula de curcumina. Além disso, o máximo de absorção em 446 nm não decai completamente, havendo um deslocamento para o azul. Há também uma geração de fotoprodutos bem pronunciada na região de 200 a 350 nm, com aumento dos picos de absorção em 230 nm, 280 nm, 315 nm e 350 nm. Os picos de fotoprodutos observados são semelhantes aos encontrados por Tønnesen *et al.*,¹⁰⁶ que identificou vanilina, ácido ferúlico e ácido vanilínico como alguns dos compostos de degradação formados.

3.4 Conclusão

A caracterização da formulação CDM por espectroscopia de UV-vis e fluorescência permitiu avaliar que a molécula de curcumina mantém seu perfil espectral quando misturada ao D-manitol, com pequenas modificações. O estudo da fotodegradação em luz branca fluorescente demonstrou que a degradação nessas condições de irradiância ocorre lentamente, não sendo possível identificar a formação de fotoprodutos pela técnica utilizada. Além disso, a fotodegradação em luz azul ocorreu muito mais rapidamente, devido à monocromia e intensidade da fonte de luz utilizada (LED), modificando o perfil espectral da curcumina e tornando evidente a formação de fotoprodutos.

4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS CRÔNICOS DA IFD COM CURCUMINA NO DESENVOLVIMENTO DO *Ae. aegypti* EM LABORATÓRIO

4.1 Contextualização

A alteração dos parâmetros ambientais pode influenciar, positiva ou negativamente, no *fitness* biológico do mosquito. Com isso, fatores como competência vetorial, transmissão viral e mecanismos de resistência podem ser modificados.³⁵ Assim, para viabilizar a aplicação da curcumina como fotolarvicida no meio ambiente, surgem questões acerca dos efeitos provocados no desenvolvimento de larvas sobreviventes.

Nesse capítulo, a ação fotolarvicida crônica foi investigada em larvas L1, possibilitando a observação dos efeitos desde o desenvolvimento larval até o mosquito adulto, e em larvas L3, estágio de vida recomendado pela OMS para testes com larvicidas.¹⁰⁷ Foram avaliadas também a ação ovicida da formulação CDM e a persistência de sua ação fotolarvicida ao longo do tempo de exposição.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Obtenção de ovos e criação de larvas de *Aedes aegypti*

Os ovos de *Ae. aegypti* (cepa *Rockfeller*) utilizados nos experimentos foram doados pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (IOC - Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ, Brasil). Os ovos foram armazenados em cartelas de papel filtro (Figura 10-A), em condições ambiente, até o momento de uso.

Para a criação das larvas, foi adicionada uma cartela de ovos em uma bandeja plástica contendo cerca de 1,5L de água decolorada (Figura 10-B), à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), com fotoperíodo 12h:12h L:E. Para estimular a eclosão¹⁰⁸ e alimentar as larvas neonatas, foram adicionadas algumas unidades de fermento biológico seco instantâneo e ração para peixes (*sera*® *Pond Flakes*) triturada manualmente com gral e pistilo. As larvas permaneceram na bandeja de criação até que atingissem o instar desejado para a realização dos experimentos, sendo alimentadas periodicamente com a ração para peixes.

Figura 10 – A: Cartela de papel filtro contendo ovos de *Ae. aegypti* fixados. B: Bandeja de criação das larvas.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Curvas de mortalidade

Os testes para obtenção da curva de mortalidade da atividade fotolarvicida foram realizados seguindo as recomendações da OMS¹⁰⁷ com modificações. Para o ensaio, foram utilizadas placas de cultivo celular de 6 poços, com volume de 15 mL, onde adicionou-se 15 larvas L1 ou L3, água deionizada e o volume de solução CDM (preparada conforme descrito na Seção 3.2.1) em diferentes concentrações, completando um volume de 15 mL. Além dos grupos de tratamento, foram utilizados três grupos controle: somente água (Controle Água), água com D-manitol (equivalente à concentração de D-manitol presente na maior concentração da solução CDM, denominado Controle D-manitol) e controle escuro, com a maior concentração de CDM utilizada nos testes. Os experimentos foram realizados em triplicata (tanto para os testes com L1 quanto com L3, realizados separadamente), utilizando um sistema com duas lâmpadas brancas fluorescentes de 18W, com fotoperíodo 12:12h L:E, em temperatura ambiente ($25 \pm ^\circ\text{C}$). A mortalidade larval foi verificada após 24h do início dos testes. A partir das taxas de mortalidade das concentrações letais (CLs), foi calculada uma curva de dose-resposta através de regressão não-linear.

4.2.3 Estudos de desenvolvimento sob exposição crônica subletal

4.2.3.1 Montagem experimental e parâmetros analisados

A partir da curva de mortalidade calculada na seção anterior para cada instar (L1 e L3) e seguindo a metodologia de Shaalan *et al.*¹⁰⁹ com modificações, foram selecionadas 3

concentrações letais para realizar os testes de desenvolvimento: CL_{25-24h}, CL_{50-24h} e CL_{75-24h}, correspondentes a 25%, 50% e 75% de letalidade, respectivamente.

Os testes foram realizados à temperatura ambiente (25±2 °C) e fotoperíodo 12:12h L:E, utilizando copos plásticos transparentes, onde foram colocadas entre 15 e 20 larvas L1 ou L3, sendo adicionada água filtrada e decolorada e o volume de solução CDM correspondente à CL desejada, totalizando um volume de 50 mL. Os grupos-controle foram Controle Água e Controle D-manitol. Como fonte de iluminação, foi utilizada a mesma montagem e fotoperíodo das lâmpadas fluorescentes da seção anterior, com os copos distribuídos conforme a Figura 11-A, de modo a garantir uma iluminação mais homogênea. A ração foi adicionada nos copos após 24h do início dos testes e em dias alternados ao longo da duração da fase larval. Os copos foram verificados diariamente até a emergência do último adulto, com registro diário de mortalidade e ecdise. Além disso, foi realizada diariamente a limpeza e retirada dos exoesqueletos utilizando uma pipeta Pasteur descartável. Conforme a mortalidade, as larvas remanescentes eram reagrupadas dentro da mesma condição de tratamento, com o intuito de, sempre que possível, manter uma densidade populacional equivalente em todos os grupos, para que não houvesse influência de competição no desenvolvimento.¹¹⁰⁻¹¹¹

Após a pupação, as pupas foram transferidas para copos com água limpa (de 5 a 10 pupas por copo), separadas de acordo com seus respectivos grupos experimentais e com a data de pupação. Os copos foram colocados dentro de gaiolas adaptadas, que consistiam em recipientes plásticos de 500 mL cobertos com tule para evitar a fuga dos mosquitos (Figura 11-B). Após emergência, os mosquitos adultos foram contados e o gênero de cada um foi verificado pelo padrão de plumagem das antenas.³⁰ Os mosquitos foram alimentados *ad libitum* com solução de sacarose 10% (m/v), através de um alimentador adaptado utilizando um tubo cilíndrico de 5mL e algodão (Figura 11-C). Areia ornamental foi depositada no fundo dos recipientes, de modo a evitar a morte acidental dos mosquitos presos ao plástico, devido aos cristais de açúcar vindos da alimentação.¹¹² As gaiolas foram inspecionadas em dias alternados, desde a primeira emergência até a morte do último adulto, com registro da data de mortalidade para a análise de longevidade, através de curvas de sobrevivência.

Figura 11 – A: Montagem experimental das lâmpadas fluorescentes e distribuição dos copos. B: Distribuição dos recipientes utilizados como gaiolas durante a análise da longevidade. C: Detalhes, das gaiolas de criação dos mosquitos.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.3.2 Análise do tamanho das asas

Após a identificação da morte, cada mosquito foi recolhido de sua gaiola com auxílio de uma pinça e depositado em álcool 70% (v/v) para conservação. Com o auxílio de um estereomicroscópio *Zeiss Stemi DV4* (*Zeiss*®, *Alemanha*) e uma agulha entomológica, uma asa viável de cada mosquito, escolhida aleatoriamente, foi retirada e colocada em uma placa de Petri com álcool 70% (v/v). Um pincel foi utilizado para retirar o excesso de escamas das asas, facilitando a marcação posterior dos pontos anatômicos. As asas foram fixadas com bálsamo do Canadá sintético (*Êxodo*® *Científica, Brasil*) em lâminas microscópicas, recobertas com lamínulas.

Após a secagem, as lâminas foram imageadas por um microscópio óptico invertido *Nikon Eclipse Ti-S* (*Nikon*®, *Japão*), com aumento de 4x. Cada asa foi digitalizada e formatada em arquivo .tps pelo software *TPS View Digital Imaging*, e foram selecionados 18 pontos anatômicos (Figura 12) com o software *tpsDig 1.11.0.0* (*Rohlf, EUA*),¹¹³ seguindo a metodologia de Vidal e Suesdek.¹¹⁴ O tamanho das asas foi analisado com base nos cálculos de tamanho do centroide (TC) das asas, utilizando o software *CLIC* (*Dujardin, França*).¹¹⁵ O TC é a medida da raiz quadrada da soma das distâncias quadráticas entre o centroide da asa e cada ponto anatômico.¹¹⁶

Figura 12 – Asa de *Ae. aegypti* com os 18 pontos anatômicos selecionados segundo Vidal e Suesdek.¹¹⁴
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4 Atividade ovicida

Os estudos de ação ovicida da CDM foram realizados utilizando uma adaptação das metodologias de Ganesan *et al.*¹¹⁷ e Prajapati *et al.*¹¹⁸ Cerca de 30 ovos, estocados por aproximadamente 3 meses, foram selecionados com o auxílio de um pincel e de um estereomicroscópio Zeiss Stemi DV4 (Zeiss®, Alemanha) e colocados em copos plásticos com 20 mL da solução CDM em diferentes concentrações. Como grupo controle, foi utilizado apenas água. Os experimentos ocorreram em triplicata, em iluminação e temperatura ambiente (25 ± 2 °C). A eclosão dos ovos, indicada pela abertura do opérculo, foi verificada após 144h e a taxa de viabilidade foi calculada. Todos os ovos foram analisados no estereomicroscópio para identificar possíveis alterações morfológicas.

4.2.5 Estudos de persistência da ação fotolarvicida

A avaliação da persistência da ação da CDM como fotolarvicida em laboratório foi realizada seguindo a metodologia de Vani *et al.*¹¹⁹ com modificações. Os testes foram realizados à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), fotoperíodo 12:12h L:E, com duas concentrações diferentes, calculadas de acordo com a curva de mortalidade obtida para L3 na Seção 4.2.2: CL_{99-24h} (0,4 mg.L⁻¹) e 10x a CL_{99-24h} (4 mg.L⁻¹). Cerca de 15 a 20 larvas L3 foram colocadas em recipientes plásticos transparentes contendo 200 mL de solução CDM nas respectivas concentrações. Os grupos utilizados como controles foram o controle D-manitol e controle escuro com 10x a CL_{99-24h}. A cada 24h, a mortalidade larval foi registrada e todas as larvas (vivas e mortas) foram retiradas com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável, sendo substituídas por novas larvas do mesmo instar. O registro e reposição diária das larvas continuou até que houvesse perda completa da eficácia do fotolarvicida, indicada pela ausência de mortalidade em 24h.

4.2.6 Análise estatística

Todas as medidas experimentais foram realizadas em triplicata, utilizando no mínimo 3 réplicas por grupo. Nos cálculos das curvas de mortalidade, foi realizado uma regressão não linear utilizando o software *Origin 2020* (*OriginLab*[®], EUA). Para comparações entre grupos, foi aplicado teste de análise de variância (*one way ANOVA* ou *ANOVA* de medidas repetidas), com teste de Tukey *post-hoc*. Para comparação entre as proporções sexuais, foi utilizado o teste de chi-quadrado (χ^2), comparando os grupos em pares. As curvas de sobrevivência foram calculadas pelo método Kaplan-Meier, e as análises comparativas foram realizadas através do teste de *Log-rank* (Mantel-Cox), comparando as curvas em pares. Todos os testes estatísticos foram realizados no software *GraphPad Prism 8* (*GraphPad*, EUA) e foi considerado um nível de significância de 0,05 entre os grupos.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Curvas de mortalidade e determinação das concentrações letais

As curvas de mortalidade da CDM para larvas L1 (Figura 13-A) e L3 (Figura 13-B) foram obtidas após 24h. O ajuste das curvas foi realizado com sucesso, resultando em um fator de ajuste $R^2 = 0,98$ para L1 e $R^2 = 0,99$ para L3. A partir dessas curvas, foram calculadas as CLs da CDM (CL_{25} , CL_{50} e CL_{75}), mostradas na Tabela 4. Não foi observada letalidade nos grupos controle.

Figura 13 – Curvas de mortalidade da CDM após 24h para larvas L1 (A) e L3 (B). A curva vermelha corresponde à regressão não-linear por uma curva de dose resposta ajustada aos pontos ($R^2_{L1}=0,98$; $R^2_{L3}=0,99$) e a área em cinza delimitada pelas linhas tracejadas corresponde ao intervalo de previsão de 95%.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 – Concentrações letais (CL₂₅, CL₅₀ e CL₇₅) da CDM para larvas L1 e L3 em 24h.

	CL ₂₅ (LIC-LSC) (mg.L ⁻¹)	CL ₅₀ (LIC-LSC) (mg.L ⁻¹)	CL ₇₅ (LIC-LSC) (mg.L ⁻¹)
L1	0,043 (0,031-0,056)	0,122 (0,098-0,154)	0,351 (0,258-0,499)
L3	0,056 (0,048-0,064)	0,088 (0,082-0,094)	0,131 (0,118-0,149)

LIC: Limite Inferior de Confiança; LSC: Limite Superior de Confiança

Fonte: Elaborada pela autora.

Ambas as curvas para L1 (Figura 13-A) e L3 (Figura 13-B) seguem perfis semelhantes de dose-resposta. Os valores de CL encontrados (Tabela 4) mostram que concentrações relativamente baixas da CDM foram necessárias para provocar a morte das larvas, mesmo realizando os experimentos em condições de baixa irradiância (0,5 mW.cm⁻²). As concentrações letais obtidas estão na mesma escala dos valores encontrados para CL₅₀ em 24h por Souza ¹²⁰ com a CDM, onde os estudos foram realizados com larvas L3 em condições de iluminação natural (sol e sombra). É importante ressaltar que os nossos valores para CL₅₀ foram significativamente menores do que os reportados por outros estudos em larvas L3 de *Ae. aegypti* utilizando diversos compostos naturais, como extratos de plantas e óleos essenciais (maioria das CL₅₀ entre 10 a 100 mg.L⁻¹),^{55,121-122} e também com outros FS, como derivados de porfirinas (CL₅₀ = 2,11 mg.L⁻¹ em luz solar difusa),¹²³ eosina azul de metileno (concentrações ótimas de 5 a 50 mg.L⁻¹ em LEDs brancos RGB),¹²⁴ Photogem[®] (concentrações ótimas de 20 a 80 mg.L⁻¹ em luz branca artificial e solar)⁸² e α - tertienil (CL₅₀ = 0,27 mg.L⁻¹ em luz negra à 365 nm)¹²⁵. Além disso, os valores de CL₅₀ foram menores ou em escala similar aos dos larvicidas atualmente recomendados pela OMS, como *diflubenzuron* (CL₅₀ = 0,9 mg.L⁻¹ para cepa *Rockfeller*)¹²⁶, *spinosad* (CL₅₀ = 0,02 mg.L⁻¹ para cepa *Rockfeller*)¹²⁷ e *Bti* (CL₅₀ = 0,06 mg.L⁻¹).¹²⁸

4.3.2 Análise dos parâmetros de desenvolvimento a partir do L1

4.3.2.1 Desenvolvimento das formas imaturas sob exposição crônica subletal

A avaliação do desenvolvimento das larvas expostas às CLs obtidas na Seção 4.3.1 foi observada a partir do L1 até a emergência dos adultos, com o crescimento identificado pelas ecdises. Os resultados na Figura 14-A mostram atraso no desenvolvimento das larvas sobreviventes à exposição da CDM quando comparado aos grupos controle. Esse atraso foi significativo durante todo o período de desenvolvimento (p = 0,0022). Considerando cada estágio de vida separadamente, o tempo para atingir cada estágio nos grupos tratados foi significativamente diferente em relação ao Controle Água, com as maiores diferenças

ocorrendo no L3 (*e.g.*: Controle Água = $4,3 \pm 0,9$ dias, CL₇₅ = $8,4 \pm 0,9$ dias) e L4 (*e.g.*: Controle Água = $6,23 \pm 1,07$ dias, CL₇₅ = $10,2 \pm 1,4$ dias). Observando as taxas de mortalidade em cada estágio de vida na Figura 14-B, nota-se que a maior letalidade ocorreu logo nos dias iniciais dos tratamentos, devido à fase mais ativa da IFD. A mortalidade atingiu um patamar entre o L1 e L2 que se manteve praticamente o mesmo nos estágios seguintes, demonstrando que a maioria das larvas sobreviventes à essa fase conseguiram emergir com sucesso. As taxas de mortalidade para cada CL foram maiores do que as previstas pelas curvas de mortalidade da Seção 4.3.1. Isso ocorreu devido à essas curvas terem sido realizadas em apenas 24h de tratamento, enquanto os tratamentos crônicos foram avaliados em períodos de tempo bem mais extensos.

Figura 14 – A: Período médio de desenvolvimento a partir do L1 até a emergência dos adultos, sob exposição crônica subletal à CDM. As letras acima dos grupos na legenda do gráfico (a e b) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$). Os símbolos (*), (**), (***) e (****) mostram diferença estatística significativa entre cada grupo e o controle água em cada estágio de vida, sendo correspondentes a $p \leq 0,05$; 0,01; 0,001 e 0,0001, respectivamente. B: Mortalidade média ao longo do desenvolvimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Sabe-se que a curcumina atua danificando as células da região do intestino médio da larva através do estresse oxidativo provocado pela IFD,⁷ sendo que os principais danos ocorrem na membrana peritrófica e no epitélio intestinal, como identificado pelas análises microespectroscópicas Raman realizada por Souza.¹⁰⁰ Devido ao intestino médio ser um órgão essencial no processo de crescimento e metamorfose, quaisquer interferências no seu desenvolvimento normal reduzem a capacidade de absorção e reserva de nutrientes da larva.^{129,130} Assim, o atraso no desenvolvimento nos grupos tratados provavelmente foi provocado pelo processo de reparo das células do intestino médio, na tentativa do organismo em recuperar a área danificada pela IFD. Com o dano na região, a digestão foi prejudicada,

fazendo com que a larva demorasse mais para conseguir obter os nutrientes necessários para ganhar massa e realizar a ecdise para o próximo estágio da metamorfose. Quando o dano foi irreparável pelo organismo, ocorreu a morte da larva, muitas vezes presa ao seu exoesqueleto, devido à incapacidade de realizar a ecdise. Com isso, as larvas sobreviventes conseguiram, de alguma forma, regenerar grande parte das células do intestino médio o suficiente para permanecerem vivas, embora o ganho de nutrientes e o processo de ecdise tenham sido retardados. As taxas de mortalidade observadas ajudam a explicar a regeneração, em que grande parte das larvas morreu logo no início do tratamento, período em que a curcumina estava mais disponível e fotoativa, conforme a CL utilizada. Após esse período de maior toxicidade, a maioria das larvas sobreviventes recuperaram os danos ao longo do crescimento e conseguiram completar a metamorfose.

O atraso no desenvolvimento é um importante fator considerando a vida na natureza. Devido à todas as formas imaturas do mosquito serem aquáticas, elas se tornam mais suscetíveis a predadores, disponibilidade nutricional e distúrbios no microambiente dos criadouros. Portanto, ao prolongar a duração do período aquático, a sobrevivência na natureza é consequentemente desfavorecida.

4.3.2.2 Proporção sexual dos adultos emergidos após exposição crônica subletal

A proporção sexual de machos e fêmeas que emergiram a partir do L1 está demonstrada na Figura 15. Durante todos os testes, foi utilizado um total de 180 larvas L1 em cada grupo controle e 280 larvas L1 em cada grupo tratamento. Na Figura 15 estão representados o total de mosquitos que emergiram ao final dos experimentos em cada grupo (N), bem como as taxas de emergência. Ao observar as proporções, é possível notar que a maior distorção na proporção sexual ocorreu na CL₇₅, com um aumento de fêmeas em relação aos machos. No entanto, a população analisada é pequena quando comparada ao controle, sendo analisados somente 23 indivíduos comparando com 153 do controle água, devido à alta mortalidade nessa concentração, com emergência de apenas 8,2% dos indivíduos.

Figura 15 – Proporção sexual dos adultos emergidos a partir do L1. Estão representados o total de mosquitos emergidos (N) e a taxa de emergência para cada grupo. As letras acima dos grupos no eixo vertical do gráfico (a,b e c) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (χ^2 ; $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos mostram que é comum haver uma proporção levemente maior de machos do que fêmeas nas populações de *Ae. aegypti*, devido à um fator genético hereditário que aumenta a predominância de machos, embora a razão primária seja aproximadamente 1:1.¹³¹⁻¹³³ Além disso, outros estudos mostraram que fatores como estresse nutricional e térmico resultam em um viés para machos.¹³³⁻¹³⁵ Bara *et al.*¹³⁴ sugere que fêmeas sejam mais sensíveis ao estresse ambiental do que machos, resultando nesse viés. Entretanto, os resultados encontrados em nosso estudo a partir do L1 demonstraram um viés contrário. Segundo um estudo realizado por Steinwascher,¹¹⁰ a competição larval por comida é diferente entre machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, com dominância das fêmeas, o que foi demonstrado também por Bedhomme *et al.*¹³⁶ Considerando isso, seria intuitivo inferir que as fêmeas teriam ingerido mais partículas da CDM do que os machos, o que proporcionalmente deveria levar à mais mortes. No entanto, Steinwascher¹¹⁰ descreve também que, nos primeiros estágios de vida (L1 e L2), a passagem das partículas alimentares pelo intestino das larvas é rápida, sendo suficiente apenas para a absorção de nutrientes. Levando em conta esses dois fatores descritos por Steinwascher, é possível sugerir que o fluxo digestório no intestino das fêmeas no L1 seja maior que dos machos, devido à dominância na alimentação. Como o trânsito de partículas alimentares é mais rápido, isso resultaria em uma maior taxa de excreção. Com isso, surge a hipótese de que as moléculas de curcumina talvez não permaneçam tempo suficiente no interior do intestino de algumas fêmeas para que a IFD provoque tantos danos, levando à maior chance de sobrevivência.

A prevalência do surgimento de fêmeas pode parecer uma questão preocupante, já que as fêmeas são os vetores das doenças. No entanto, estudos futuros acerca da capacidade de repasto sanguíneo e fecundidade dessas fêmeas serão necessários. Ray *et al.*¹³⁰ afirmam que danos ao intestino médio da larva podem reduzir a fecundidade dos adultos. Isso foi observado por Fernandes *et al.*,¹³⁷ em adultos originados do tratamento com o larvicida *spinosad*, um derivado da fermentação de *Saccharopolyspora spinosa* que também atua danificando o intestino médio das larvas. No estudo, foi identificando extensão do dano no intestino médio dos adultos, provocando redução no repasto sanguíneo e na fecundidade, com diminuição na produção e viabilidade dos ovos.¹³⁷

4.3.2.3 Longevidade dos adultos

A longevidade dos adultos foi acompanhada desde a primeira emergência até a última morte em cada grupo, e a comparação entre os grupos foi realizada separadamente para machos (Figura 16-A) e fêmeas (Figura 16-B). O número de indivíduos analisados (N) em cada grupo está representado nas legendas dos gráficos das Figura 16-A e B, sendo que indivíduos com mortes acidentais foram descartados. Na Figura 16-A, os dados para o grupo CL₇₅ não foram incluídos na análise, devido ao número de indivíduos ter sido insuficiente.

Figura 16 – Curvas de sobrevivência dos adultos, sendo N o número total de indivíduos analisados em cada grupo. A: Machos; B: Fêmeas. As letras acima dos grupos na legenda do gráfico (a, b e c) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Mantel-Cox; $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise das curvas de sobrevivência (Figura 16 – A e B), juntamente com os dados de sobrevivência média apresentados na Tabela 5, permitem afirmar que houve uma redução significativa na longevidade dos grupos tratados, com $p = 0,0229$ para machos e $p < 0,0001$

para fêmeas (análise de Mantel-Cox). No geral, a sobrevivência das fêmeas foi maior do que a dos machos em todos os grupos, o que era esperado.^{13,35}

Tabela 5 – Sobrevivência média (tempo em que 50% dos adultos morreram) em cada grupo.

Grupos	Sobrevivência média (dias)	
	Machos	Fêmeas
Controle Água	31,5	56
Controle D-manitol	30	50
CL25	22	44
CL50	20	39
CL75	–	40

Fonte: Elaborada pela autora.

A longevidade, principalmente da fêmea, é um parâmetro importante a ser considerado, pois está diretamente relacionado à capacidade vetorial do *Ae. aegypti*.^{35,138} Para que uma fêmea consiga transmitir um vírus, é necessário que ela sobreviva o suficiente para picar uma pessoa infectada e passar pelo período de incubação do vírus em seu organismo. Após esse período (que para os vírus DENV pode variar de 7 a 14 dias),³⁵ as partículas virais infectantes estarão presentes na saliva do mosquito, e a transmissão só estará completa quando a fêmea picar novamente. Já para o macho, a sobrevivência está relacionada com o número de oportunidades de acasalamento que terá durante sua vida. Portanto, quanto maior a sobrevivência, maiores serão as chances que o ciclo de transmissão ocorra. Modelos como os de Macdonald¹³⁹ e Garrett-Jones¹⁴⁰ relacionam matematicamente a probabilidade de sobrevivência diária com a capacidade vetorial de mosquitos transmissores de doenças.¹⁴¹ Assim, embora os tratamentos a partir do L1 resultem em mais fêmeas sobreviventes, essas fêmeas apresentam uma redução significativa na longevidade. Além disso, a redução ocorre tanto para machos quanto para fêmeas, sendo um ponto positivo do tratamento, já que é um fator importante para diminuir a capacidade vetorial das fêmeas sobreviventes, minimizando o ciclo de transmissão de doenças.

4.3.2.4 Análise do tamanho das asas

Para análise do tamanho das asas, foi calculado o TC de cada asa. Os resultados foram demonstrados por boxplots (Figura 17-A e B) e pela média dos TCs (Tabela 6). A análise dos resultados por teste ANOVA demonstrou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$), tanto para a população de machos quanto de fêmeas. Os dados para o grupo CL₇₅ não foram incluídos na análise, devido ao número de indivíduos ter sido insuficiente.

Figura 17 – Tamanho dos centróides das asas dos adultos A: Machos; B: Fêmeas.
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 – Tamanho médio dos centróides das asas dos adultos ($\pm$ desvio padrão).

Grupos	Tamanho médio do centróide (mm)	
	Machos	Fêmeas
Controle Água	$1,86 \pm 0,09$	$2,51 \pm 0,15$
Controle D-manitol	$1,86 \pm 0,09$	$2,49 \pm 0,12$
CL25	$1,90 \pm 0,06$	$2,49 \pm 0,15$
CL50	$1,93 \pm 0,10$	$2,57 \pm 0,14$
CL75	—	$2,63 \pm 0,17$

Fonte: Elaborada pela autora.

O tamanho da asa é conhecido na literatura por ser o método mais confiável de medida que reflete o tamanho do corpo de mosquitos e outros insetos.^{30,142} Segundo Dujardin,¹¹⁶ o TC é uma medida mais precisa do tamanho da asa, pois é uma estimativa geral da estrutura anatômica que considera alterações em todas as direções da asa. Estudar o tamanho dos mosquitos, principalmente das fêmeas, é essencial para obter informações sobre a capacidade vetorial. Estudos acerca desse tema possuem duas conclusões divergentes¹⁴³: a primeira afirma que fêmeas maiores teriam maior capacidade vetorial e reprodutiva devido ao maior volume de repasto sanguíneo.^{142,144} Já a segunda e mais reportada atualmente, é de que fêmeas menores teriam que realizar mais repastos sanguíneos, devido ao menor volume corporal, aumentando a frequência de picadas e a probabilidade de transmissão viral.^{35,145–147} Vários estudos relacionam estresse ambiental na fase larval (*e.g.* competição, variação na alimentação, temperatura, xenobióticos) à alterações no tamanho do *Ae. aegypti*.^{135,143,148–149} Em nossos resultados, não foi possível identificar alterações, indicando que o tratamento com a IFD a partir do L1 não influenciou no tamanho dos mosquitos sobreviventes.

4.3.3 Análise dos parâmetros de desenvolvimento a partir do L3

4.3.3.1 Tempo de pupação após exposição crônica subletal

Para avaliar os efeitos da exposição crônica subletal a partir do L3 no desenvolvimento e mortalidade, a taxa de pupação foi acompanhada ao longo dos dias (Figura 18). A taxa de pupação é relativa ao número de larvas utilizadas em cada grupo no início dos experimentos. As curvas de pupação na Figura 18 indicam que, além da baixa taxa de pupação final nos tratamentos ($40,4 \pm 13,7\%$ para CL₂₅, $29,7 \pm 16,6\%$ para CL₅₀ e $28,5 \pm 10,8\%$ para CL₇₅), houve também um atraso no início da pupação comparado aos grupos controles. No geral, as diferenças entre os grupos indicam que os tratamentos foram estatisticamente significativos ($p < 0,0001$), segundo o teste ANOVA.

Figura 18 – Tempo de pupação sob exposição crônica subletal à CDM. As letras acima dos grupos na legenda do gráfico (a, b, c e d) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens na Figura 19 mostram as principais dificuldades morfológicas e causas de mortalidade durante o desenvolvimento das larvas nos grupos tratados, considerando o período após a fase mais ativa da IFD. As maiores dificuldades encontradas durante o desenvolvimento ocorreram principalmente nos processos de ecdises, tanto na passagem do L3 para o L4 (Figura 19 – B) quanto na passagem do L4 para a pupa (Figura 19 – F, G, H), com a larva e/ou pupa permanecendo presa ou conectada ao seu antigo exoesqueleto, não conseguindo completar a metamorfose e sendo levada à morte. Outras condições de morte frequentemente encontradas

foram as de compressão ou estiramento da região abdominal da larva (Figura 19 – C e D, respectivamente).

Figura 19 – Efeitos morfológicos durante o desenvolvimento sob exposição crônica subletal à CDM a partir do L3. A: Larva L3 do Controle Água; B: Larva morta durante a ecdise do L3 para L4, presa ao seu exoesqueleto (seta vermelha: cabeça do exoesqueleto L3 presa ao abdômen); C: Larva com intestino comprimido após a morte; D: Larva distendida após a morte (seta azul: ruptura entre a cabeça e o tórax); E: Pupa do Controle Água; F: Pupa jovem morta durante a ecdise do L4 para a fase de pupa (seta laranja: cabeça do exoesqueleto L4 conectada à cabeça da pupa); G, H: Pupas intermediárias mortas presas dentro de seus exoesqueletos L4 (seta verde: parte inferior do exoesqueleto rompida).

Fonte: Elaborada pela autora.

As interferências ocorridas no desenvolvimento a partir do L3 foram similares às encontradas nos tratamentos a partir do L1. Como foi previamente explicado na Seção 4.3.2.1, o atraso no desenvolvimento e as dificuldades durante o processo de ecdise ocorreram devido aos danos no intestino médio da larva, fazendo com que a absorção de nutrientes se tornasse ineficaz após a IFD. Como o tratamento ocorreu na larva em um estágio mais avançado (L3), foi possível identificar mais dificuldades durante o processo de pupação quando comparado ao tratamento a partir do L1. Isso provavelmente ocorreu devido ao menor período de tempo entre a fase ativa da IFD a partir do L3 e a pupação, fazendo com que as larvas sobreviventes não conseguissem se recuperar totalmente até essa fase, resultando em uma absorção nutricional debilitada. Telang *et al.*¹⁵⁰ descrevem que a capacidade metamórfica e sucesso da pupa dependem, dentre outros fatores, das condições nutricionais da larva nos últimos instars, em

que a larva necessita atingir uma massa crítica para que a ecdise ocorra, o que justifica o atraso e as dificuldades durante a pupação nos tratamentos.

Pimprikar *et al.*¹⁵¹ encontraram alterações morfológicas similares no desenvolvimento de larvas de *Culex pipiens* e *Aedes triseriatus* submetidas à IFD com rosa bengala, identificando dificuldades nos processos de ecdise, com larvas, pupas e até adultos não conseguindo se desvencilhar de seus antigos exoesqueletos. Esses efeitos no desenvolvimento também foram identificados por estudos utilizando RCIs como larvicidas.¹⁵²⁻¹⁵³

4.3.3.2 Proporção sexual dos adultos emergidos após exposição crônica subletal

As proporções entre machos e fêmeas emergidos a partir do L3 foram registradas, utilizando um total de 145 larvas L3 em cada grupo controle e 275 larvas L3 em cada grupo tratamento. Na Figura 20 estão representados o total de mosquitos que emergiram ao final dos experimentos em cada grupo (N), bem como as taxas de emergência. É possível notar que as taxas de emergência nos tratamentos são levemente menores do que as taxas de pupação citadas na seção anterior, indicando que houve mortalidade na fase de pupa. Os resultados para as proporções sexuais mostraram diferenças estatisticamente significativas apenas no tratamento com a CL₇₅. No entanto, diferentemente da tendência observada nos tratamentos a partir do L1 (Seção 4.3.2.2), houve um aumento de machos em relação às fêmeas.

Figura 20 – Proporção sexual dos adultos emergidos a partir do L3. Estão representados o total de mosquitos emergidos (N) e a taxa de emergência para cada grupo. As letras acima dos grupos no eixo vertical do gráfico (a e b) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (χ^2 ; $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Seção 4.3.2.2, foi discutido que o viés para fêmeas encontrado nos tratamentos a partir do L1 se justificava pelo maior fluxo digestório das larvas nos primeiros estágios de vida e pela predominância das fêmeas na competição pela alimentação, baseado no estudo de

Steinwascher.¹¹⁰ Com isso, concluiu-se que as partículas alimentares passam mais rápido pelo intestino das fêmeas nesses estágios, fazendo com que as moléculas de curcumina não tivessem tempo o suficiente para provocar tantos danos. Entretanto, o viés no tratamento com a CL₇₅ a partir do L3 se mostrou contrário ao encontrado anteriormente. Como já mencionado na Seção 4.3.2.2, estudos com larvas sob estresse resultam em uma maior emergência de machos do que de fêmeas.^{126,134} Novamente, Steinwascher¹¹⁰ descreve que, durante os estágios L3 e L4, a demanda nutricional das larvas aumenta, fazendo com que haja um aumento na competição. Consequentemente, a quantidade e qualidade das fontes alimentares disponíveis diminuem, fazendo com que as larvas fêmeas passem a reter partículas alimentares em seus tubos digestórios por um tempo maior, afim de garantir máxima absorção de nutrientes para sua sobrevivência. Considerando isso, é possível inferir que nos tratamentos a partir do L3 as fêmeas foram mais prejudicadas do que os machos, já que possivelmente retiveram as partículas disponíveis no meio por mais tempo, facilitando os danos provocados pela IFD através da ingestão de curcumina.

4.3.3.3 Longevidade dos adultos

O registro de longevidade dos adultos emergidos a partir do L3 foi acompanhado até a última morte, analisando-se machos (Figura 21 – A) e fêmeas (Figura 21 – B) separadamente, sendo descartadas mortes acidentais.

Figura 21 – Curvas de sobrevivência dos adultos, sendo N o número total de indivíduos analisados em cada grupo. A: Machos; B: Fêmeas. As letras acima dos grupos na legenda do gráfico (a, b, c) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Mantel-Cox; $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados das curvas de sobrevivência (Figura 21 – A e B) seguem uma tendência semelhante aos encontrados nos tratamentos a partir do L1 (Seção 4.3.2.3), com redução

significativa na longevidade tanto dos machos ($p = 0,0011$) quanto das fêmeas ($p = 0,0093$) (análise de Mantel-Cox). Ocorreu certa redução na sobrevivência média (Tabela 7) em todos os grupos tratados, sendo mais pronunciada nos grupos CL₅₀ e CL₇₅ para os machos e no grupo CL₇₅ para fêmeas.

Tabela 7 – Sobrevivência média (tempo em que 50% dos adultos morreram) em cada grupo.

Grupos	Sobrevivência média (dias)	
	Machos	Fêmeas
Controle Água	41	49
Controle D-manitol	33	49,5
CL25	36	42,5
CL50	27	48
CL75	30	33,5

Fonte: Elaborada pela autora.

Como discutido na Seção 4.3.2.3, a longevidade é um fator essencial na reprodução dos adultos, influenciando principalmente na capacidade vetorial das fêmeas. Segundo os resultados apresentados, houve redução significativa da longevidade dos mosquitos tratados, tanto a partir do L1 quanto do L3. A redução na sobrevivência dos adultos após tratamento com xenobióticos também foi observada por Belinato *et al.*¹⁵⁴ com o RCI *triflumuron*, por Fernandes *et al.*¹³⁷ no tratamento com *spinosad*, e por Moura *et al.*¹⁴⁸ com o RCI piriproxifeno em determinadas temperaturas.

4.3.3.4 Análise do tamanho das asas

O cálculo do TC da asa de cada indivíduo foi realizado para análise do tamanho, sendo que a distribuição dos TCs foi representada por boxplots (Figura 22 – A e B) e pela média (Tabela 8). Segundo a análise dos resultados por ANOVA/Tukey, houve diferença estatística apenas nos TCs do grupo CL₂₅ quando comparados com o Controle Água, tanto dos machos ($p = 0,0395$) quanto das fêmeas ($p = 0,0078$), sendo o grupo com a menor média.

Figura 22 – Tamanho dos centróides das asas dos adultos A: Machos; B: Fêmeas. O símbolo (*) indica diferença estatística com o Controle Água (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 – Tamanho médio dos centróides das asas dos adultos ($\pm$ desvio padrão).

Grupos	Tamanho médio do centróide (mm)	
	Machos	Fêmeas
Controle Água	$1,95 \pm 0,13$	$2,50 \pm 0,20$
Controle D-manitol	$1,91 \pm 0,11$	$2,43 \pm 0,15$
CL25	$1,80 \pm 0,16$	$2,34 \pm 0,20$
CL50	$1,83 \pm 0,15$	$2,40 \pm 0,19$
CL75	$1,86 \pm 0,11$	$2,39 \pm 0,18$

Fonte: Elaborada pela autora.

A redução no tamanho médio das asas dos adultos no grupo CL₂₅, embora possa representar uma maior capacidade vetorial para as fêmeas (de acordo com a hipótese apresentada na Seção 604.3.2.4), está acompanhada da redução na longevidade para esse grupo, discutida anteriormente. Assim, por mais que essas fêmeas possam eventualmente apresentar maior potencial de transmissão viral, o tempo de vida delas será menor do que o natural, equilibrando os dois fatores. Kang *et al.*¹⁴³ e Alto *et al.*¹⁴⁵ identificaram redução no tamanho das asas de adultos oriundos de larvas que sofreram estresse populacional. Moura *et al.*¹⁴⁸ também observou menores asas nos mosquitos oriundos de larvas tratadas com o RCI piriproxifeno, com redução da longevidade.

4.3.4 Atividade Ovicida

Para investigar a ação ovicida da CDM nos ovos de *Ae. aegypti*, a viabilidade dos ovos foi acompanhada em diferentes concentrações (Figura 23). O tratamento com a CDM resultou em grande diminuição na taxa de eclosão, de $75 \pm 3\%$ no grupo controle (0 mg.L^{-1}) para $36,6 \pm 3,4\%$ na primeira concentração utilizada ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$), decaindo a $10,0 \pm 0,8\%$ na última

concentração (100 mg.L⁻¹). Segundo o teste ANOVA, a eclosão no grupo controle foi significativamente maior que nos grupos tratados ($p < 0,0001$).

Figura 23 – Atividade ovicida da solução CDM em ovos embrionados de *Ae. aegypti*. As letras acima das colunas no gráfico (a, b, c, d, e) indicam a significância estatística entre os grupos, em que grupos com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

As análises morfológicas dos ovos expostos às maiores concentrações da solução CDM (50 e 100 mg.L⁻¹) demonstraram que houve alta taxa de eclosão anormal, com emergência incompleta da larva pela lateral do ovo ao invés do opérculo, com apenas o abdômen emergindo (Figura 24 – D, E), como também eclosão parcial, com a larva presa dentro do ovo (Figura 24– C). A eclosão dos ovos no grupo controle ocorreu sempre através do opérculo (Figura 24 – A, B).

Figura 24 – Eclosão anormal dos ovos após exposição à solução CDM. A: Ovo do grupo controle, com opérculo aberto após emergência da larva; B: Emergência pelo opérculo no grupo controle; C, D, E: Emergência anormal e incompleta da larva, emergindo pela lateral do ovo ao invés do opérculo. Escala: 500 µm. Fonte: Elaborada pela autora.

A atividade ovicida ou de inibição da eclosão pelo tratamento com a CDM foi testada em luz ambiente, sem controle de iluminação. Essa escolha ocorreu devido aos ovos de *Ae. aegypti* possuírem coloração preta, impedindo a penetração da luz, fazendo com que a ação da IFD não pudesse ser considerada nesse estudo. Prajapati *et al.*¹¹⁸ demonstrou que óleo essencial de *Curcuma longa* e outros extratos botânicos apresentaram atividade ovicida em ovos de *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*. De Santos *et al.*¹⁵⁵ e Alves *et al.*¹⁵⁶ mostraram que lectinas de *Moringa oleífera* e *Myracrodruon urundeuva* foram capazes de penetrar nos ovos, matando os embriões. O comportamento de eclosão anormal observado na Figura 24 foi reportado anteriormente em estudos de atividade ovicida utilizando RCIs, como Miura e Takashi¹⁵⁷ descreveram com ovos de *Cx. quinquefasciatus* e Suman *et al.*¹⁵⁸ com ovos de *Ae. aegypti*, *Ae. atropalpus* e *Culex pipiens*. Suman *et al.*¹⁵⁸ relacionaram a eclosão anormal à deficiências no processo de quitinização e endurecimento das estruturas do ovo devido ao tratamento com RCIs, resultando na eclosão pela lateral do ovo. Embora não tenha modo de ação similar ao dos RCIs, o estresse oxidativo provocado pela curcumina, mesmo em baixas condições de irradiância (luz ambiente), pode ter induzido algumas alterações na casca do ovo. É importante mencionar que a casca do ovo do *Ae. aegypti* é formada por uma cutícula serosal quitinizada,¹⁵⁹ com estrutura similar à da membrana peritrófica presente no intestino da larva.

Segundo as análises de microespectroscopia Raman realizadas por Souza,^{100, 120} essa estrutura do intestino da larva é danificada pela ação da IFD com CDM, com degradação da quitina. Portanto, é possível que a curcumina tenha degradado a quitina presente nas estruturas da casca do ovo, prejudicando a eclosão normal ou até mesmo impedindo-a completamente.

4.3.5 Estudos de persistência da ação fotolarvicida

Para avaliar os efeitos residuais da CDM, foi analisada a persistência da ação fotolarvicida ao longo dos dias, utilizando duas concentrações diferentes: 1x (0,4 mg.L⁻¹) e 10x (4 mg.L⁻¹). Na Figura 25, observa-se que, para a concentração 1x, a eficácia diminui para cerca de 47% no 4º dia, sendo completamente eliminada entre o 5º e 7º dia. Para a concentração 10x, a eficácia chega à 55% no 9º dia, se mantendo estatisticamente significativa até o 11º dia, sendo completamente eliminada entre o 11º e o 13º dia. No grupo Controle D-manitol não houve mortalidade. No grupo Controle Escuro, houve mortalidade de em média 20% nos 5 primeiros dias. Essa mortalidade pode ter ocorrido devido à concentração testada ser mais alta do que as concentrações normalmente utilizadas nos testes (10x), o que pode ter levado à uma maior toxicidade para as larvas mesmo na ausência de luz.

Figura 25 – Persistência da ação fotolarvicida da solução CDM ao longo dos dias. O símbolo (*) indica significância estatística com o grupo controle D-manitol (ANOVA/Tukey; $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

O tempo de persistência reflete a tendência de fotodegradação da CDM discutida previamente na Seção 3.3.2, em que a atividade fotolarvicida decai em alguns dias. No entanto, além da fotodegradação da curcumina, ocorre simultaneamente o consumo das partículas que

estão no meio aquoso, uma vez que as larvas são repostas diariamente, fazendo com que a disponibilidade de curcumina diminua, contribuindo para a redução na eficácia. Comparado aos larvicidas tradicionais, o tempo de persistência da CDM é baixo. Estudos de persistência em campo mostraram que o organofosforado temefos possui uma ação residual de aproximadamente 70 dias,¹⁶⁰ o *Bti* pode persistir de 7 a 12 semanas¹⁶⁰⁻¹⁶¹ e o piriproxifeno de 30 até 160 dias, dependendo das condições avaliadas.¹⁶² Contudo, ao considerar a propriedade fotossensível da molécula de curcumina, o tempo de ação residual da CDM é razoável. Fabris *et al.* reportaram um tempo estimado de 48 a 72h de atividade residual para a porfirina C12 na luz solar,¹² sendo comparável aos nossos resultados.

Considerando que a ação prolongada de um larvicida pode levar à efeitos adversos como o surgimento de populações resistentes e acúmulo em organismos não-alvo, uma baixa ação residual é vantajosa. Por outro lado, exige uma maior frequência de aplicações nos criadouros, dificultando o trabalho dos agentes da vigilância sanitária e o controle vetorial. Considerando isso, talvez seja necessário o desenvolvimento de novas formulações que aumentem a persistência do efeito fotolarvicida da curcumina no ambiente de maneira controlada.

4.4 Conclusão

Nesse estudo, foi identificado que a formulação CDM apresentou efeitos subletais nas larvas de *Ae. aegypti*. Isso foi verificado pelo atraso no desenvolvimento larval a partir do L1, e no processo de pupação a partir do L3. Também foi possível observar alterações nas proporções sexuais nas últimas condições de tratamento, com viés de fêmeas no L1 e viés de machos no L3, o que foi explicado considerando os diferentes padrões de alimentação de machos e fêmeas nos diferentes estágios de vida. Quando adultos, foi observada redução significativa na longevidade nos grupos tratados, tanto a partir do L1 quanto do L3. Ao analisar o tamanho das asas, não houve diferenças significativas nos tratamentos para o L1, porém, no L3, a concentração de CL₂₅ originou adultos menores. No geral, concluiu-se que a CDM, mesmo em condições subletais de tratamento, influenciou negativamente no desenvolvimento e na sobrevivência do *Ae. aegypti*, embora ainda sejam necessários estudos futuros acerca da fecundidade e capacidade vetorial das fêmeas originadas.

No estudo de atividade ovicida, a CDM reduziu significativamente a viabilidade dos ovos de *Ae. aegypti*, impedindo a eclosão ou provocando eclosões anormais nos ovos. Esse efeito é de grande importância no controle vetorial, já que os ovos são a forma de vida mais resistente do *Ae. aegypti*.

A avaliação da persistência da atividade fotolarvícida da CDM indicou que o tempo de efeito residual é baixo comparado a outros larvicidas. Contudo, esse resultado é condizente com o processo de fotodegradação investigado anteriormente. Considerando esses aspectos, é correto afirmar que estudos visando formulações mais persistentes serão necessários para aprimorar e viabilizar a aplicação da curcumina como fotolarvícida no campo.

5 CONCLUSÕES

Esse estudo propôs elucidar o processo de fotodegradação da formulação CDM, bem como investigar os efeitos subletais de sua atuação como fotolarvicida em larvas de *Ae. aegypti*. No processo de fotodegradação, foi observado que, em luz branca, a curcumina é degradada mais lentamente, ao longo de dias, com baixa identificação de fotoprodutos por espectroscopia UV-vis. Na luz azul, esse processo ocorre de forma mais rápida, dentro de poucas horas, com formação de fotoprodutos bem pronunciada. Vale ressaltar que, para identificação e caracterização dos fotoprodutos, técnicas analíticas devem ser empregadas, como HPLC-UV acoplado à espectrômetro de massas. A caracterização dos produtos oriundos da fotodegradação da formulação CDM em estudos futuros é de grande importância, considerando a aplicação da formulação no meio ambiente.

Dos efeitos subletais apresentados pela IFD com a CDM nas larvas, os mais relevantes foram os atrasos provocados no desenvolvimento larval e diminuição na longevidade dos adultos. Esses resultados impactam negativamente a vida e capacidade de sobrevivência dos mosquitos tratados, sugerindo que o uso da CDM como fotolarvicida não fortalece as populações afetadas pelo tratamento. No entanto, questões sobre o ciclo reprodutivo e fecundidade desses mosquitos ainda devem ser investigadas, visando também a capacidade vetorial e susceptibilidade a infecções virais. Além disso, entender os efeitos acerca da seleção de populações resistentes com o uso contínuo da CDM e fazer uso de cepas selvagens nos estudos futuros são essenciais.

Quanto à atividade ovicida, a CDM provocou alta redução da viabilidade dos ovos, um efeito muito importante considerando a forte resistência dos ovos no meio ambiente. Para uma melhor compreensão sobre a ação da CDM no ovo, análises embrionárias e da morfologia estrutural da casca seriam relevantes.

Foi observado que o tempo de persistência da atividade fotolarvicida da CDM é relativamente baixo comparado à larvicidas convencionais, o que foi correlacionado ao perfil de fotodegradação da formulação CDM. Embora no aspecto ambiental esse resultado seja positivo, é desvantajoso no aspecto econômico e prático. Assim, o desenvolvimento de melhorias na formulação deve ser considerado, visando o aumento controlado da persistência da CDM.

No geral, podemos concluir que a curcumina apresentou resultados promissores diante dos parâmetros apresentados nesse estudo, demonstrando o alto potencial de sua aplicação como fotolarvicida no controle vetorial do *Ae. aegypti* e destacando o uso da IFD nessa área.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 14 jan. 2020.
 - 2 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 38, p. 1-10, 2016.
 - 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zika virus**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acesso em: 19 jan. 2020.
 - 4 PROMPETCHARA, E. *et al.* Dengue vaccine: global development update. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, 2019. DOI: 10.12932 / AP-100518-0309.
 - 5 ACHEE, N. L. *et al.* Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. e0006822, 2019.
 - 6 LIU, N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 537–559, 2015.
 - 7 DE SOUZA, L. M. *et al.* Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 151–158, 2019.
 - 8 ROBINSON, J. R. Photodynamic insecticides: a review of studies on photosensitizing dyes as insect control agents, their practical application, hazards, and residues. **Residue Reviews**, 1983. v. 88, p. 69–100, 1983. DOI: 10.1007/978-1-4612-5569-7_2.
 - 9 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, 2000.
 - 10 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, p. e1434, 2011.
 - 11 SHIAO, S.-H. *et al.* Novel phthalocyanines activated by dim light for mosquito larva- and cell-inactivation with inference for their potential as broad-spectrum photodynamic insecticides. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217355, 2019.
 - 12 FABRIS, C. *et al.* Efficacy of sunlight-activatable porphyrin formulates on larvae of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *An. arabiensis*: a potential novel biolarvicide for integrated malaria vector control. **Acta Tropica**, v. 123, n. 3, p. 239–243, 2012.
 - 13 CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.
-

-
- 14 LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.
- 15 TESH, R. B. *et al.* Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 750–757, 2011.
- 16 SMITH, G. C. *et al.* Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 1, p. 89–93, 1991.
- 17 MOLINA-CRUZ, A.; LEHMANN, T.; KNÖCKEL, J. Could culicine mosquitoes transmit human malaria? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 11, p. 530–537, 2013.
- 18 MEHLHORN, H. **Encyclopedia of parasitology**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016.
- 19 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 1 a 34. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 22, p. 1-11, 2019.
- 20 BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde do Viajante. **Situação epidemiológica da febre amarela no monitoramento 2019/2020**. 2020. Disponível em: <http://www.saudedoviajante.pr.gov.br/2020/04/89/Brasil-Monitoramento-da-febre-amarela-2019-2020-.html>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- 21 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Questions and answers on Dengue vaccines**. Disponível em: http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_q_and_a/en/. Acesso em: 26 mar. 2020.
- 22 AGUIAR, M.; STOLLENWERK, N. Dengvaxia: age as surrogate for serostatus. **Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 245, 2018.
- 23 GARCIA, R. **Parceria pela vacina contra Dengue**. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2019/01/10/parceria-pela-vacina-contradengue/>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- 24 TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 267–276, 2017.
- 25 AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR. **ANS reforça orientações para prevenção à dengue, zika e chikungunya**. Disponível em: <http://www.ans.gov.br/aans/noticias-ans/sobre-a-ans/4959-ans-reforca-orientacoes-para-prevencao-a-dengue-zika-e-chikungunya>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- 26 SANTOS, J.; MENESES, B. M. An integrated approach for the assessment of the *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* global spatial distribution, and determination of the zones susceptible to the development of Zika virus. **Acta Tropica**, v. 168, p. 80–90, 2017. DOI: 10.1016 / j.actatropica.2017.01.015.
-

-
- 27 KRAEMER, M. U. G. *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 854–863, 2019.
- 28 POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, Suppl 1, p. 11–17, 2013.
- 29 LIU-HELMERSSON, J. *et al.* Estimating past, present, and future trends in the global distribution and abundance of the arbovirus vector *Aedes aegypti* under climate change scenarios. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 148, 2019. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00148.
- 30 CHRISTOPHERS, R. *Aedes Aegypti* (L.), the yellow fever mosquito: its life history, bionomics, and structure. New York: Cambridge University Press, 1960.
- 31 IMAM, H. *et al.* The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 53, 2014.
- 32 FARNESI, L. C. *et al.* Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1–20, 2017.
- 33 CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction**. London: Chapman & Hall, 1992. v. 1.
- 34 CARVALHO, D. O. *et al.* Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for Field releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments**, n. 83, p. e3579, 2014. DOI: 10.3791/3579.
- 35 VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015.
- 36 COSTA, E. M. S.; CUNHA, R. V.; COSTA, E. A. Avaliação da implantação do Programa de controle da dengue em dois municípios fronteiriços do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 4, p. e2017478, 2018.
- 37 ZARA, A. L.S. A. *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.
- 38 ACHEE, N. L. *et al.* A critical assessment of vector control for Dengue prevention. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–19, 2015.
- 39 FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: EDUSP, 1996. v. 2.
- 40 ABBAS, A. *et al.* Integrated strategies for the control and prevention of dengue vectors with particular reference to *Aedes aegypti*. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 34, n. 1, p. 1–10, 2014.
- 41 BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 605–613, 1998.
-

-
- 42 HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 371–391, 2000.
- 43 SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.03.005.
- 44 PARIS, M. *et al.* Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. **Pest Management Science**, v. 67, n. 1, p. 122–128, 2011.
- 45 HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242–255, 1989.
- 46 MOYES, C. L. *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005625, 2017.
- 47 MELO, A. L. A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 317–326, 2016.
- 48 WRIGHT, J. E. Environmental and toxicological aspects of insect growth regulators. **Environmental Health Perspectives**, v. 14, p. 127–132, 1976. DOI: 10.1289/ehp.7614127.
- 49 GILBERT, L. I.; GILL, S. S. Insect control, biological and synthetic agents. In: GIBERT, L. I. (ed.) **Comprehensive molecular insect science**. Cambridge: Academic Press, 2010. p. 361–405.
- 50 BELLINATO, D. F. *et al.* Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1155/2016/8603263.
- 51 TRDAN, S. **Insecticides resistance**. Slovenia: InTech, 2016.
- 52 DE ARAÚJO, A. P. *et al.* Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Pernambuco, Brazil for resistance to temephos, diflubenzuron, and cypermethrin and characterization of potential resistance mechanisms. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 3, 2019. DOI: 10.1093/jisesa/iez054.
- 53 ROIZ, D. *et al.* Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. e0006845, 2018.
- 54 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations**: interim guidance for entomologists, 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204588>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- 55 PAVELA, R. *et al.* Plant extracts for developing mosquito larvicides: from laboratory to the field, with insights on the modes of action. **Acta Tropica**, v. 193, p. 236–271, 2019. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.01.019.
-

-
- 56 VIANA, G. D. A.; SAMPAIO, C. D. G.; MARTINS, V. E. P. Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 449, 2018.
- 57 SHAALAN, E. A.-S. *et al.* A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, n. 8, p. 1149–1166, 2005.
- 58 O'NEILL, S. L. The use of *Wolbachia* by the world mosquito program to interrupt transmission of *Aedes aegypti* transmitted viruses. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1062, p. 355–360, 2018. DOI: 10.1007/978-981-10-8727-1_24.
- 59 SKELTON, E. *et al.* A native *Wolbachia* endosymbiont does not limit dengue virus infection in the mosquito *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 2, p. 401–408, 2016.
- 60 ARAÚJO, H. R. C. *et al.* *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576–594, 2015.
- 61 FRASER, J. E. *et al.* Novel *Wolbachia*-transinfected *Aedes aegypti* mosquitoes possess diverse fitness and vector competence phenotypes. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 12, p. e1006751, 2017.
- 62 ALIOTA, M. T. *et al.* The *wMel* strain of *Wolbachia* reduces transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28792, 2016.
- 63 ALIOTA, M. T. *et al.* The *wMel* strain of *Wolbachia* reduces transmission of Chikungunya virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004677, 2016.
- 64 WILKE, A. B. B.; BEIER, J. C.; BENELLI, G. Transgenic mosquitoes – fact or fiction? **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 456–465, 2018.
- 65 ABDEL-KADER, M. H. The journey of PDT throughout history: PDT from Pharos to present. In: KOSTRON, H.; HASAN, T. (ed.). **Photodynamic medicine: from bench to clinic**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2016. p. 1–21.
- 66 FINSSEN, N. R. The chemical rays of light and smallpox. In: FINSSEN, N. R. **Phototherapy**. London: Edward Arnold, 1901. p. 1–36.
- 67 RAAB, O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Z. Biol**, v. 39, n. 39, p. 524–546, 1900.
- 68 VON TAPPEINER H, J. A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. **Munch Med Wochenschr**, v. 47, p. 2042–2044, 1903.
- 69 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380–387, 2003.
-

-
- 70 PATRICE, T. **Photodynamic therapy**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. (Comprehensive series in photochemical & photobiological sciences).
- 71 BAGNATO, V. S. *et al.* Photodynamic reactions cancer and microbiological control. *In: WORKSHOP ON CELL BIOLOGY AND GENETICS*, 2018.Vatican. [**Proceedings...**] Vatican: Pontifical Academy of Sciences, 2018. p. 247-268.
- 72 HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67–73, 2016. DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.008.
- 73 LIU, Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, v. 1, n. 3, p. 140–167, 2015.
- 74 BARBIERI, A. Sensibilizadores fluorescentes como larvicidas: action fotodinamica de la luz. **Rivista di Malariologia**, v. 7, n. 4, 1928.
- 75 SCHILDMACHER, H. Über Photosensibilisierung von Stechmücken- larven durch fluoreszierende Farbstoffe. **Biol. Zentralbl**, n. 69, p. 468–477, 1950.
- 76 JORI, G.; COPPELLOTTI, O. Photodynamic therapy for vector-borne diseases. *In: KOSTRON, H.; HASAN, T. (ed.). Photodynamic medicine: from bench to clinic*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2016. p. 573–590.
- 77 AMOR, T. BEN; BORTOLOTTI, L.; JORI, G. Porphyrins and related compounds as photoactivatable insecticides.3. Laboratory and Field Studies. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 2, p. 124, 2000.
- 78 ALVES, E. *et al.* Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: photochemistry reviews**, v. 22, p. 34–57, 2015. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2014.09.003.
- 79 CALIXTO, G. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 2016.
- 80 KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, v. 31, p. 31–42, 2017. DOI: 10.1016/j.drug.2017.07.003.
- 81 BACELLAR, I. O. L. *et al.* Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015.
- 82 DE SOUZA, L. M. *et al.* Efficacy of photogem® (Hematoporphyrin Derivative) as a photoactivatable larvicide against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae. **Journal of Life Sciences**, v. 11, n. 2, p. 74–81, 2017.
- 83 DE SOUZA, L. M. *et al.* Evaluation of photodynamic effects of curcumin against the dengue vector – *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 346–347, 2015.
-

-
- 84 KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098–1107, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- 85 YIN, R.; HAMBLIN, M. Antimicrobial photosensitizers: drug discovery under the spotlight. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 2159–2185, 2015.
- 86 AGGARWAL, B. B.; SURH, Y.-J.; SHISHODIA, S. **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**. Boston, MA: Springer, 2007.
- 87 PRASAD, S. *et al.* Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1053–1064, 2014.
- 88 ESATBEYOGLU, T. *et al.* Curcumin-from molecule to biological function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 2012.
- 89 CARMONA-VARGAS, C. C. *et al.* Combining batch and continuous flow setups in the end-to-end synthesis of naturally occurring curcuminoids. **Reaction Chemistry and Engineering**, v. 2, n. 3, p. 366–374, 2017.
- 90 CHIGNELL, C. F. *et al.* Spectral and photochemical properties of curcumin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p. 295–302, 1994.
- 91 PRADITYA, D. *et al.* Anti-infective properties of the golden spice curcumin. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–16, May, 2019.
- 92 DOVIGO, L. N. *et al.* Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 2011.
- 93 SOARES, J. M. *et al.* Optimization for microbial incorporation and efficiency of photodynamic therapy using variation on curcumin formulation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101652, 2020. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101652.
- 94 ARAÚJO, N. C. *et al.* Photodynamic inactivation of cariogenic pathogens using curcumin as photosensitizer. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 5, p. 259–263, 2017.
- 95 BLANCO, K. C. *et al.* Advances in the clinical application of photodynamic action for pharyngotonsillitis treatment. *In*: INTERNATIONAL PHOTODYNAMIC ASSOCIATION WORLD CONGRESS, 17, 2019. [Anais...] New York: SPIE, 2019.
- 96 CORRÊA, T. Q. *et al.* Effects of ultraviolet light and curcumin-mediated photodynamic inactivation on microbiological food safety: a study in meat and fruit. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101678, 2020. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101678.
- 97 ZANGIROLAMI, A. C. *et al.* Biofilm destruction on endotracheal tubes by photodynamic inactivation. **Infectious Disorders - drug targets**, v. 18, n. 3, p. 218–223, 2018.
- 98 ALI, A.; WANG, Y. H.; KHAN, I. A. Larvicidal and biting deterrent activity of essential oils of *Curcuma longa*, α -turmerone, and curcuminoids against *Aedes aegypti* and *Anopheles*
-

quadrifasciatus (Culicidae: Diptera). **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 5, p. 979–986, 2015.

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

100 DE SOUZA, L. M. **Viabilidade da implementação em campo da atividade fotodinâmica da curcumina para o controle de larvas do *Aedes aegypti***. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

101 DE OLIVEIRA, P. S. M.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. V. N. Utilização do D-mannitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 441–452, 2009.

102 VON WEYMARN, N.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1207–1213, 2002.

103 STECKEL, H.; BOLZEN, N. Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1–2, p. 297–306, 2004.

104 BARIK, A.; PRIYADARSINI, K. I.; MOHAN, H. Photophysical studies on binding of curcumin to bovine serum albumin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 6, p. 597–603, 2007.

105 PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: photochemistry reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 2009.

106 TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J.; HENEGOUWEN, G. B. Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 183, n. 2, p. 116–122, 1986.

107 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>. Acesso em: 8 abr. 2019.

108 FARNESI, L. C. *et al.* Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Influence of different constant temperatures. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 124–126, 2009.

109 SHAALAN, E. A. *et al.* Effects of sub-lethal concentrations of synthetic insecticides and *Callitris glaucophylla* extracts on the development of *Aedes aegypti*. **Journal of Vector Ecology**, v. 30, n. 2, p. 295–298, 2005.

110 STEINWASCHER, K. Competition among *Aedes aegypti* larvae. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0202455, 2018.

111 BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; RIBEIRO, P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 847–852, 2009.

-
- 112 MOURA, L. **Programas de controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): análise do efeito da temperatura ambiente sobre a eficiência do larvicida *Pyriproxyfen* em laboratório.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.
- 113 ROHLF, J. **tpsDig 1.11.0.0.** New York, USA, 2004. Disponível em: <https://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>. Acesso em: 25 abr. 2020.
- 114 VIDAL, P. O.; SUESDEK, L. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 591–596, 2012.
- 115 DUJARDIN, J. P. **Collection of Landmark for identification and characterization (CLIC).** [S.l.] Unité de Recherches, 2002.
- 116 DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 875–890, 2008.
- 117 GANESAN, P. *et al.* Mosquito (Diptera: Culicidae) larvicidal and ovicidal properties of extracts from *Streptomyces vinaceusdrappus* (S12-4) isolated from soils. **Journal of Entomological Science**, v. 53, n. 1, p. 17–26, 2018.
- 118 PRAJAPATI, V. *et al.* Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 16, p. 1749–1757, 2005.
- 119 VANI, J. M. *et al.* The mixture of cashew nut shell liquid and castor oil results in an efficient larvicide against *Aedes aegypti* that does not alter embryo-fetal development, reproductive performance or DNA integrity. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–21, 2018.
- 120 DE SOUZA, L. M. *et al.* Curcumin in Formulations against *Aedes aegypti*: mode of action, photolarvicidal and ovicidal activity. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 101840, 2020.
- 121 PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, 2015.
- 122 RODRIGUES, A. M. *et al.* Different susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae to plant-derived products. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019. DOI: 10.1590/0037-8682-0197-2018.
- 123 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, 2005.
- 124 LIMA, A. *et al.* Evaluation of Eosin-Methylene blue as a photosensitizer for larval control of *Aedes aegypti* by a photodynamic process. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 109, 2018.
- 125 ZHANG, J. J.-C. C. *et al.* Cell death induced by α -terthienyl via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the midgut of *Aedes aegypti* larvae.
-

Free Radical Biology and Medicine, v. 137, p. 87–98, 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.021.

126 BELINATO, T. A.; VALLE, D. The impact of selection with Diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two brazilian *Aedes aegypti* field populations. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130719, 2015.

127 DIAS, L. S. *et al.* Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173689, 2017.

128 MITTAL, P. K.; ADAK, T.; BATRA, C. P. Comparative toxicity of selected larvicidal formulations against *Anopheles stephensi* Liston and *Aedes aegypti* Linn. **Journal of Communicable Diseases**, v. 33, n. 2, p. 116–120, 2001.

129 FERNANDES, K. M. *et al.* *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. **Parasitology International**, v. 63, n. 3, p. 506–512, 2014.

130 RAY, K. *et al.* Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 55, p. 1–13, 2010.

131 HICKEY, W. A.; CRAIG, G. B. Distortion of sex ratio in populations of *Aedes aegypti*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology. Journal canadien de génétique et de cytologie**, v. 8, n. 2, p. 260–278, 1966.

132 HALL, A. B. *et al.* A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 348, n. 6240, p. 1268–1270, 2015.

133 CLEMENTS, A. N. **The physiology of mosquitoes**. New York: Pergamon Press Ltd, 1963.

134 BARA, J. J.; MONTGOMERY, A.; MUTURI, E. J. Sublethal effects of atrazine and glyphosate on life history traits of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p. 2879–2886, 2014.

135 SOUZA, R. S. *et al.* Microorganism-based larval diets affect mosquito development, size and nutritional reserves in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 152, 2019. DOI: 10.3389/fphys.2019.00152.

136 BEDHOMME, S. *et al.* Sex-specific reaction norms to intraspecific larval competition in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 4, p. 721–730, 2003.

137 FERNANDES, K. M. *et al.* *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. **Chemosphere**, v. 221, p. 464–470, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.068.

138 ERNST, K. C. *et al.* *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) longevity and differential emergence of dengue fever in two cities in Sonora, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 1, p. 204–211, 2017.

139 MACDONALD, G. Epidemiologic models in studies of vector-borne diseases: the R. E. Dyer lecture. **Public Health Reports (1896-1970)**, v. 76, n. 9, p. 753, 1961.

-
- 140 GARRETT-JONES, C.; SHIDRAWI, G. R. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 40, n. 4, p. 531–545, 1969.
- 141 SMITH, D. L. *et al.* Ross, Macdonald, and a theory for the dynamics and control of mosquito-transmitted pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002588.
- 142 NASCI, R. S. The size of emerging and host-seeking *Aedes aegypti* and the relation of size to blood-feeding success in the field. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 2, n. 1, p. 61–62, 1986.
- 143 KANG, D. S. *et al.* Larval stress alters dengue virus susceptibility in *Aedes aegypti* (L.) adult females. **Acta Tropica**, v. 174, p. 97–101, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.06.018.
- 144 SUMANOCHITRAPON, W. *et al.* Effect of size and geographic origin of *Aedes aegypti* on oral infection with dengue-2 virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 3, p. 283–286, 1998.
- 145 ALTO, B. W. *et al.* Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. **Proceedings of the Royal Society B: biological sciences**, v. 275, n. 1633, p. 463–471, 2008.
- 146 ALTO, B. W.; REISKIND, M. H.; LOUNIBOS, L. P. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 688–695, 2008.
- 147 MACIEL-DE-FREITAS, R.; CODEÇO, C. T.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Body size-associated survival and dispersal rates of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, n. 3, p. 284–292, 2007.
- 148 MOURA, L.; DE NADAI, B. L.; CORBI, J. J. What does not kill it does not always make it stronger: High temperatures in pyriproxyfen treatments produce *Aedes aegypti* adults with reduced longevity and smaller females. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 2, p. 529–535, 2020.
- 149 JULIANO, S. A. *et al.* She's a femme fatale: low-density larval development produces good disease vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 1070–1077, 2014.
- 150 TELANG, A.; FRAME, L.; BROWN, M. R. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 5, p. 854–864, 2007.
- 151 PIMPRIKAR, G. D.; NORMENT, B. R.; HEITZ, J. R. Toxicity of rose bengal to various instars of *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes triseriatus*. **Environmental Entomology**, v. 8, n. 6, p. 856–859, 1979.
- 152 BUSVINE, J. R.; RONGSRIYAM, Y.; BRUNO, D. Effects of some insect development inhibitors on mosquito larvae. **Pesticide Science**, v. 7, n. 2, p. 153–160, 1976.
-

- 153 BRAGA, I. A. *et al.* Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 435–440, 2005.
- 154 BELINATO, T. A. *et al.* Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 43–47, 2009.
- 155 DE SANTOS, N. D. L. *et al.* Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044840.
- 156 ALVES, R. R. *et al.* Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730–736, 2019.
- 157 MIURA, T.; TAKAHASHI, R. M. Effects of the insect growth inhibitor SIR 8514 on hatching of southern house mosquito eggs. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 5, p. 692–694, 1979.
- 158 SUMAN, D. S. *et al.* Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 103–109, 2013.
- 159 REZENDE, G. L. *et al.* Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC Developmental Biology**, v. 8, p. 1–14, 2008.
- 160 PONTES, R. J. S. *et al.* Impact of water renewal on the residual effect of larvicides in the control of *Aedes aegypti*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 220–224, 2010.
- 161 RITCHIE, S. A.; RAPLEY, L. P.; BENJAMIN, S. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 1053–1059, 2010.
- 162 ANDRIGHETTI, M. T. M. *et al.* Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. **Dengue Bulletin**, v. 32, p. 186–198, 2008.
-