



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MAITHON MARECO ROCHA

**Avaliação de clorofilina cúprica de sódio como agente
fotossensibilizador para o controle de *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae).**

DOURADOS-MS

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MAITHON MARECO ROCHA

**Avaliação de clorofilina cúprica de sódio como agente
fotossensibilizador para o controle de *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae).**

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Química, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Arruda

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues
Lima Caires

DOURADOS-MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R672a Rocha, Maithon Mareco

Avaliação de clorofilina cúprica de sódio como agente fotossensibilizador para o controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). / Maithon Mareco Rocha

-- Dourados: UFGD, 2017.

76f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo José de Arruda

Co-orientador: Anderson Rodrigues Lima Caires

Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Fototoxicidade. 2. Controle Populacional. 3. Tempo de Internalização. 4. Controle Fotodinâmico. 5. Culicídeos. I. Título.

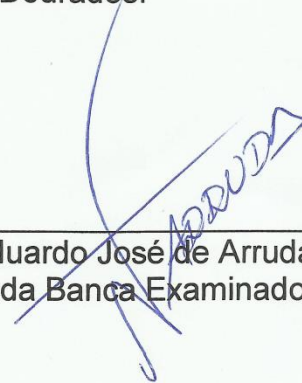
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

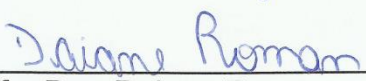


Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Avaliação de Clorofilina Cúprica de Sódio como Agente Fotossensibilizador para Controle de Aedes Aegypti (Diptera: Culicidae)", de autoria de Maithon Mareco Rocha, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Eduardo José de Arruda (Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora



Profa. Dra. Daiane Roman
Membro Examinador (UFGD)



Dr. Isaiás Cabrini
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 31 de março de 2017.

Dedicatoria

A minha família em especial a: minha esposa

Luciana e minha filha Geovana.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo José de Arruda pelo apoio e orientação no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Anderson Rodrigues por ter me aceito como aluno, pela orientação e por suas contribuições na fotofísica.

Ao Prof. Dr. Isaías Cabrini (Pós-doutorado Programa Nacional de Pós-Doutorado, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados) pelo auxílio nos bioensaios de toxicidade em larvas de mosquito, análises estatísticas e revisão do trabalho.

A Dra. Maria de Lurdes Marcoris (lula) da SUCEN-Marília-SP pelo fornecimento de ovos de *A. aegypti* (Rockefeller).

Ao Dr. Maicon Diego Grella (Pós-doutorado Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Unicamp) pelos registros fotográficos das larvas em solução de clorofilina.

Marcia Ramos Jorge pela contribuição nas análises de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

A toda equipe do Laboratório de Insetos Vetores (LIVE) pelo apoio na manutenção da criação de *Aedes*, em especial a Magda Fernandes e Junior Ferrari.

A todos os técnicos do laboratório de Química multidisciplinar, pela compreensão e apoio.

A todos que ajudaram, apoiaram e acreditaram no desenvolvimento desta dissertação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis var. israelenses</i>
CCS	Clorofilina cúprica de sódio
CFD	Controle fotodinâmico
CHIKV	Vírus Chikungyia
Chl	Clorofila
AE	Análise elementar
CL	Concentrações letais
DENV	Vírus da dengue
DTV _s	Doenças transmitidas por vetores
ERRO	Espécies reativas do oxigênio
FD	Face Dorsal
FIR	Infravermelho Distante
FS	Fotossensibilizador
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier
FV	Face Ventral
ICP-OES	Espectrometria de emissão Ótica com plasma indutivamente acoplado
IR	Espectroscopia no infravermelho
JFA	Janela fotodinâmica de absorção
JF	Janela fotodinâmica
LED	Diodo emissor de luz
MP	Matriz Peritrófica.
MIR	Infravermelho Médio
NIR	Infravermelho Próximo
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ppm	Parte por milhão
[•] OH	Radical hidroxila
TFD	Terapia fotodinâmica
TI	Tempo de internalização

TT	Tempo de Trânsito
U.S.P	United States Pharmacopeia
UV-Vis	Ultravioleta-visível
ZIKV	Vírus Zika

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamento realizado nas larvas de <i>Aedes. aegypti</i> de 3º e 4º estágio para o bioensaio de toxicidade com a CCS sem exposição solar direta.	36
Tabela 2 - Tratamento realizado em larvas de <i>Aedes aegypti</i> de 3º e 4º estágio para o bioensaio com a CCS por exposição solar direta.	37
Tabela 3 - Principais bandas no espectro de Infravermelhos (IR) da CCS.	43
Tabela 4 - Valores teóricos das massas dos elementos C, H, N, Cu, Na e O em porcentagens relativas da CCS. Os valores foram calculados a partir das informações da embalagem e ficha técnica do produto (Sigma-Aldrich, China).	44
Tabela 5 - Porcentagem (%) relativa dos elementos químicos C, H, e N obtidos pela AE da CCS, considerando a fórmula química teórica e o limite estabelecido pela U. S. P. (2007)..	44
Tabela 6 - Porcentagem dos elementos químicos Cu e Na da CCS, obtidos pela a ICP-OES, fórmula química teórica e o limite estabelecido pela U.S.P.....	45
Tabela 7 - Apresenta-se a %Cu e a relação com %pureza, e a razão Cu/N e a sua relação com % derivados não cúpricos, calculada a partir dos valores experimentais, com base na Figura 5.....	47
Tabela 8 - Valores das absorvâncias das bandas Soret e Q de soluções de CCS o em tampão fosfato pH 7,5 em diferentes concentrações no intervalo de 1,0 a 20 mg L ⁻¹	49
Tabela 9 - Avaliação da toxicidade e citotoxicidade da CCS pelo teste em <i>Allium cepa</i>	54
Tabela 10 - Avaliação da genotoxicidade (IAC) e mutagenicidade (IMT) da CCS pelo teste em <i>Allium cepa</i>	54
Tabela 11 - Média de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a CCS e irradiação solar média para diferentes períodos de leitura.	61
Tabela 12 - Concentração Letal Mediana (CL ₅₀) para larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas a tratamento com CCS sob irradiação solar.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Chl <i>a</i> e Chl <i>b</i>	22
Figura 2 - Obtenção da feofitina <i>a</i> partir da Chl <i>a</i>	23
Figura 3 - Estrutura química para clorofilina cúprica de sódio (Sigma-Aldrich, China).	25
Figura 4 - Sistema utilizado para realizar os estudos de fotodegradação sob luz solar. (A) simulador solar; (B); suporte de madeira (C) agitador magnético e (D) plataforma de elevação.	31
Figura 5 - Espectros de absorção UV-Vis da CCS (Sigma-Aldrich, China).....	39
Figura 6 - Espectro do Infravermelho da CCS na região de 4000 a 2400 cm^{-1}	41
Figura 7 - Espectro do Infravermelho da CCS na região de 1800 a 400 cm^{-1}	42
Figura 8 - Catabólito de Chl não fluorescente.....	46
Figura 9 - Espectros de absorção de CCS no comprimento de onda de 380 a 780 nm.....	48
Figura 10 – Curva de calibração obtida para CCS no comprimento de onda em 627 nm. ...	50
Figura 11 - Degradação da CCS a várias concentrações realizadas sob luz solar simulada. ...	51
Figura 12 - Espectros de absorção da solução de CCS concentração de 25 mg L^{-1} , durante e após fotodegradação.	52
Figura 13 - Espectros de absorção da solução de CCS concentração de 25 mg L^{-1} , sem exposição a irradiação solar.....	53
Figura 14 - Células meristemáticas de <i>Allium. cepa</i> expostas ao tratamento com alterações cromossômicas: a) ponte cromossômica; alterações celulares: b) quebra e perda cromossômica; c) brotamento nuclear; d) núcleo lobulado; e e) micronúcleo.....	55
Figura 15 - Tempo de internalização de CCS a 100 mg L^{-1} , por larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 5 min de exposição. A seta indica a localização da solução.	57
Figura 16 - Tempo de internalização da CCS a 100 mg L^{-1} , por larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 20 min de exposição. A seta indica a localização da solução.....	58
Figura 17 - Tempo de internalização da CCS a 100 mg L^{-1} , por larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 60 min de exposição. A seta indica o lóbulo anal próximo ao sifão respiratório e a solução sendo excretada, após a saturação do sistema digestório.	59
Figura 18 - Intensidade de luz solar direta (natural) durante realização dos bioensaios de toxicidade.	61

Figura 19 - Porcentagem média de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas CCS e a irradiação solar direta.63

RESUMO

A febre amarela, dengue, chikungunya e zika são doenças virais com risco crescente de agravo a saúde pública. Estas doenças são transmitidas por mosquitos *Aedes aegypti*. O controle de ovos (banco de ovos dos criadourados), larvas e insetos adultos (alados) é crucial para contenção e/ou prevenção de surtos dessas doenças, principalmente nos períodos quentes e úmidos. A descoberta de novos larvicidas pode tornar o controle populacional mais eficiente e com menor impacto ambiental, principalmente se for utilizado abordagens que considerem o comportamento e a ecologia do inseto vetor. As porfirinas e suas estruturas conjugadas são classes de moléculas que absorvem luz e podem gerar espécies reativas de oxigênio que, se excitadas pela luz ultravioleta e/ou visível podem induzir danos celulares contínuos por oxidação e morte celular a partir do sistema digestório do inseto. O presente trabalho avalia a atividade citotóxica fotoinduzida por radiação solar e/ou luz artificial para o controle de larvas de *A. aegypti*, além de avaliar a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. A clorofilina cúprica de sódio foi utilizada como fotossensibilizador. Os resultados experimentais mostraram mortalidade em larvas de *A. aegypti* de 3^o e 4^o estádios larvais em concentrações de 15 a 35 mg L⁻¹ em exposição a irradiação solar direta durante cinco horas com intensidade de luz solar entre 52,27 W m⁻² a 128,7 W m⁻². A clorofilina cúprica de sódio na concentração entre 50 e 200 mg L⁻¹ não apresentou toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, além de potencializar a divisão celular em todas as concentrações avaliadas. O estudo abre perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias e moléculas mais sensíveis para intensidades de radiação mais baixas do que valores típicos e obtidos de luz solar. A produção de espécies de radicais livres e/ou oxidantes podem matar os insetos por danos aos tecidos do sistema digestório e intestinal, além de adsorver em material orgânico dos criadouros, realizar o controle do inseto via cadeia alimentar e/ou ainda manter a atividade por alguns ciclos de reprodução. Os resultados mostraram que a clorofilina cúprica de sódio é fotossensibilizante e um promissor agente para controle fotodinâmico para larvas e insetos adultos do mosquito da dengue e, possivelmente, para outros insetos vetores de ciclo reprodutivo similar.

Palavras-Chaves: Fototoxicidade, controle populacional, tempo de internalização, controle fotodinâmico, culicídeos.

ABSTRACT

Yellow fever, dengue, chikungunya and zika are viral diseases with an increased risk of public health damage. These diseases are transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes. Control of eggs (egg bank of broodstock), larvae and adult insects (winged) is crucial for containment and/or prevention of outbreaks of these diseases, especially in hot and humid periods. The discovery of new larvicides can make population control more efficient and with less environmental impact, especially if we use approaches that consider the behavior and ecology of the insect vector. Porphyrins and their conjugated structures are classes of molecules that absorb light and can generate reactive oxygen species which, if excited by ultraviolet and / or visible light, can induce continuous cellular damage by oxidation and cell death from the insect digestive system. The present work evaluates the cytotoxic activity induced by solar radiation and/or artificial light for the control of *A. aegypti* larvae, besides evaluating the toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity in meristematic cells of *Allium cepa* roots. The sodium cupric chlorophyllin was used as a photosensitizer. The experimental results showed mortality in larvae of *A. aegypti* of 3rd and 4th larval stages at concentrations of 15 to 35 mg L⁻¹ on exposure to direct solar irradiation during five hours with sunlight intensity ranging from 52.27 W m⁻² to 128.7 W m⁻². The sodium cuprous chlorophyll in the concentration between 50 and 200 mg L⁻¹ showed no toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and potentiated the cell division in all evaluated concentrations. The study opens perspectives for the development of new strategies and more sensitive molecules for radiation intensities lower than typical values and obtained from sunlight. The production of free radical and / or oxidant species can kill insects due to damage to the tissues of the digestive and intestinal system, as well as adsorb in organic material from the breeding sites, control the insect via the food chain and/or maintain activity Playback cycles. The results showed that sodium cuprous chlorophyllin is photosensitizing and a promising agent for photodynamic control for adult larvae and insects of the dengue mosquito, and possibly for other insects of similar reproductive cycle.

Keywords: Phototoxicity, population control, internalization time, photodynamic control, culicidae.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 DENGUE, FEBRE DE CHIKUNGUNYA, VÍRUS ZIKA, FEBRE AMARELA..	17
3.2 TERAPIA FOTODINÂMICA/CONTROLE FOTODINÂMICO	20
3.3 CLOROFILAS	21
3.3.1 Clorofila <i>a</i> e Feofitina <i>a</i>	22
3.4 COBRE / CU (II).....	23
3.5 COMPLEXOS METÁLICOS E CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO (FOTOSENSIBILIZADOR)	24
3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DA CLOROFILINA SÓDICA CÚPRICA EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DE <i>ALLIUM CEPA</i>	27
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
4.1 FOTOSENSIBILIZADOR: CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO	28
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO	28
4.2.1 Espectroscopia de absorção ótica na região do ultravioleta e visível	28
4.2.2 Espectroscopia de absorção no Infravermelho por transformada de Fourier .	29
4.2.3 Análise Elementar.....	29
4.2.4 Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado	30
4.2.5 Cálculo da pureza da clorofilina cúprica de sódio pela %Cu e razão Cu/N e a quantidade de derivados não-cúpricos	30
4.3 FOTODEGRADAÇÃO DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO	30
4.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO EM <i>ALLIUM CEPA</i>	
4.5 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE <i>ALLIUM CEPA</i>	33
4.6 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CRIAÇÃO/COLÔNIA DAS LARVAS DE <i>AEDES AEGYPTI</i> (ROCKEFELLER).....	34

4.7	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO	35
4.8	BIOENSAIOS “IN VIVO” EM LARVAS DE 3º E 4º ESTÁGIO DE <i>Aedes Aegypti</i> (ROCKFELLER).....	35
4.8.1	Preparo das soluções de clorofilina cúprica de sódio	35
4.8.2	Bioensaios de toxicidade em larvas de <i>Aedes aegypti</i> sem exposição à irradiação solar	36
4.8.3	Bioensaios de toxicidade de larvas de 3º e 4º estádios de <i>Aedes aegypti</i> com exposição à irradiação solar direta	36
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO ÓPTICO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES: ABSORÇÃO UV-VISÍVEL	38
5.2	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DE TRANSFORMADA DE FOURIER.....	39
5.3	ANÁLISE ELEMENTAR (C, H, N)	43
5.4	ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO	45
5.5	AVALIAÇÃO DA PUREZA DAS AMOSTRAS DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO	46
5.6	FOTODEGRADAÇÃO DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO UTILIZANDO LUZ SOLAR SIMULADA.....	49
5.7	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO EM <i>ALLIUM CEPA</i>	53
5.8	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO	56
5.9	AÇÃO FOTODINÂMICA ‘IN VIVO’ SOBRE LARVAS DE 3º /4º ESTÁDIO (L3/L4) DE <i>Aedes Aegypti</i> (ROCKFELLER)	60
5.9.1	Bioensaios de toxicidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> com exposição à irradiação solar	
6	CONCLUSÃO	
7	REFERÊNCIAS	67
8	ANEXO 76	

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma das principais doenças virais transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, sendo um problema de saúde pública mundial em crescente expansão. Atualmente, centenas de milhões de pessoas são infectadas a cada ano pela dengue [1,2], sendo que somente no Brasil, em 2016, foram registrados 1,5 milhões de casos prováveis, sendo confirmados 643 óbitos [3]. A adaptabilidade, resistência/resiliência e flexibilidade do mosquito o tornam capaz e competente para sobreviver em ambientes não favoráveis e de transmitir diferentes tipos virais, como dengue, chikungunya, zika e febre amarela. Estas doenças tem sido notificadas nos países tropicais e subtropicais, onde vivem cerca de 2,5 bilhões de pessoas em áreas de riscos atingindo 100 milhões de casos e 25 mil mortes registradas anualmente [4,5].

O controle populacional do inseto vetor é a forma mais eficaz para prevenção da transmissão das doenças, considerando a eliminação de criadouros e banco de ovos como procedimento principal [6]. Entretanto, apesar dessa premissa, o controle químico ainda é intensamente utilizado pelo uso intensivo de inseticidas/larvicidas convencionais e não convencionais, sendo os mais utilizados os inseticidas piretroides e organofosforados [6,7]. Esta estratégia de controle tem se mostrado ineficiente, pela utilização inadequada de inseticidas, com aumento da frequência de aplicação, altas dosagens, que ocasionam o aumento da resistência genética do mosquito *A. aegypti*, além de afetarem ecossistemas, a saúde das populações das regiões de controle e, possivelmente, contribuir para aumento da competência dos vetores para novas doenças [8,9].

Dentro desse contexto, busca-se estratégias alternativas com síntese e/ou utilização de novos inseticidas não convencionais que podem ser obtidos a partir de fontes vegetais, toxinas de microrganismos e novos ativos sintéticos ou semissintéticos na forma de íons metálicos complexados [10], que possuam eficiência, especificidade, segurança humana e reduzido impacto ambiental [11].

Os íons Cu (II) e Fe (III) são micronutrientes, possuem bioatividade e, se mostram tóxicos na forma concentração-dependente para as larvas de *Aedes aegypti* que podem ser complexados a ligantes/carreadores como transportadores para o exercício da toxicidade, além de reduzir atividade e toxicidade do metal para humanos, e potencializar a toxicidade para insetos. A atividade tóxica dá-se a partir de intensos danos celulares devido a desorganização

da matriz peritrófica, deposição e desencadeamento da produção “*in situ*” de reações de estresse oxidativo, produzindo radicais livres e/ou espécies oxidantes, principalmente, no sistema digestório do inseto [10,12].

Estudos realizados por grupos de pesquisadores na UFGD/UFMS mostraram que a estratégia de uso de metalo-inseticidas é promissora, pois há necessidade de novos inseticidas/estratégias para o controle populacional do vetor da dengue, chikungunya, zika e febre amarela [13]. O complexo metálico proposto neste estudo é uma molécula de uso comercial clorofilina cúprica de sódio. Esta molécula é utilizada em laticínios, principalmente na produção de queijos e produtos lácteos. Essa molécula é derivada da modificação da estrutura das clorofilas com a retirada do grupo fitol (apolar) e modificação/funcionalização lateral por grupos carboxilatos, seguida da neutralização dos grupos carboxilatos por hidróxido de sódio que conferem solubilidade da molécula em água.

A solubilidade em água é necessária para preparação/aplicação das soluções nos criadouros, para a ingestão e saturação do organismo alvo no meio aquático onde se encontram as larvas de *A. aegypti*. A solubilidade também reduz o custo de produção e facilita a aplicação do produto em campo sobre os criadouros e facilita a absorção pelas larvas e fixação no metabolismo do inseto. Neste contexto, pretende-se associar características multifuncionais de controle em um único produto: a clorofila é um fotossensibilizador, ligante natural, podendo, através do grupo heme, ser complexada aos íons metálicos de Cu (II) para potencializar a toxicidade do metal no sistema nervoso central (SNC) e/ou periférico (SNC/SNP), sistema enzimático (SE) e sistema digestório dos insetos (SD) após sua absorção/ingestão e fixação no organismo alvo (inseto) [13].

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar físico-química e avaliar da atividade inseticida e fotodinâmica do complexo clorofilina cúprica de sódio, em larvas de 3^o e 4^o estágio de *A. aegypti*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar a clorofilina cúprica sódica por utilização da espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível, espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, análise elementar e espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier.
- 2) Determinar a “janela fotodinâmica de absorção” da clorofilina cúprica de sódio através de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível;
- 3) Determinar o tempo de internalização do fotossensibilizador em larva de *Aedes aegypti*;
- 4) Avaliar o comportamento fotodinâmico da clorofilina cúprica de sódio em diferentes concentrações (15 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹ e 35 mg L⁻¹);
- 5) Avaliar a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da clorofilina cúprica de sódio;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DENGUE, FEBRE DE CHIKUNGUNYA, VÍRUS ZIKA, FEBRE AMARELA

Em 2016 foram registrados cerca de 1,5 milhões de casos prováveis de dengue, 271 mil casos de febre chikungunya e 215 mil casos de zika, sendo que o número de óbitos foram 642 por dengue, 196 por febre chikungunya e 8 por vírus zika [3]. A febre amarela vem chamando atenção, pois no período de dezembro de 2016 a primeira semana de março de 2017 foram registrados 809 casos prováveis e 127 óbitos confirmados e outros 106 óbitos estão sendo investigados [14].

A dengue é uma das doenças virais mais importantes transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*. Atualmente, estima-se a ocorrência de 50 a 100 milhões de casos anuais em mais de 100 países, com mais de 25.000 mortes por ano, principalmente, entre idosos e crianças [4]. A distribuição geográfica da dengue está se expandindo com as alterações climáticas, facilidade de transporte, inadequação da infraestrutura sanitária e urbana, aumento do volume de resíduos sólidos, por exemplo, recipientes de plástico descartados e outros itens abandonados que proporcionam acúmulo de água e tornam-se um hábitat propício para as larvas do mosquito em áreas urbanas [2,12,15]. O vírus da dengue (DENV) é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, que se apresenta em quatro sorotipos distintos antigenicamente (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) [16–18]. Em 2013, foi divulgada a descoberta do quinto sorotipo (DENV-5), que foi encontrado em amostras advindas de macacos da região da Malásia, mas que pode estar circulando entre seres humanos [4,19]. Os sintomas da doença causada por DENV é um quadro sintomático febril agudo, dores musculares e dor de cabeça.

O vírus chikungunya (CHIKV) é um arbovírus do gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae*, possui quatro linhagens geneticamente distintas: Oeste Africano, Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), Asiático e Oceano Índico (IOL) [20,21]. Sendo o principal vetor em área urbana o *Aedes aegypti* e na área rural o *Aedes albopictus* [22]. O isolamento do vírus CHIKV ocorreu em soro humano durante surto de doença febril na Tanzânia em 1953, desde então, há relatos de surtos em vários países do mundo, principalmente África, do sudeste asiático, e ilhas do Oceano Índico, Itália e França. O primeiro caso registrado no Brasil foi em 2014 e ao longo deste ano foram confirmados 2.772 casos [20,23]. A taxa de incidência do

CHIKV está entre 38% e 63% e, conseqüentemente, apresenta um grande risco de epidemia mundial [22]. A febre de chikungunya é uma doença caracterizada por febre aguda, cefaléia, mialgias, e artralgia, sintomatologia mais marcante, que em alguns pacientes pode persistir por meses ou anos e, às vezes, evolui para artropatia crônica incapacitante [24].

O vírus da zika (ZIKV) foi isolado em macacos rhesus pela primeira vez em Uganda na África, no ano de 1947, e em humanos, em 1952, na Uganda e na República Unida da Tanzânia [25]. O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, composta por três linhagens principais: a original da Ásia e duas da África [26]. No entanto, em 2007, casos relacionados ao ZIKV foram documentados fora dos continentes asiático e africano, com destaque para uma epidemia na Polinésia Francesa e a circulação do vírus por vários países da Oceania [27]. O ZIKV é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*; mas também têm ocorrido casos de transmissão por via sexual, por transfusão sanguínea e neonatal [27]. Em 2015, foi identificado o ZIKV como o agente etiológico de doença exantemática aguda no Brasil e no mesmo ano esse vírus foi relacionado com a microcefalia, sendo definida pela Organização Mundial da Saúde como um perímetro cefálico igual ou inferior a 31,9cm para meninos e igual ou inferior a 31,5cm para meninas [26,28,29]. A incidência de casos de microcefalia no Brasil no ano 2016 foi de, 2.143 casos confirmados e 3.086 ainda em investigação [30]. Os sintomas do ZIKV são semelhantes aos de outras arboviroses, como a dengue, e incluem febre, erupções cutâneas, conjuntivite, dores nos músculos e nas articulações, mal-estar ou dor de cabeça. Estes sintomas ocorrem normalmente, durante um período de 2-7 dias [22].

O vírus da febre amarela pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, e ocorre sob duas modalidades epidemiológicas: silvestre e urbana que se diferem na natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados [31]. Na modalidade urbana, a transmissão ocorre pelo *A. aegypti*, sendo o homem o principal hospedeiro [32]. A modalidade silvestre: foi reconhecido na década de 1930, mas é pouco compreendida e varia de acordo com a região onde ocorre. Na África, a transmissão ocorre por várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes* e nas Américas os principais transmissores são *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Sabethes chloropterus* e *Aedes albopictus* [32,33]. Os mosquitos são transmissores e reservatórios do vírus, ou seja, uma vez infectados permanecem por toda vida, diferentemente dos macacos que assim, como os homens, ao se infectarem morrem ou curam-se, ficando imunes. Deste modo, os macacos atuam somente como hospedeiros amplificadores do vírus da febre amarela [32]. A febre

amarela apresenta uma letalidade global entre 5-10% e entre os casos graves 40% a 60% necessitam de hospitalização. No período de 1970 a 2001 foram notificados no Brasil 849 casos [32,34]. Atualmente a situação do Brasil é preocupante, pois no período de dezembro de 2016 a janeiro de 2017 foram registrados 809 casos prováveis e 47 óbitos confirmados e outros 78 óbitos estão sendo investigados [14]. O método de prevenção mais eficaz para combater a febre amarela é a vacinação, pois uma única dose da vacina protege o indivíduo por pelo menos 10 anos [32].

As doenças transmitidas por insetos vetores (DTV's) correspondem a 16% da carga global estimada de doenças transmissíveis. O controle populacional do vetor é um componente chave na prevenção e controle de doenças transmissíveis [2].

As opções de controle (químico, mecânico e biológico) para combater a dengue, febre chikungunya, ZIKV e outras doenças transmitidas por insetos são focadas no controle populacional do vetor por redução da população e/ou por interferência no processo de reprodução [2,35]. A literatura mostra que há diversos mecanismos de sobrevivência e adaptação do inseto que diminui a eficiência do controle populacional. Como exemplo, temos a resistência fisiológica que consiste na expressão de genes de resistência a molécula inseticida que outrora não se expressaria se a população do inseto não estivesse sob pressão seletiva. Dessa forma, indivíduos com alta expressão gênica para resistência são selecionados a cada aplicação do inseticida e após algum tempo toda a população não é mais controlada pela mesma molécula. Isso acarreta aumento dos custos operacionais pelo aumento da quantidade de produtos aplicados e maior frequência de aplicação, levando a necessidade de interrupção de uso do inseticida e troca de molécula bioativa e conduz a impactos ambientais [5].

Diante desse cenário, o controle populacional precisa de novos produtos e estratégias eficientes e reduzidos impactos ambientais, por exemplo, novas classes inseticidas e/ou a substituição por métodos físicos-químicos e/ou biológicos ou conjugação de métodos, periodicamente avaliados quanto a sua eficiência, para o controle das populações dos insetos por um período maior e/ou minimização/atenuação da resistência adquirida [5,6]. Pode-se, por exemplo, citar o uso de inseticidas constituídos de microrganismos com utilização de fungos e bactérias como a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (Bti), que produz um cristal proteico com toxinas grupo Cry. Esta toxina é obtida por fermentação industrial, formulada e utilizada como inseticida [1,36]. Produtos à base do Bti vêm sendo utilizados no Brasil em regiões em que já foi detectada resistência do *A. aegypti* ao inseticida organofosforado

temefós [37]. Os cristais protéicos são corpos de inclusão que se dissolvem no sistema digestório do inseto, que é um ambiente alcalino, ativando as toxinas e provocando intensos danos celulares ao sistema digestório e consequente mortalidade do inseto [37].

3.2 TERAPIA FOTODINÂMICA/CONTROLE FOTODINÂMICO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento pelo qual se utiliza moléculas não tóxicas (fotosensibilizadores) que, a luz visível e próxima ao infravermelho (VIS/NIR) é absorvida para gerar espécies reativas de oxigênio que são espécies citotóxicas e causam a morte do inseto por danos celulares e/ou teciduais [38].

O primeiro estudo relatado da TFD foi em 1900, onde Oscar Raab verificou que o corante laranja de acridina no escuro, não apresentou efeito sobre o *Paramecium caudatum* e sob irradiação solar houve inativação do microrganismo [38].

A TFD é utilizada no tratamento de vários tipos de câncer de pele e a como agente antimicrobiano capaz de eliminar bactérias, fungos, vírus, e protozoários com emprego no tratamento bucal [39]. As vantagens em relação ao tratamento convencional é que o efeito do fotossensibilizador (FS) fica confinado apenas às áreas irradiadas pela luz e sem ocasionar resistência bacteriana [40].

Na TFD é administrado um agente fotossensibilizador (FS) que é ativado pelo emprego de luz, estimulando uma sequência de processos fotoquímicos e fotobiológicos geram produtos fototóxicos causando danos as célula-alvo [38,41]. Na TFD pode ser utilizada qualquer fonte de luz que tenha características espectrais apropriadas e que forneça energia suficiente para que o FS seja excitado e, posteriormente, possa produzir oxigênio singlete ou EROs, podendo ser a luz solar direta ou artificiais tais como lâmpadas de tungstênio ou halogênio, laser ou diodo emissor de luz (LED) [42].

O processo fotoquímico se inicia a partir da irradiação sobre FS que absorve fótons e seus elétrons são excitado para o estado singlete. Ao voltar para o estado inicial ocorre a emissão de fluorescência, ou a transição para um estado tripleto altamente energético [39,43]. O agente FS no seu estado tripleto excitado pode interagir com o oxigênio endógeno das células alvo, se torna citotóxicos [44], pois o FS reage diretamente com a membrana celular ou uma molécula intracelular e, forma radicais livres, que irão posteriormente reagir com o oxigênio, produzindo as espécies reativas do oxigênio (ERO) como os radicais superóxido ($\text{O}^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em outra situação há, transferência

de energia para o oxigênio molecular, formando o oxigênio singleto que, devida sua vida útil curta menor de 40 nanosegundos reage apenas com moléculas e estruturas que estiverem próximas do raio de ação de aproximadamente de 20 nm [42,43]. Este tempo de existência da espécie radical e raio de ação pode implicar comportamentos diferenciados quando da reação fotoquímica.

O FS caracteriza-se por absorver luz visível com eficiência e induzir ou participar de reações fotoquímicas, de baixa toxicidade. Como exemplo de FS, tem-se, os corantes e compostos químicos com grupos cromóforos: fenotiazinas, ftalocianinas e porfirinas [45]. Estes absorvem na “janela fotodinâmica” que compreende a região ente 600 nm a 1000 nm. Nesse intervalo, a membrana celular apresenta transparência à radiação eletromagnética, sendo o intervalo de absorção ideal para TFD, pois em comprimentos de onda acima de 800 nm a radiação é absorvida pela água o que restringe o uso dessa região espectral, e os comprimentos de ondas menores que 600 nm são absorvidas nos tecidos ocasionando menor penetração de luz na célula e reduzindo a eficiência da molécula na fotoconversão [45–47].

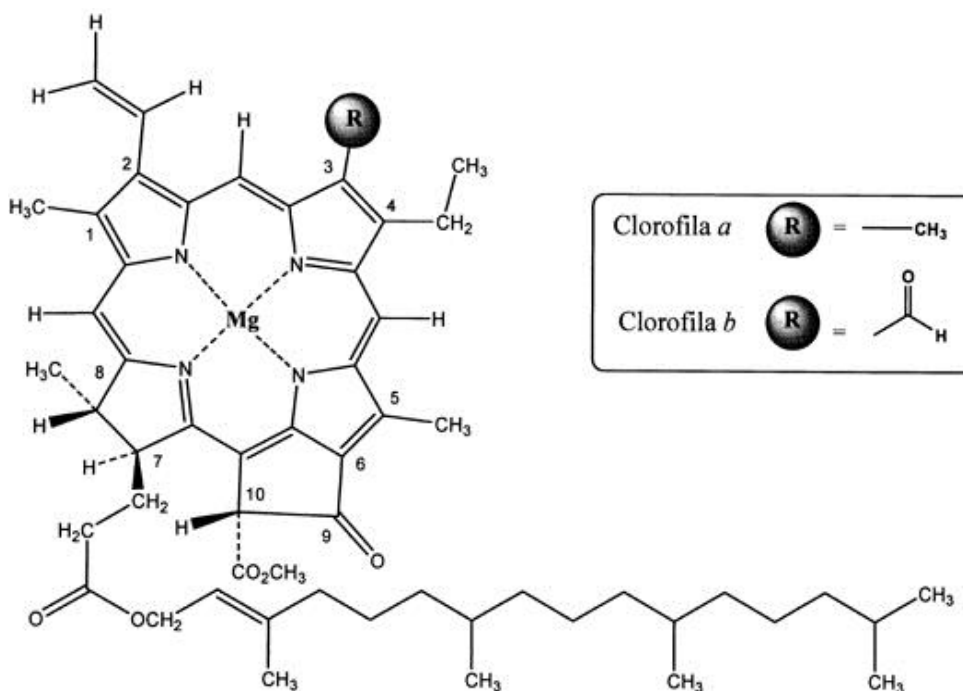
3.3 CLOROFILAS

As clorofilas são moléculas planares semelhantes entre si e designadas de clorofila (Chl) *a*, *b*, *c*, *d*, *e* [48]. As plantas contém pigmentos verdes fotossintetizantes, principalmente, a Chl *a*, que corresponde a, aproximadamente, 75% dos corantes verdes totais, e a Chl *b*, pigmento acessórios. As Chls são formadas por complexos derivados de porfirina com grupo heme, tendo como átomo central o Mg (II) coordenado aos átomos de nitrogênio da porfirina (**Figura 1**).

O composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica insaturada constituída por quatro anéis pirrólicos (numerados de 1 a 4 de acordo com o sistema de numeração de Fisher) e um anel isocíclico porfirínico com presença de um grupo carbonílico (cetona), localizado ao lado do terceiro anel pirrólico[49]. A presença deste grupo funcional é suficiente para caracterizar o composto como sendo uma Chl, independente das características das cadeias laterais e/ou estados de oxidação [50].

A molécula de Chl contém uma cadeia fitólica apolar que confere hidrofobicidade à molécula e seus derivados [51]. Na classificação dos derivados porfirínicos, a Chl pertence a classe das clorinas.

Figura 1 - Estrutura química da Chl *a* e Chl *b*.



Fonte: [51].

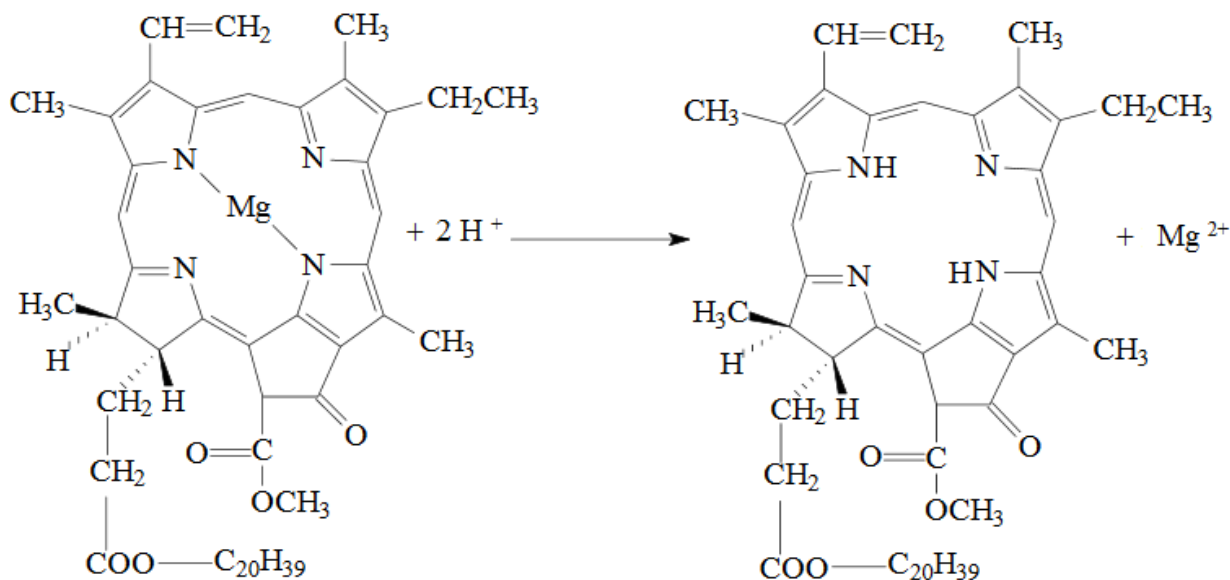
3.3.1 CLOROFILA A E FEOFITINA A

A Chl *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese, participando da reação fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros da reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. A Chl *a* apresenta uma cor azul-esverdeada quando em solução, enquanto a Chl *b* uma cor amarela esverdeada [47].

A degradação da Chl *a*, por feofitinação direta ou indireta (perda do átomo metálico de coordenação), produz feofitina com coloração oliva-marrom. As perdas de Chl são atribuídas à temperaturas acima de 15°C de armazenamento ou pela alteração do pH para meio ácido, condições que ocorrem no processo de feofitinação com substituição do átomo de magnésio (Mg) do centro da Chl pelo átomo de hidrogênio (H) conforme ilustrado na **Figura 2** [48]. Em temperaturas menor que 7°C de armazenamento, a cor é estabilizada por um período maior, provavelmente, pela conservação do átomo de magnésio no centro da Chl ocasionada pelo aumento de agregação da Chl. A obtenção de modelos cinéticos pode descrever a perda da cor e/ou perdas de Chl com relativa precisão durante armazenamento sob

congelamento, e mostra a dependência da temperatura para a taxa de reação pelo modelo de Arrhenius [48,51].

Figura 2 - Obtenção da feofitina *a* partir da Chl *a*.



Fonte: [52], adaptado.

3.4 COBRE / CU (II)

O cobre é um metal de transição com configuração eletrônica $3d^{10}4s^1$ que possui 2 (dois) estados de oxidação (monovalente Cu (I) com configuração $3d^{10}$ e bivalente Cu (II) com configuração $3d^9$) sendo a bivalente mais estável. O estado de configuração d^9 apresenta um elétron desemparelhado (compostos paramagnéticos) e, geralmente, de coloração azul ou verde-azulado, devido à transição d-d, e a maioria dos complexos e compostos apresentam estrutura octaédrica distorcida [53].

O íon Cu (II) é componente estrutural de proteínas e enzimas com elevado potencial redox, tornando-se essencial nas reações de fotossíntese, respiração, formação de tecido conjuntivo, metabolismo do ferro, função neurológica, entre outras [54]. O Cu (II) está envolvido na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como H_2O_2 , O_2^- e OH^- por vias das reações de Fenton (**Equações 1 e 2**) e de Haber-Weiss (**Equação 3**). O íon cúprico, Cu (II), e o íon cuproso, Cu (I), atuam em reações redox, que na presença de superóxido ($*O_2^-$) o íon Cu (II) pode ser reduzido ao íon Cu (I) (**Equação 1**), que atua como catalisador na

decomposição de H_2O_2 originando a formação de radicais hidroxila (OH^\cdot) a partir de peróxido de hidrogênio (**Equação 2**) [55]. A reação é chamada de reação de Haber-Weiss (**Equação 3**).



O radical hidroxila é um potente oxidante, capaz de reagir com todas as moléculas biológicas, podendo produzir danos celulares por clivagem de ligações e, conseqüentemente, causar a morte celular por apoptose ou necrose a depender da concentração.

3.5 COMPLEXOS METÁLICOS E CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO (FOTOSENSIBILIZADOR)

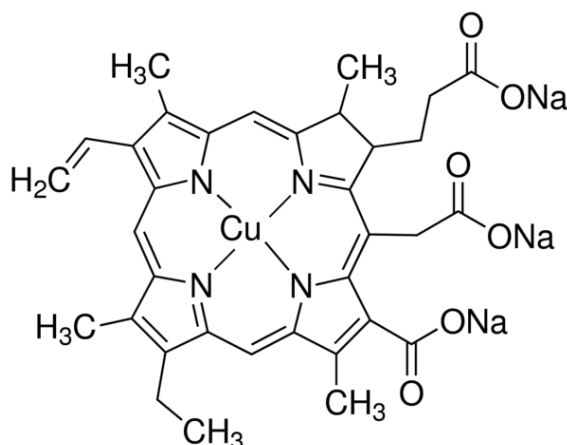
A química de coordenação, no qual estão inseridos os metais de transição, tem sido extensamente explorada com foco em investigações de compostos bioativos e/ou miméticos que apresentem propriedades biológicas, fotoquímica e fotofísica, dependendo dos tipos de ligantes e metal de coordenação [56].

O processo de formação do complexo metálico é resultado da combinação química entre o íon metálico (ácido de Lewis) e um ou mais grupos ligantes (bases de Lewis), através de ligações coordenadas, formando uma estrutura mais estável, rígida e de menor reatividade em relação ao íon metálico. O átomo central é um metal de transição e o ligante ocupa mais de uma posição de coordenação formando uma estrutura cíclica, às vezes, denominado de quelato metálico. Cada ligante deve ter pelo menos um par de elétrons livres para se ligar ao íon metálico ou ao átomo central por covalência coordenada. O número de coordenação no complexo é definido como o número de ligações formadas pelo átomo central [56,57].

As Chl são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, ligadas com íon Mg (II), e que contém uma cadeia fitólica (alusão ao fitol, álcool) anexa ao anel porfirínico [56]. As clorinas possuem um de seus anéis pirrólicos na forma reduzida quando comparadas com as porfirinas, resultando em uma maior absorvidade molar nas bandas Q (transições eletrônicas π - π^*) devido a um decréscimo de simetria. Estas bandas de absorção apresentam

comprimento de onda em torno de 600 nm, e por este motivo constituem uma importante classe de compostos empregados na TFD e proposto para o Controle Fotodinâmico (CFD) de insetos [58]. Na **Figura 3** é mostrada a estrutura química da clorofilina cúprica de sódio (CCS).

Figura 3 - Estrutura química para clorofilina cúprica de sódio (Sigma-Aldrich, China).



A Chl *a* pode ser modificada para a sua versão desmetalada, a qual é chamada feofitina *a* (Pheo *a*) onde o íon metálico Mg (II) é substituído por dois átomos de hidrogênio. Este derivado pode ser obtido por reação de hidrólise ácida [52].

As moléculas de porfirinas podem formar complexos com diferentes íons metálicos de transição por coordenação através dos quatro átomos de nitrogênio pirrólicos. Entretanto, muitas existem naturalmente sem formação de complexos com metais. Outras metalo-Chl podem ser sintetizadas por meio da substituição do íon Mg (II) por Zn (II) e Cu (II). A Pheo é o derivado não-metalado da Chl(s). Estas estruturas apresentam elevada capacidade de absorção de luz na região do vermelho entre 600 e 800 nm, dentro da chamada janela fotodinâmica ou terapêutica, o que favorece a aplicação na TFD [59] e, possivelmente, no CFD de insetos [59,60].

Na revisão da literatura foram encontrados relatos relacionados ao emprego na medicina do complexo Chl cobre. Vários estudos e resultados chamaram a atenção para a possibilidade de utilização como composto bioativo: inseticida, bactericida, fungicida, antimutagênicidade, anticancerígenas, antioxidante entre outras possíveis e/ou combinadas propriedades, principalmente, para novos tratamentos para o câncer; todavia, os mecanismos

de ação ainda não são bem compreendidos [61]. Quando o complexo formado por Chl-M (clorofila-metal) onde M = Fe (II)/Fe (III), Mg (II) e Cu (II), como FS, são irradiados por ultra-som e luz visível (Vis.), respectivamente, diferentes espécies reativas de oxigênios (EROs) podem ser produzidas no processo fotoquímica, devido à energia de ativação diferente, a irradiação de luz visível (Vis.) tem apresentado maior eficiência que a irradiação ultra-sônica. Os resultados demonstraram que, para os complexos Chl-M (clorofila-metal), as quantidades EROs geradas são maiores com o aumento do tempo de irradiação e a concentração do complexo Chl-M. Estes resultados são valiosos e podem ser referências para o estudo do mecanismo de processos sonodinâmico e fotodinâmico com extensa aplicação de derivados de Chl-metal no tratamento de tumores [38]. Entretanto, apesar desses resultados da literatura é importante que estes compostos não causem danos celulares e/ou ambientais, devido a possibilidade de reciclagem dos compostos de clorofilina por fitoabsorção e degradação sob condições ambientais.

A estabilidade térmica da CCS foi avaliada por Ferruzzi e Schwartz (2005) [62]. A degradação térmica de uma solução de 500 ppm foi monitorada entre 25 a 100°C pela diminuição da intensidade de absorbância em 627 nm. A energia de ativação estimada pela equação de *Arrhenius* e encontrada foi: $13,3 \pm 0,8$ e $16,0 \pm 2,1$ kcal mol⁻¹ para Chl e CCS estes valores são similares aos apresentados pela Chl natural [62].

A clorofilina é uma mistura solúvel de derivados de Chl e utilizada como corante de alimentos e suplemento alimentar. Apesar da potencial atividade antimutagênica e antioxidante do produto comercial tenha demonstrado, nada se sabe, da digestibilidade do produto por humanos [62].

Ferruzzi, Failla e Schwartz (2002) mostrou que em simulação da digestão gástrica e intestinal da CCS e da clorina e4-Cu(II) o maior constituinte da CCS foi relativamente estável na digestão. Os resultados mostraram que a inclusão da CCS estabiliza as clorinas e4 e e6 (mais susceptível à degradação). A acumulação celular foi investigada e mostrou que a acumulação ocorreu no intervalo de concentração de 0,5 a 60 mg L⁻¹ (ppm) em valores de 0,2 a 29,6 µg de CCS por mg de proteína celular. A absorção de CCS por células Caco-2 foi significativamente menores a baixa temperatura (4°C) e maior a altas temperaturas (37°C). A estabilidade de CCS durante a digestão “*in vitro*” e a efetiva absorção por células Caco-2 enterócito foi efetiva [63].

3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DA CLOROFILINA SÓDICA CÚPRICA EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DE *ALLIUM CEPA*

A preocupação ambiental relacionada ao uso indevido e massivo de inseticidas e produtos agrícolas tem sido motivo de estudos com propostas de alternativas sustentáveis e com foco no controle populacional de insetos vetores (principalmente, culicídeos) Para isso, as pesquisas devem considerar como primordial a realização de bioensaios de toxicidade que avaliem a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em organismos vivos, a fim de garantir a utilização de produtos que não resultem danos a organismos não-alvos [64].

Neste cenário a utilização de biomarcadores são adequados ao (bio)monitoramento de produtos que possam indicar a presença e/ou danos dos contaminantes no ar, água e solo, inclusive em quantidades abaixo das estabelecidas pelos órgãos reguladores. Os biomarcadores têm sido utilizados de forma intensa, para a identificação dos danos causados pelos poluentes nos organismos vivos [65,66].

Assim, nas sínteses de novos compostos químicos ou bioativos, devem ser realizados ensaios em modelos biológicos para detecção de danos ao DNA de organismos não alvos. As plantas têm sido utilizadas para biomonitoramento por apresentarem vantagens, como: permitir um maior número de amostragens, baixo custo operacional, maior sensibilidade, condição estática e rapidez de execução, o que permite fornecer informações importantes sobre os níveis de substâncias contaminantes e impactos genéticos induzidos [67].

O teste com *Allium cepa* apresenta vantagem da proliferação celular, número reduzido de cromossomos e facilidade de cultivo, sendo muito utilizado na avaliação de danos celulares causados por xenobióticos. O bioensaio consiste na exposição das raízes das plântulas aos possíveis agentes mutagênicos para indução do dano ao material genético das células vegetais e extensíveis aos danos em seres humanos [68]. O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como teste eficiente para análise e monitoramento “*in vitro*” da genotoxicidade de substâncias ambientais.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 FOTOSSENSIBILIZADOR: CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

O reagente utilizado no preparo do FS é a CCS comercial (Sigma - Aldrich, China), cor: verde a verde escuro/preto; fórmula: $C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$; massa molar: $724,15 \text{ g mol}^{-1}$; grau de pureza: comercial; conteúdo de cobre: 3,5 a 5,0%; conteúdo de sódio: 5,5 a 6,5%; solubilidade: 100 mg mL^{-1} ; estrutura IR: PRD.2.ZQ5.10000013954; número de produto: C6003; número EC 234-242-5; CAS:11006-34-1; MDL: MFCD00012149; produzido em 28/01/2015; temperatura de estocagem: 2 a 8°C .

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

As análises para caracterização e verificação das propriedades fotofísicas/fotosensibilizadoras da CCS, foram realizadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível, por espectroscopia no infravermelho, análise elementar, e espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado.

4.2.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓTICA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

As análises de caracterização de Espectroscopia de Absorção Ótica na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis) foram realizadas no laboratório de Óptica e Fotônica do Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O equipamento utilizado para estudar as transições eletrônicas (promoção de um elétron para um orbital de maior energia) da CCS foi o espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis de feixe único, modelo USB4000 da Ocean Optics. As medidas foram realizadas de 200 nm a 800 nm, com cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

4.2.1.1 *Determinação da pureza pela razão entre as bandas Soret e Q do espectro de absorção*

A determinação de pureza da CCS foi realizada utilizando protocolo da United States Pharmacopeia (U.S.P.) [69,70]. Uma solução de CCS a 10 mg L^{-1} foi preparada em tampão fosfato de 0,15 M pH 7,5 (fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) : fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) na proporção de 21:4 v/v). As varreduras para a obtenção dos espectros de absorção foram realizadas no intervalo de 380 nm a 780 nm utilizando uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico no espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Varian). Identificaram as bandas de absorção na região do azul (banda Soret) e região do vermelho (banda Q). Determinou-se a pureza a partir da análise da razão das bandas Soret / Q obtidos. [69–71].

4.2.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A técnica de espectroscopia de absorção no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) permite detectar/avaliar a formação do complexo metálico, devido ao deslocamento de bandas e mudanças de intensidade das bandas correspondentes as vibrações dos grupos químicos envolvido na complexação.

Os espectros vibracionais da CCS na região do infravermelho foram obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) no espectrofotômetro FTIR 41000 - JASCO (FTIR).

4.2.3 ANÁLISE ELEMENTAR

As análises de composição das amostras de CCS em relação à porcentagem de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) foram realizadas no IQ/UNICAMP por Análise Elementar (AE) com equipamento da marca Perkin-ELMER CHN 2400. Na análise, uma massa de 100 mg da amostra sofreu combustão completa a $\pm 925^\circ\text{C}$ na presença de oxigênio puro, e em seguida, realizou-se a determinação dos gases resultantes. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa dos elementos da amostra.

4.2.4 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

As análises de determinação do conteúdo de cobre (Cu), sódio (Na) e demais constituintes traços foram realizados na amostra de CCS por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) utilizando o equipamento Perkin Elmer modelo Optima 8300 ICP-OES Spectrometer. Na análise foram tomadas 200 mg das amostras, em seguida, foram atomizadas em plasma e realizou-se a leitura. As análises foram realizadas em duplicata. As amostras de CCS analisadas quanto a porcentagem/relação do conteúdo de cobre - Cu (II) e sódio - Na (I), além dos elementos traços que estavam presentes na amostra.

4.2.5 CÁLCULO DA PUREZA DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO PELA %Cu E RAZÃO Cu/N E A QUANTIDADE DE DERIVADOS NÃO-CÚPRICOS

O cálculo da pureza da CCS e a quantidade de derivados não-cúpricos presentes utilizando-se a metodologia proposta de Chermomorsky, et al. (1993) que estabeleceram uma relação entre a razão mássica de Cu (II)/N e a quantidade de derivados não-cúpricos presentes em amostras de CCS conforme a **Equação 4** [71].

$$\% \text{ Derivados não cúpricos} = 100,000 - 90,892 (Cu/N) \quad (4)$$

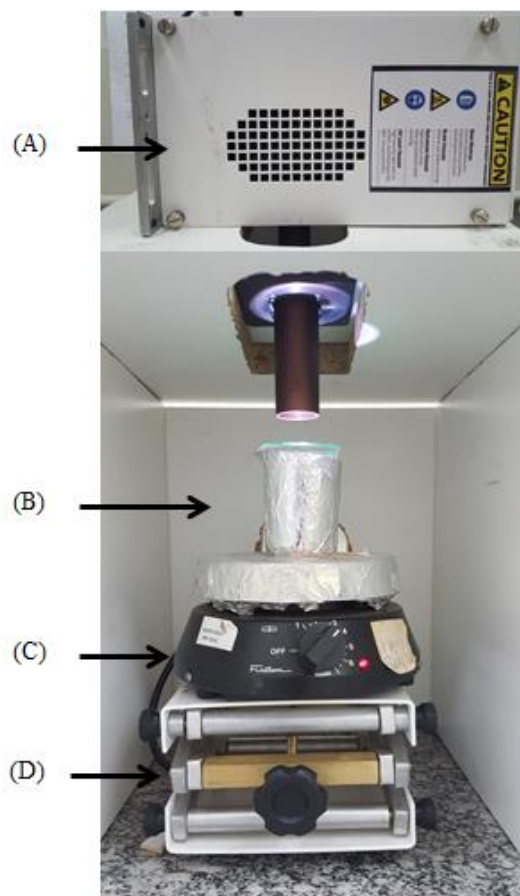
A pureza da CCS foi calculada a partir da porcentagem (%) de cobre obtido na análise de ICP-OES conforme a **Equação 5** [72].

$$\% \text{ Pureza CCS} = -0,047 + 10,9 \% Cu(II) \quad (5)$$

4.3 FOTODEGRADAÇÃO DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

Para as análises de fotodegradação com luz solar direta, foi utilizado um simulador solar instalado no Instituto de Física da UFMS. O simulador solar é constituído a partir de uma plataforma de elevação, agitador magnético e suporte com lâmpada de xenônio para simulação de irradiação/potência solar (**Figura 4**).

Figura 4 - Sistema utilizado para realizar os estudos de fotodegradação sob luz solar. (A) simulador solar; (B); suporte de madeira (C) agitador magnético e (D) plataforma de elevação.



Fonte: autor.

O simulador solar utilizado é um equipamento da marca Abet Technology, modelo 10500, equipado com uma lâmpada de Xenônio de 300 W e um filtro AM1.5G para garantia da reprodutibilidade do espectro do sol. O sistema foi calibrado para irradiar uma potência de 100 mW cm^{-2} (equivalente a potência de irradiação do sol ao meio dia) utilizando uma célula de calibração modelo 15151 da Abet Tech.

Para as análises de degradação sob irradiação solar foram preparadas 100 mL de soluções de CCS com as seguintes concentrações de 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} , 25 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} . Inicialmente, a lâmpada do simulador solar foi ligada por 10 (dez) minutos antes do início do experimento, para estabilização da potência irradiada. O estudo de fotodegradação foi realizado para cada concentração de CCS. Durante o processo de fotodegradação por irradiação solar direta, a amostra foi colocada a uma distância para a irradiação da lâmpada seja equivalente ao sol do meio dia (a distância foi definida conforme calibração do sistema

utilizando uma célula de calibração), sob constante agitação magnética da solução, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL em intervalos de dez minutos no período total de 180 minutos. As alíquotas retiradas foram analisadas simultaneamente por espectroscopia UV-Vis.

Realizou-se uma curva de calibração no intervalo de concentração de 5 mg L⁻¹ a 50 mg L⁻¹ por espectroscopia UV-Vis para acompanhamento da degradação do fotossensibilizador sob luz solar simulada.

4.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO EM *ALLIUM CEPA*

Os experimentos com CCS foram realizados para avaliação dos efeitos citotóxicos. Amostras foram preparadas em uma placa forrada com papel Germitest, contendo 50 sementes de *Allium cepa* (cebola). As sementes foram colocadas equidistantes para cada tratamento com 50, 100 e 200 mg L⁻¹ (ppm). As diluições foram realizadas a partir da solução estoque de CCS em água destilada com concentração de 1000 mg L⁻¹ (1000 ppm). Solução de trifuralina 0,02% foi utilizada como controle positivo (CP) e água ultrapura (MiliQ) como controle negativo (CN). A cada placa com as sementes foram adicionados 9 mL de cada solução teste. As placas com as sementes e solução de CCS foram mantidas em condições controladas, em câmara de germinação, por 96 horas com temperaturas de 22 ± 2°C. As sementes germinadas foram contadas e o comprimento das raízes foi medido para cada tratamento realizado com a utilização de paquímetro digital [68,73].

Após o período de germinação das sementes de *Allium cepa*, as raízes foram fixadas em solução de metanol/ácido acético (3:1 v/v) por 8 horas e, em seguida, a solução foi substituída, sendo as raízes armazenadas a 4^o±2°C durante 24 horas. As raízes foram lavadas duas vezes com água destilada e em seguida, foram hidrolizadas com HCl 1M a 60°C por 10 minutos. Novamente, as raízes foram lavadas com água destilada e coradas com Reativo de Schiff por 2 horas. Após esse procedimento, o meristema foi cortado e uma gota de Carmim acético 2% foi adicionada para então preparar a lâmina utilizando-se método *squash* (espalhamento das células). Para cada, concentração de CCS, foram preparadas 05 lâminas que foram analisadas por contagem de 1000 células/lâmina em microscópio óptico com aumento de 400x, totalizando 5000 células por concentração [68,73].

A determinação da citotoxicidade foi realizada utilizando os seguintes parâmetros:

- 1) porcentagem de germinação (% GR),

- 2) crescimento médio relativo da raiz (CMR),
- 3) índice de germinação (IG) e;
- 4) índice mitótico (IM), utilizando as **Equações 6, 7, 8 e 9**, respectivamente [68,73].

$$\%GR = \frac{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas na solução teste}}{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas no controle}} \times 100 \quad (6)$$

As médias do comprimento das raízes medidas foram realizadas para a obtenção do crescimento relativo da raiz (**Equação 7**):

$$CMR = \frac{\text{Média do crescimento das raízes na solução teste}}{\text{Média do crescimento das raízes no controle}} \times 100 \quad (7)$$

Os dados anteriormente obtidos foram compilados para o cálculo do índice de germinação, identificando a toxicidade dos tratamentos por CCS (**Equação 8**):

$$IG = \%GR \times CMR \quad (8)$$

Os efeitos citotóxicos foram também avaliados por meio da determinação do índice mitótico (IM), utilizando a **Equação 9**:

$$IM = \frac{N^{\circ} \text{ total de células em mitose}}{N^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100 \quad (9)$$

4.5 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EM *ALLIUM CEPA*

A análise da atividade genotóxica e mutagênica foi realizada por busca/investigação de anormalidades cromossômicas (AC) em células meristemáticas de raiz de *A. cepa* em microscopia [68,73]. A análise foi realizada por determinação do índice de alterações cromossômicas (IAC) utilizando a **Equação 10**.

$$IAC = \frac{N^{\circ} \text{ total de alterações cromossômicas}}{N^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100 \quad (10)$$

A atividade mutagênica (IMT) dos tratamentos foi avaliada através da contagem de micronúcleos (mutação a nível cromossômico ou pequeno núcleo ao lado do núcleo original da célula) recorrendo à determinação do índice de micronúcleos pela **Equação 11**.

$$IMT = \frac{N^{\circ} \text{ total de células com micronúcleo}}{N^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100 \quad (11)$$

4.6 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CRIAÇÃO/COLÔNIA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* (ROCKEFELLER)

Para a realização dos bioensaios de toxicidade foi necessária a manutenção de uma criação de mosquitos *A. aegypti* (linhagem susceptível; Rockefeller) no Laboratório de Insetos Vetores (LIVE/UFGD) ou também por utilização de ovos de *A. aegypti* fornecidos pela SUCEN/Marília – SP devido as dificuldades de manutenção da colônia no LIVE. Os mosquitos adultos foram mantidos em gaiolas teladas, sendo alimentados com mel embebido em algodão. Para a produção de ovos, fêmeas do mosquito foram alimentadas com sangue durante 30 minutos por exposição de um hamster anestesiado. Após o período de alimentação sanguínea, o hamster foi devolvido a sua caixa de criação e monitorado até a recuperação da anestesia.

Após 48 horas do repasto sanguíneo foi colocado na gaiola dos mosquitos um recipiente contendo água e papel filtro para que as fêmeas realizassem a oviposição. A sala de criação dos mosquitos foi mantida a temperatura controlada de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo: 10 horas no escuro e 14 horas de luz artificial [17].

Após 3 dias, o papel filtro com ovos foi retirado do pote com água e mantido em ambiente da sala de criação para secagem durante 07 dias, sendo armazenado em envelope e caixa de isopor para uso posterior.

Para obtenção das larvas de *A. aegypti* 3^o e 4^o estágio, ovos foram colocados em bandejas plásticas com 1000 mL de água destilada (mantida a relação de 1 ovo (larva) por mL de água destilada) e ração de peixe (Alcon) (ração macerada e dissolvida em água) com relação de 1,9 mg de ração/larva [74]. Após 5 a 7 dias as larvas alcançaram o 3^o e 4^o estágio de desenvolvimento larval e, foram utilizadas para realização dos bioensaios de toxicidade convencional (sem irradiação) e não convencional (com irradiação solar direta) e análise da atividade dos fotossensibilizadores (atividade fototóxica) [17].

4.7 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO

O estudo do tempo de internalização (TI) da CCS foi realizado em larvas de 3° e 4° estágio de *A. aegypti* (L3/L4). Uma solução de 100 mg L⁻¹ (ppm) de CCS foi preparada em béquer de 250 mL com 200 mL de solução, sendo o béquer envolto em papel alumínio para proteção da degradação fotoquímica. Grupos de 10 larvas foram colocadas na solução durante os períodos de 5 minutos, 20 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 180 minutos. Para cada período de tempo foram utilizadas 5 (cinco) larvas vivas para realização/determinação da internalização da CCS.

Para visualização da internalização da CCS, as larvas foram retiradas da solução com pipeta Pasteur e colocadas sobre lâminas de microscopia, sendo o excesso de líquido retirado com papel filtro para que as larvas não se movessem sobre a lâmina. Logo após, a lâmina foi colocada em estereomicroscópio Zeiss®, modelo Discovery V.12®, com sistema de captura de imagens AxioCam® (versão 5.0) e *software* ZEN® (versão 2.0) (escalas em mm) do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas - IB-UNICAMP (GRELLA, 2016). Para cada registro fotográfico foram realizadas 20 (vinte) imagens sobrepostas. As imagens obtidas foram tratadas por meio do *software* ZEN® para obtenção da imagem final de cada larva de *A. aegypti*.

As larvas para análise de transito e internalização da CCS foram posicionadas com a face ventral (FV) ou face dorsal (FD) voltada para as lentes do estereomicroscópio e fotografadas.

4.8 BIOENSAIOS “IN VIVO” EM LARVAS DE 3° E 4° ESTÁGIO DE *Aedes aegypti* (ROCKFELLER)

4.8.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

Preparou-se uma solução aquosa de CCS na concentração de 250 mg L⁻¹ (250 ppm) e a partir dessa foram feitas diluições para obtenção das concentrações 100 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 35 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹ e 15 mg L⁻¹. As concentrações foram sempre definidas através de análises preliminares.

4.8.2 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE EM LARVAS DE *Aedes aegypti* SEM EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO SOLAR

Os bioensaios “*in vivo*” sem exposição solar direta (escuro) foram planejados com 2 grupos experimentais: **(1)** controle negativo (CN) e o **(2)** controle com CCS (CF).

O CN **(1)** foi aquele em que as larvas de 3º e 4º estágio de *A. aegypti* não foram submetidas a nenhum tratamento, sendo mantidas apenas em água destilada. No CF **(2)** as larvas foram expostas/tratadas com a CCS conforme a **Tabela 1**. Os experimentos com os dois grupos experimentais foram realizados em paralelo, sendo realizado em quadruplicata (4x) para cada concentração sendo 25 larvas por repetição. No grupo experimental CF, as larvas de *A. aegypti* foram cuidadosamente transferidas para um béquer de 50 mL, em seguida adicionou-se 50 mL da solução de interesse com a concentração de CCS conforme a **Tabela 1**. Em seguida realizou-se o monitoramento do bioensaio de toxicidade no escuro seguindo o tempo proposto na **Tabela 1**. O critério de mortalidade assumido foi da imobilidade das larvas que não reagiram ao estímulo do toque de um pincel e/ou incapacitadas de alcançar a superfície para respiração [17].

Tabela 1 - Tratamento realizado nas larvas de *Aedes. aegypti* de 3º e 4º estágio para o bioensaio de toxicidade com a CCS sem exposição solar direta.

Parâmetros	
Concentração (mg L ⁻¹)	15; 20; 25; 30; 35; 50, 100 e 250.
Tempo de monitoramento (minutos)	30; 60; 120; 180; 240; 300; 360; 420; 540; 660; 1320; 1440 e 2880.

4.8.3 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE DE LARVAS DE 3º E 4º ESTÁDIOS DE *Aedes aegypti* COM EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO SOLAR DIRETA

Os bioensaios “*in vivo*” em exposição solar direta foram planejados com 2 grupos experimentais: **(1)** controle negativo (CN); **(2)** controle do CCS (CF).

No CN **(1)** as larvas de 3º e 4º estágio de *A. aegypti* não foram submetidas a nenhum tratamento, sendo mantidas apenas em água destilada. O CF **(2)** as larvas de 3º e 4º estágio de *A. aegypti* foram expostas/tratadas com a CCS conforme a **Tabela 2**. Após o preparo dos grupos experimentais, as larvas permaneceram 120 minutos no escuro, respeitando o tempo de internalização e logo após foram expostas a irradiação solar direta.

Os experimentos foram realizados em paralelo, utilizando-se quatro repetições (4x) de 25 larvas por repetição para cada concentração. No grupo experimental CF, as larvas foram transferidas para uma placa de petri, em seguida foi adicionado 50 mL da solução de interesse com a concentração de CCS conforme **Tabela 2**, aguardou o período de internalização do fotossensibilizador de 120 minutos no escuro, após esse período, as larvas foram expostas a irradiação solar direta. O período de exposição sob irradiação solar foi entre as 09 h e 14 h em um dia ensolarado (sem a presença de nuvens durante o tempo de leitura de mortalidade). O monitoramento do bioensaio de toxicidade sob irradiação solar seguiu o tempo proposto da **Tabela 2**. As concentrações foram definidas por meio de análises preliminares onde verificou-se as concentrações com os melhores comportamento fotodinâmico. O critério de mortalidade assumido foi da imobilidade das larvas que não reagiram ao estímulo do toque de um pincel e/ou incapacitadas de alcançar a superfície para respiração durante e após o tratamento [17].

Tabela 2 - Tratamento realizado em larvas de *Aedes aegypti* de 3º e 4º estágio para o bioensaio com a CCS por exposição solar direta.

Parâmetros	
Concentração (mg mL ⁻¹)	15; 20; 25; 30 e 35.
Tempo de monitoramento (minutos)	30; 60; 120; 180; 240 e 300.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

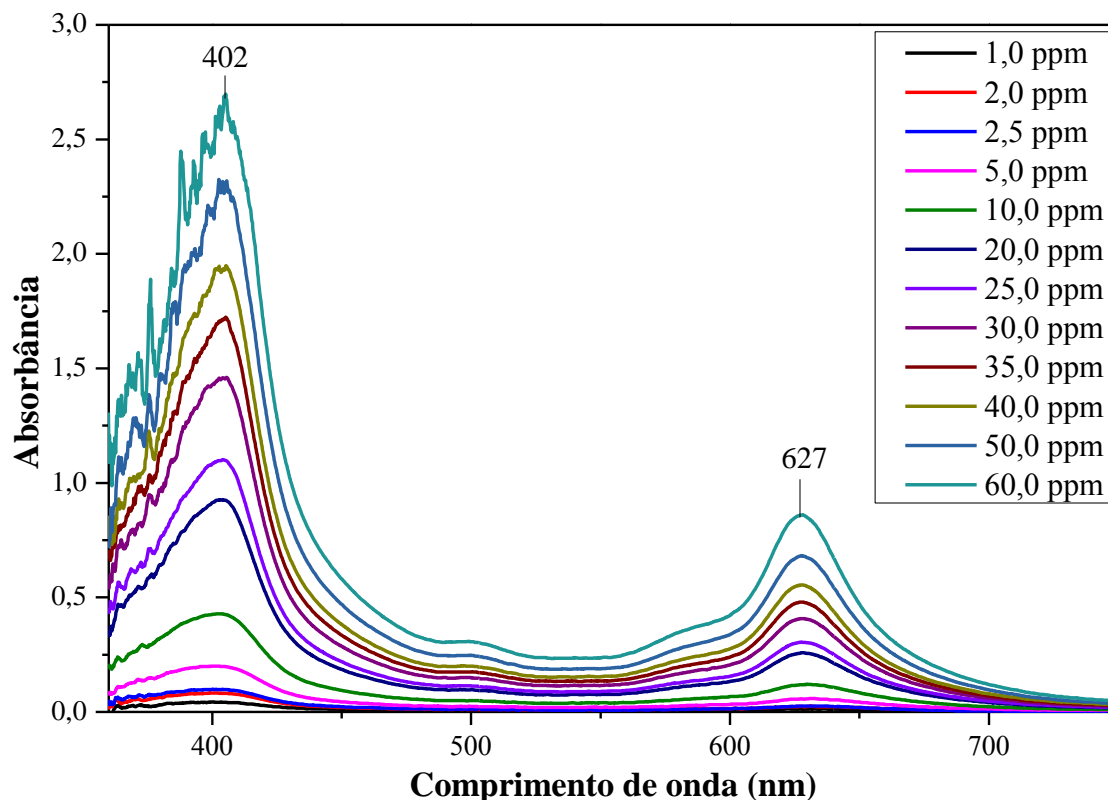
As análises estatística, foram realizadas no programa OriginPro versão 8.5.0 SR1 (OriginLab Corporation). Os dados de mortalidade foram submetidos a análise Probit (software Polo-PC) para obtenção da concentração letal: (CL₅₀) [75].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO ÓPTICO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES: ABSORÇÃO UV-VISÍVEL

Os espectros de absorção da CCS (Sigma-Aldrich, China) (**Figura 5**), apresentaram duas bandas de absorção características de compostos de porfirinas: a banda de Soret entre 400 nm a 450 nm, que compreende a região do azul; e a banda Q entre 550 nm a 700 nm que compreende a região do vermelho [77]. O pico de maior intensidade é 402 nm na região banda de Soret característicos de Chl ou metais Chl e o de menor intensidade é de 623 nm na região da banda Q. A região entre 550nm a 700 nm apresenta apenas uma banda de absorção sendo característicos do anel porfirínico com a inserção de um metal ligante, caracterizando uma metalo-Chl como mostrado por Gurinovich, *et al*, (1963) [78]. A CCS apresentou espectro de absorção de menor intensidade na região de 627 nm, é uma característica favorável para aplicação na TFD (terapia fotodinâmica), pois absorvem dentro da “Janela fotodinâmica” que compreende a região ente 600 nm a 1000 nm [64,78,79].

Figura 5 - Espectros de absorção UV-Vis da CCS (Sigma-Aldrich, China).



Os espectros UV-Vis são apresentados na **Figura 5**, e mostram que a CCS apresentou o comportamento de absorbância como o descrito na literatura com os picos de absorbância em 402 nm e 627 nm [64,77–79].

Os FSs são moléculas estruturalmente composta por sistema de anel aromático planar, com sistema altamente conjugado, que funciona como cromóforo dos compostos para absorção de energia radiante. Essas características estruturais fornecem as propriedades adequadas para o uso em TFD ou CFD (controle fotodinâmico), com intensa absorção no intervalo de 600 nm a 800 nm. Este intervalo é a região útil do espectro eletromagnético para a TFD e CFD, considerado essencial e eficiente para a penetração de luz nos tecidos, e considerável rendimento quântico na produção de oxigênio singlete/radicais [47,80,81]. Conforme observou na **Figura 6** a Janela fotodinâmica de absorção (JFA) da CCS está na região de absorção no intervalo entre 600 nm e 700 nm na banda Q.

5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DE TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia no infravermelho (IR) é uma análise aplicada na determinação qualitativa de espécies inorgânicas, orgânicas e bioquímicas. A radiação infravermelha

corresponde á parte do espectro eletromagnético entre a região do visível e micro-ondas. O espectro na região do infravermelho é dividido em Infravermelho Próximo (NIR), Infravermelho Médio (MIR) e Infravermelho Distante (FIR). As regiões IR são mostradas na **Tabela 3** com o número de onda (cm^{-1}) e comprimento de onda (nm).

Tabela 3 - Regiões espectrais do Infravermelho (IR)

Região	Número de Onda (cm^{-1})	Comprimento de onda (nm)
NIR	12.800 – 4000	780 – 2500
MIR	4000 – 400	2500 – 5000
FIR	200 – 10	5000 - 100.000

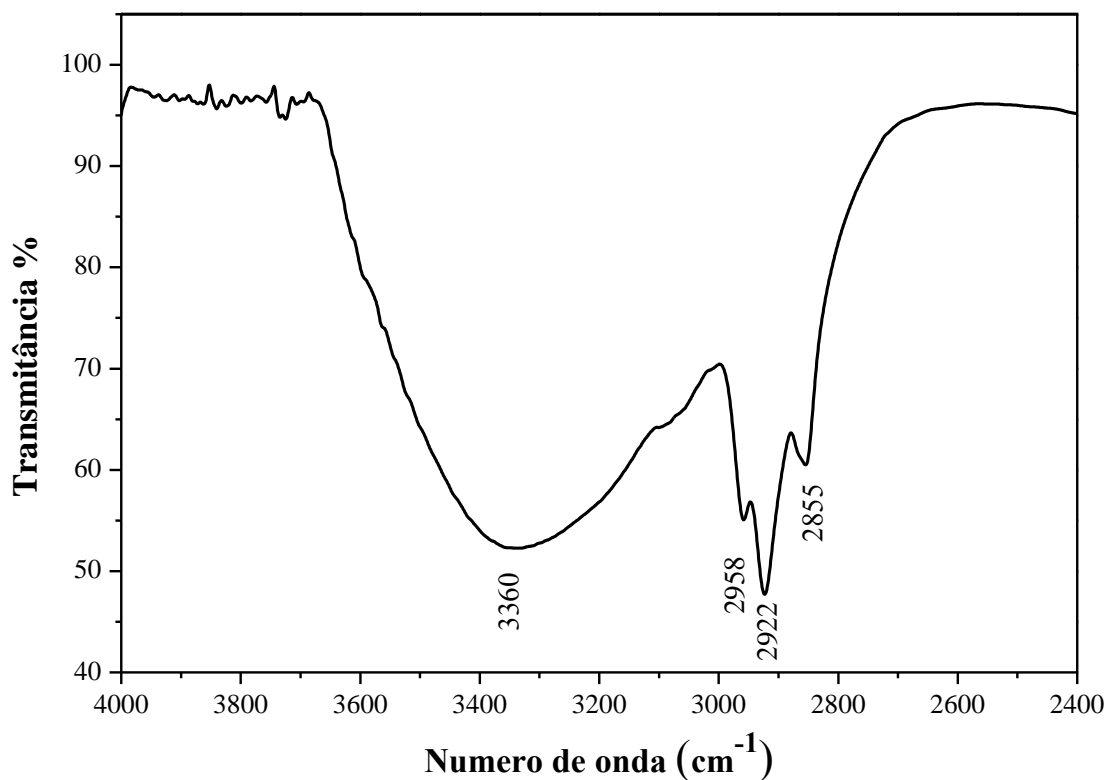
Fonte: [82]

As moléculas absorvem a radiação no infravermelho e podem variar a amplitude de um dos movimentos vibracional ou rotacional; é necessário que ocorra variações no momento de dipolo, que pode ser ocasionado pelo movimento vibracional ou rotacional; apenas nessa situação o campo elétrico alternado da radiação é capaz de interagir com a molécula [82].

O estudo por espectroscopia na região do infravermelho (IR) foi realizado com a finalidade de avaliar a integridade dos ligantes da CCS. Essas observações basearam-se nos modos vibracionais de bandas referentes ao anel porfirínico e interações metal-ligante. Os espectros de infravermelhos podem ser utilizados para obter informações estruturais sobre molécula em estudo [83].

No estudo foram obtidos espectros vibracionais no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} (**Figuras 6 e 7**) da CCS. Os resultados dos espectros de infravermelhos da CCS estão resumidos na **Tabela 3**. Os espectros IR foram divididos em duas regiões: 4000 - 2400 cm^{-1} e 1750 - 400 cm^{-1} .

Figura 6 - Espectro do Infravermelho da CCS na região de 4000 a 2400 cm^{-1} .

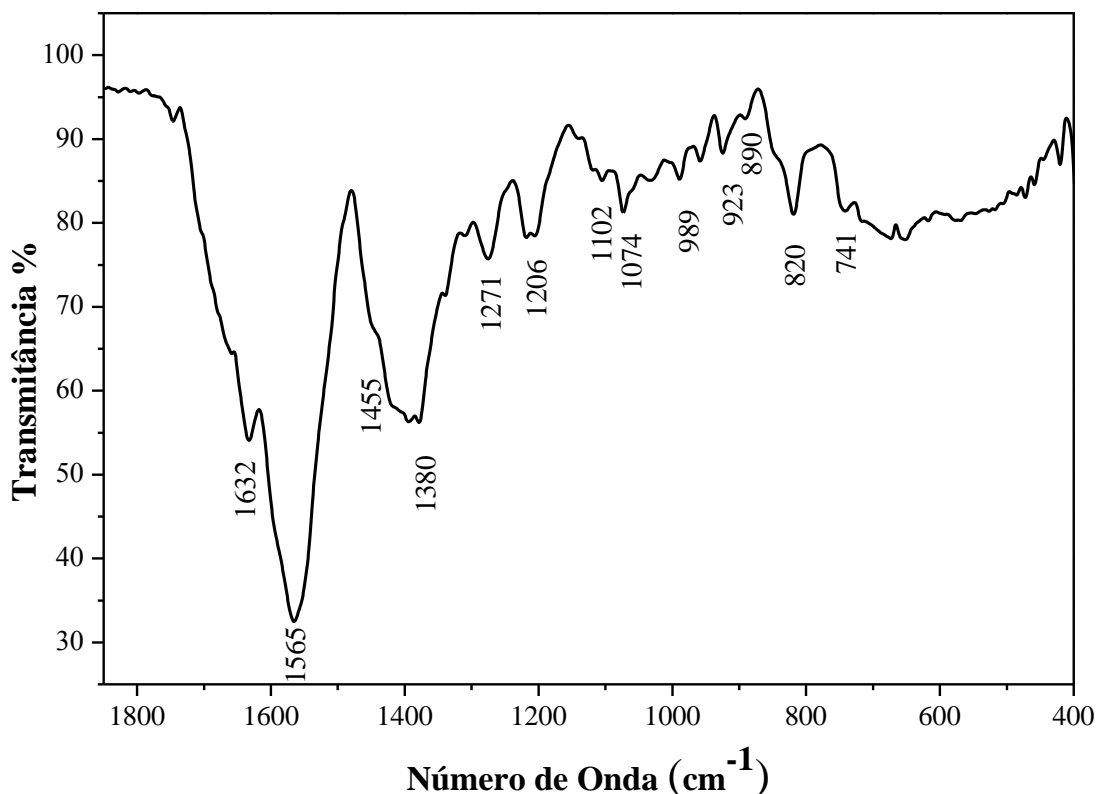


As bandas de absorção encontrada na região de alta frequência do espectro (4000 a 2400 cm^{-1}), como mostrado na **Figura 6** são geralmente associado aos estiramentos das ligações de oxigênio-hidrogênio ν (O-H) e carbono-hidrogênio ν (C-H) [84].

A banda larga em torno de 3360 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação oxigênio-hidrogênio (O-H) da molécula de água, isso se deve a partir de vestígios de água no potássio brometo ou até mesmo na amostra de CCS (**Figura 6**) [85].

A banda de absorção de 2958 – 2855 cm^{-1} é atribuída aos estiramentos assimétrico da ligação carbono-hidrogênio ν (C-H) do grupo metil (CH_3), do grupo etil (CH_2) e do grupo alceno [83, 85].

Figura 7 - Espectro do Infravermelho da CCS na região de 1800 a 400 cm^{-1} .



As bandas de absorção observadas na região de 1750- 1350 cm^{-1} (**Figura 7**) são quatro bandas de absorção. A primeira banda foi atribuída ao estiramento do grupo carbonila (C=O) em torno de 1632 cm^{-1} ; a segunda banda de absorção em 1565 cm^{-1} pode ser atribuída aos estiramentos das ligações carbono-carbono ν (C=C) e ν (C-N); a terceira banda de absorção em 1455 cm^{-1} são atribuída aos estiramentos assimétricos das ligações carbono-hidrogênio ν (C-H) do grupo metil (CH_3) e a quarta banda de absorção em 1380 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos das ligações carbono-nitrogênio ν (C=N) e carbono-carbono ν (C=C) no anel de porfirina [83,85,86].

As bandas de absorção de média intensidade que são observadas em torno de 1074, 989, 741 cm^{-1} são atribuídas das vibrações de deformação fora do plano das ligações carbono-hidrogênio γ (=C-H) da molécula de CCS. [85,86].

A região abaixo 1300 cm^{-1} é conhecida como região da impressão digital (finger print, em inglês), mesmo que não inclua alguns estiramentos vibracionais [84]. A banda de absorção na região de 1300 a 650 cm^{-1} são geralmente, associada a movimentos moleculares que envolvem muitos átomos, relacionados com vibrações das estruturas do centro da porfirina [83]. As bandas de absorção da CCS na região da impressão digital são atribuições

complexas, e somente tentativas podem ser feitas. A banda de 1206 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação carbono-carbono ν (C–C) e banda de absorção á 1074 cm^{-1} é atribuída ao desdobraimento γ (=C-H) na porfirina [83].

As bandas de absorção de intensidade média a 923 e 890 cm^{-1} é atribuída com o estiramento da ligação cobre-nitrogênio ν (Cu–N), indicando a estabilidade do metal coordenado devido forte ligação entre o ion metálico e os quatro átomos circundantes de nitrogênio da porfirina [83].

Tabela 3 - Principais bandas no espectro de Infravermelhos (IR) da CCS.

Amostra	Referencias *	Grupos
3360	3659 – 3200	ν (O-H) estiramento da água
2958 -2855	2970 - 2845	ν (C-H) estiramento assimétrica do grupo metil (CH ₃)
1632	1630	ν (C=O) estiramento da carbonila
1565	1550	ν (C-N) e ν (C=C) estiramento da porfirina
1455	1454	ν (C-H) estiramento assimétrico do grupo metil (CH ₃)
1380	1355	ν (C=C) e ν (C=N) estiramento da porfirina
1206	1225	ν (C-C) estiramento da porfirina
1102	1120	ν (C-O) estiramento do íon carboxilato
1074	1300-1000	γ (=C-H) dobramento fora do plano
989	950	γ (=C-H) dobramento fora do plano
923	900	(Metal-ligante) banda de vibração
890	880	(Metal-ligante) banda de vibração
741	900 – 690 *(83)	γ (=C-H) deformação fora do plano

Legenda: ν = estiramento; δ = deformação angular simétrica no plano; γ = deformação fora do plano. *Fonte: [83,85,86].

5.3 ANÁLISE ELEMENTAR (C, H, N)

A porcentagem relativa dos elementos químicos da amostra de CCS comercial (Sigma-Aldrich, China) foram calculadas considerando a fórmula química $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{CuN}_4\text{Na}_3\text{O}_6$ ($724, 15\text{ g mol}^{-1}$) que consta na embalagem e ficha técnica do produto.

Na **Tabela 4**, são apresentadas estimativas das massas relativas da CCS para os elementos C, H, N, Cu, Na, O e os valores são precedidos da porcentagem de massa relativa teórica, calculadas a partir da fórmula química da embalagem do produto, considerando uma

pureza de 100%, embora amostra seja de grau comercial. Estes valores serviram para comparação das porcentagens relativas dos elementos C, H e N obtidos experimentalmente por AE da CCS.

Tabela 4 - Valores teóricos das massas dos elementos C, H, N, Cu, Na e O em porcentagens relativas da CCS. Os valores foram calculados a partir das informações da embalagem e ficha técnica do produto (Sigma-Aldrich, China).

Massa	C₃₄	H₃₁	Cu	N₄	Na₃	O₆
(g/ mol)	408,36	31,25	63,55	56,02	68,97	96,00
%	56,39	4,31	8,78	7,74	9,52	13,26

*Massa molecular da CCS: $724,15 \text{ g mol}^{-1} = 100 \%$

Na **Tabela 5** são apresentados valores referentes, os resultados da AE dos elementos C, H e N obtidos experimentalmente para a CCS (Sigma-Aldrich, China), fórmula mínima, e parâmetro recomendado U. S. P. [70].

Pode-se observar a partir da **Tabela 5** que a porcentagem (%) de carbono (C) da amostra está de acordo com o valor calculado a partir dos dados constantes na embalagem e ficha técnica considerando uma pureza de 100%.

O valor percentual de hidrogênio (H) encontrada na amostra é maior do que o valor teórico calculado.

A porcentagem de nitrogênio (N) é menor em relação a porcentagem (%) teórica, porém, ainda atende ao parâmetro estabelecido pela U.S.P [70].

As diferenças de valores encontrados de H e N levam a acreditar que a amostra não é pura e que sua classificação é de grau comercial considerando que na literatura a pureza esta no intervalo 70 a 90% [87].

Tabela 5 - Porcentagem (%) relativa dos elementos químicos C, H, e N obtidos pela AE da CCS, considerando a fórmula química teórica e o limite estabelecido pela U. S. P. (2007).

	C%	H%	N%	*O%
Amostra sigma	57,80 ± 0,18	6,38 ± 0,06	4,74 ± 0,03	23,90 ± 0,13
fórmula mínima	56,39	4,31	7,74	13,26
*U.S.P	-	-	> 4,0	-

* Cálculo de (%) relativa de oxigênio foi obtido por estimativa.

*Fonte: [70].

5.4 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

As porcentagens de cobre (Cu) e sódio (Na) presentes na amostra de CCS comercial (Sigma-Aldrich, China) foram determinadas por ICP-OES conforme apresentados na **Tabela 6**, seguida pela porcentagem teórica da fórmula química, os parâmetros fornecidos pelo fabricante e os limites estabelecidos pela U.S.P.

Tabela 6 - Porcentagem dos elementos químicos Cu e Na da CCS, obtidos pela a ICP-OES, fórmula química teórica e o limite estabelecido pela U.S.P.

Elemento Químico	Amostra sigma	Fórmula mínima	Fabricante	*U.S.P
Cu % (ICP- OES)	3,69 ± 0,09	8,78	3,5 – 5,0	> 4,25
Na % (ICP-OES)	3,49 ± 0,31	9,52	5,5 – 6,5	5 – 7

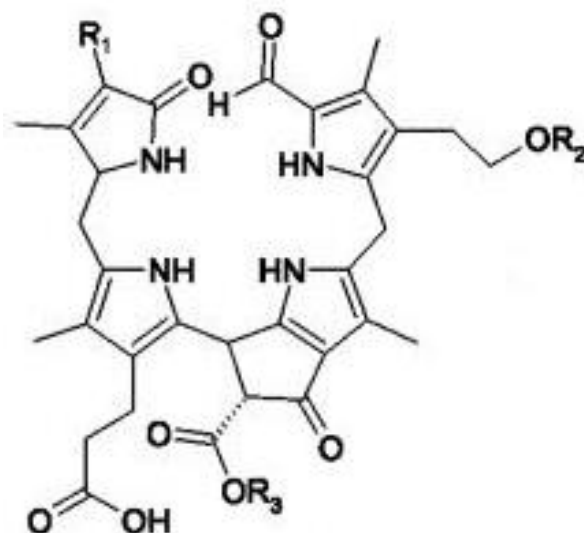
*Fonte: [70].

A porcentagem de Cobre, %Cu, obtida experimentalmente corresponde aproximadamente a 3,69%, esse valor é menor que o valor teórico calculado e, abaixo do limite mínimo estipulado pela U.S.P., dentro do parâmetro da ficha técnica fornecido pelo fabricante de 3,5 a 5,0 % [70]. Valores inferiores ao estipulado pela U.S.P. foram observado por Pratt *et al.* (2006) cuja a porcentagem de Cobre representava 3,69% valor semelhante ao encontrado experimentalmente por ICP-OES. Estes valores diferem a partir da técnica e sensibilidade da técnica [88]. A porcentagem de sódio (Na) é de 3,66 % inferior ao limite entre 5 a 7 % estabelecido pela U.S.P., e de 5,5 a 6,5 % fornecido pelo fabricante e menor que a porcentagem teórica.

A variação observada entre os valores experimentais e teóricos da CCS, possivelmente, ocorre a partir do tipo e fonte de Chl obtida de diferentes variedades de plantas comestíveis, gramíneas, urticáceas e outras e quanto a forma de complexação e/ou neutralização. Os metabólitos ou produto de degradação da molécula de Chl podem resultar na mudança/alteração da composição. Os metabólitos ou produtos de degradação são originados a partir da abertura do anel porfirínico por ação enzimática ou por ações não-enzimática produzindo produtos catabólitos (produtos de degradação) não fluorescentes. Estes produtos do catabolismo de Chl não fluorescentes (**Figura 8**) apresentam o anel tetrapirrólico clivado que não permitiria a entrada do átomo de Cu (II) no centro do anel, conseqüentemente o complexo possuiria menor conteúdo de cobre, Cu (II) em relação ao valor teórico calculado

e/ou ainda pela clivagem que fornece a oxigenação aos catabólitos que são responsáveis pela maior porcentagem de oxigênio na amostra [89].

Figura 8 - Catabólito de Chl não fluorescente.



Fonte: [89]

O valor experimental de sódio encontrado por ICP-OES (3,49 %) leva a acreditar que nem todos os componentes se apresentam na forma de sal sódico, justificando a maior quantidade de H (6,38 %) nos valores experimentais (**Tabela 5**). Portanto, pode-se considerar que a fórmula geral teórica da CCS não se aplica à amostra estudada.

5.5 AVALIAÇÃO DA PUREZA DAS AMOSTRAS DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

A pureza da CCS (Sigma-Aldrich, China) foi obtida por meio dos resultados das análises de ICP-OES, AE e espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, considerando a literatura que correlaciona a %Cu, relação de Cu/N, os espectros de absorção das bandas Soret e Q (razão Soret/Q) com a pureza da CCS [61,70–72,90,91].

A partir dos resultados da AE e por ICP-OES, foram obtidas as porcentagens de %Cu e %N (**Tabela 6** e **Tabela 5**). Os valores experimentais de cobre (Cu) e nitrogênio (N) encontrados foram utilizados para determinar as porcentagens de derivados não-cúpricos presentes na amostra e a pureza da CCS, a quantidade de derivados não-cúpricos e a

porcentagem de Cu e a pureza da CCS conforme metodologia encontrado na literatura e protocolo U.S.P. [69–72].

Na **Tabela 7** é apresentada a porcentagem de cobre (Cu) e a sua relação com % pureza da amostra de CCS obtida através da **Equação 4**, e a razão de Cu/N foram calculados utilizando os valores experimentais da porcentagem de massa de Cu e N obtidas através do ICP-OES e AE e a relação com % derivados não cúpricos que estão presente na amostra que foram obtidos através da **Equação 5**. O valor teórico da razão da porcentagem de Cu/N é de 1,13 e a amostra de CCS apresentou valor de 0,78 abaixo do esperado, que corresponde a 29,3% de derivados não cúpricos presentes.

Os valores encontrados são valores próximos da literatura. O valor encontrado para a CCS foi de 70,90% de compostos cúpricos. Em relação ao valor experimental da porcentagem de Cu foi obtido uma pureza de 40,27%, aproximadamente a metade do valor da pureza teórica (70 %).

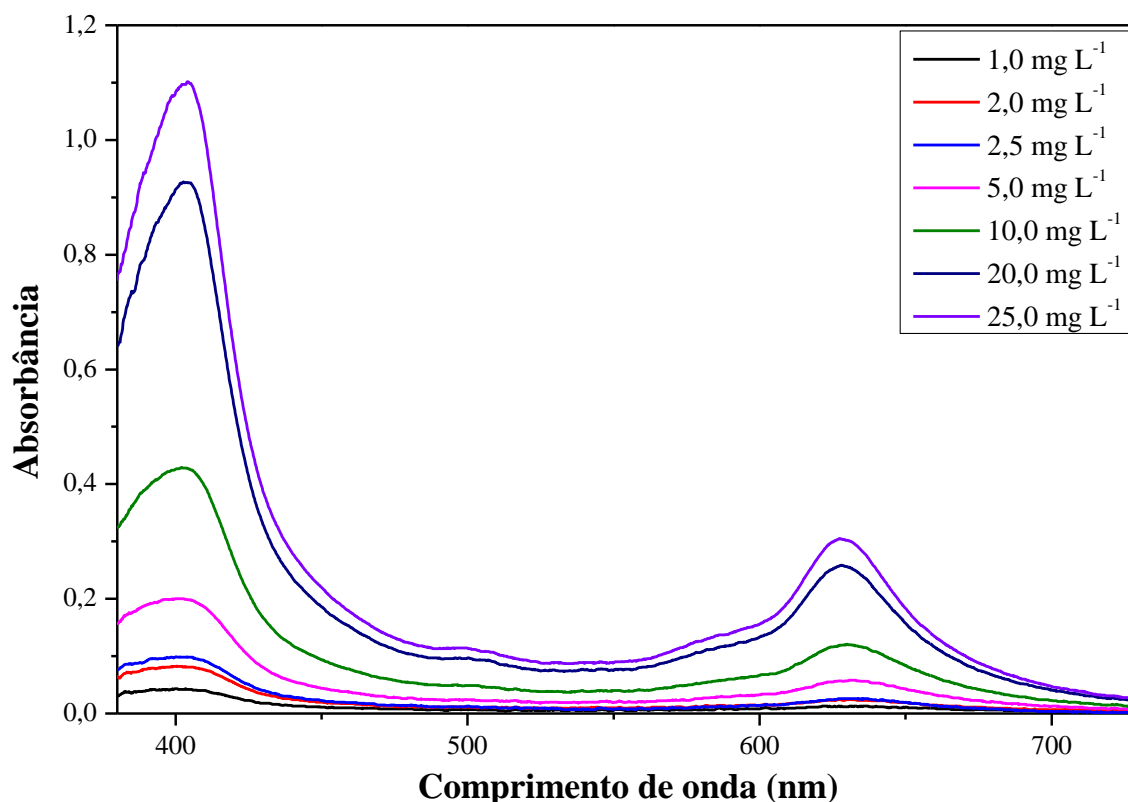
Tabela 7 - Apresenta-se a %Cu e a relação com %pureza, e a razão Cu/N e a sua relação com % derivados não cúpricos, calculada a partir dos valores experimentais, com base na **Figura 5**.

CCS	Cu%	%Pureza	Razão Cu/N	% derivados não cúpricos
Amostra sigma	3,69 ± 0,09	40,17	0,78 ± 0,02	29,10
Teórico	8,78	~ 70	1,13	100*

*compostos totalmente cupro-complexados.

A pureza da amostra de CCS foi determinada por meio da análise da razão entre os espectros de absorção das bandas Soret e Q conforme protocolo da U.S.P. [70]. Após a análise dos espectros de absorção das soluções de CCS com diferentes concentrações no intervalo de 1 a 25 mg L⁻¹ (ppm) conforme a **Figura 9**.

Figura 9 - Espectros de absorção de CCS no comprimento de onda de 380 a 780 nm.



Os espectros de absorção obtidos foram similares aos descritos na literatura para a CCS, com absorbância característica em 402 nm e 627 nm [92]. Foram utilizados os valores de absorbância das seis concentrações de CCS para cálculo da razão da banda de Soret/banda Q (**Tabela 8**), o valor da concentração de 25 mg L⁻¹ (ppm) foi descartado devido não obedecer a lei de Beer (faixa linear da curva de calibração), apresentou absorbância maior de 1,0 na banda de maior intensidade de 402 nm. O valor médio da razão Soret/Q da amostra de CCS foi de 3,514 e, dentro do parâmetro de qualidade estabelecidos pela *U.S.P* (3,0 a 3,9) [70]. Portanto, o resultado está dentro dos parâmetros de qualidade da Farmacopeia Americana, USP.

Tabela 8 - Valores das absorvâncias das bandas Soret e Q de soluções de CCS o em tampão fosfato pH 7,5 em diferentes concentrações no intervalo de 1,0 a 20 mg L⁻¹.

[amostras] mg L ⁻¹	A _{soret}	A _Q	Razão A _{soret} /A _Q
1,0	0,042	0,013	3,230
2,0	0,081	0,024	3,375
2,5	0,098	0,026	3,769
5,0	0,200	0,057	3,508
10,0	0,428	0,119	3,597
20,0	0,927	0,257	3,607

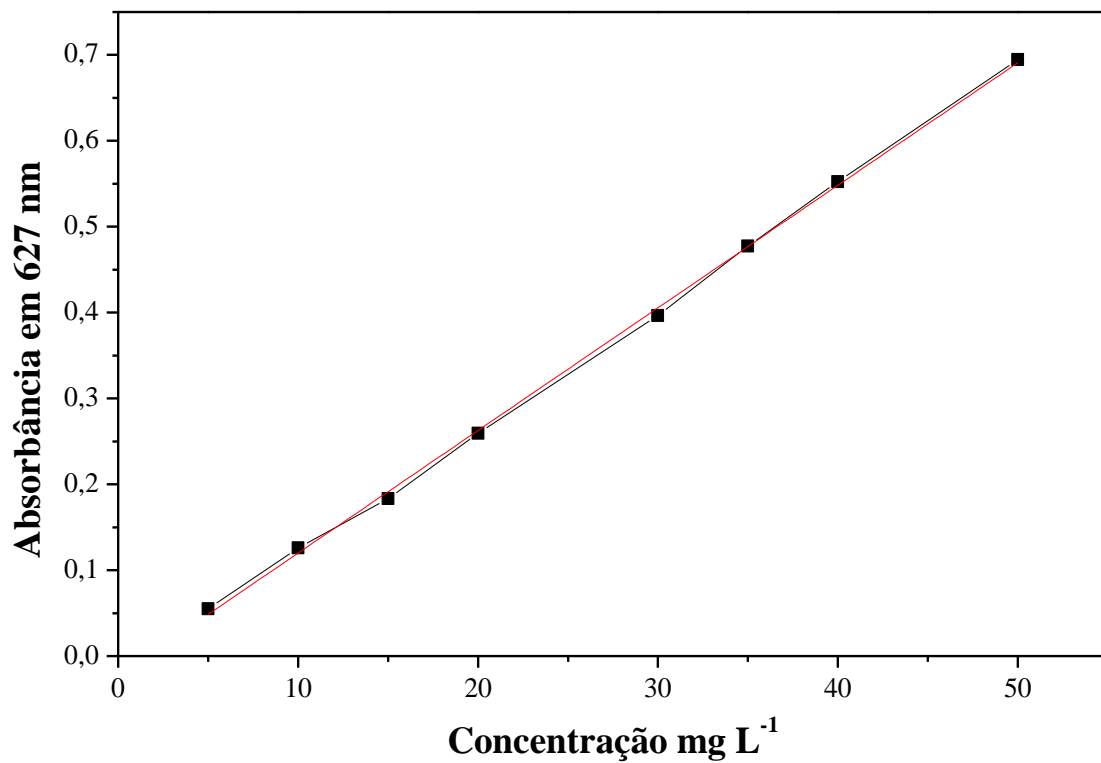
*Média da Razão A_{soret}/A_Q encontrado foi 3,514.

5.6 FOTODEGRADAÇÃO DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO UTILIZANDO LUZ SOLAR SIMULADA

A concentração da amostra a ser degradada é um fator importante que influencia o processo de fotodegradação e fototoxicidade a partir da integridade molecular do complexo metálico, CCS [93,94]. Por isso, foi conduzido um estudo da fotodegradação da molécula CCS utilizando uma fonte que simule o espectro solar incidente sobre a amostra da CCS em diferentes concentrações entre 5 e 50 mg L⁻¹. Este ensaio é importante para simular o comportamento da CCS no ambiente natural irradiado, apesar da maioria dos criadouros estarem em locais sombreados e sem a incidência direta da luz solar, apenas luz difusa incide sobre os criadouros. Os resultados da fotodegradação da CCS referente a um período de irradiação de 180 minutos foram analisados por UV-Vis, os resultados obtidos da concentração de CCS durante o período de fotodegradação da amostra foram calculados utilizando a **Equação 12**, que foi determinada através da curva de calibração ilustrada na **Figura 10**.

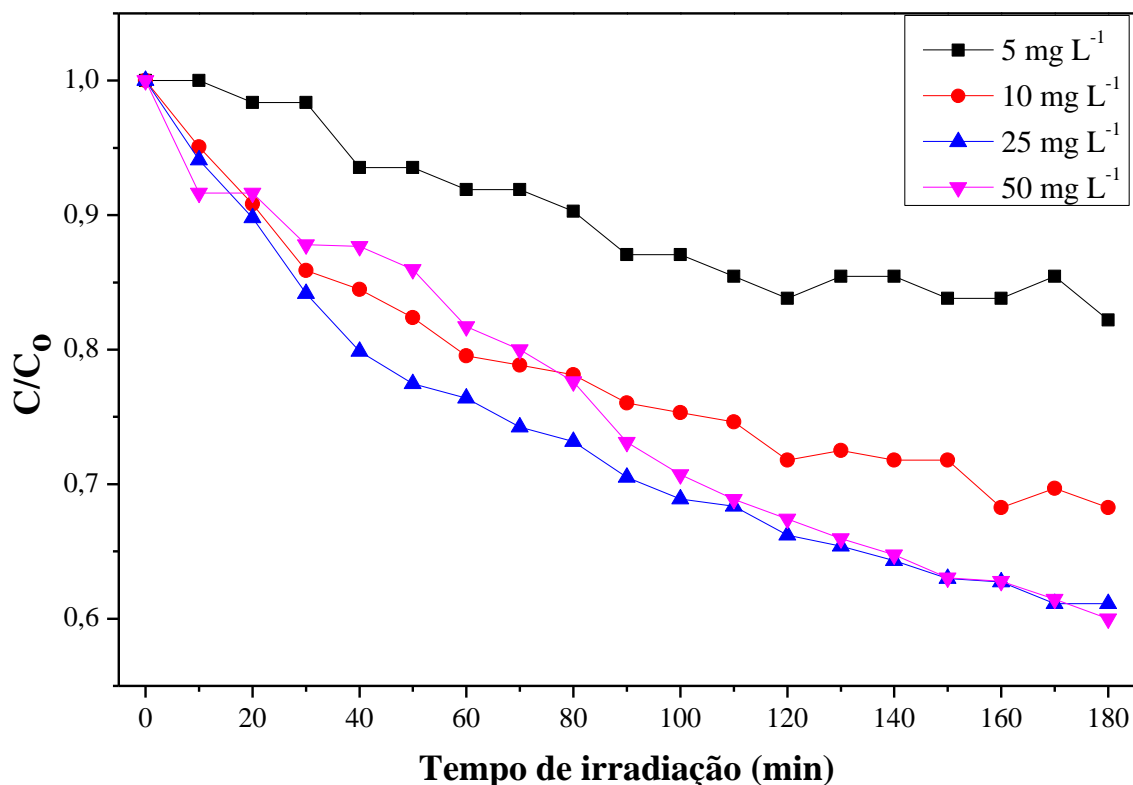
$$\text{Abs} = - 0,0228 + 0,0143 [\text{CCS}] \quad (\text{R-Square} = 0,9991) \quad (12)$$

Figura 10 – Curva de calibração obtida para CCS no comprimento de onda em 627 nm.



Na **Figura 11** são apresentados os resultados da fotodegradação com a incidência de luz solar simulada realizada no período de 180 minutos sobre amostras de CCS (Sigma-Aldrich, China) de concentração de 5, 10, 25 e 50 mg L⁻¹. Os resultados estão expressos em porcentagem relativa (%) da concentração das amostras de CCS.

Figura 11 - Degradação da CCS a várias concentrações realizadas sob luz solar simulada.



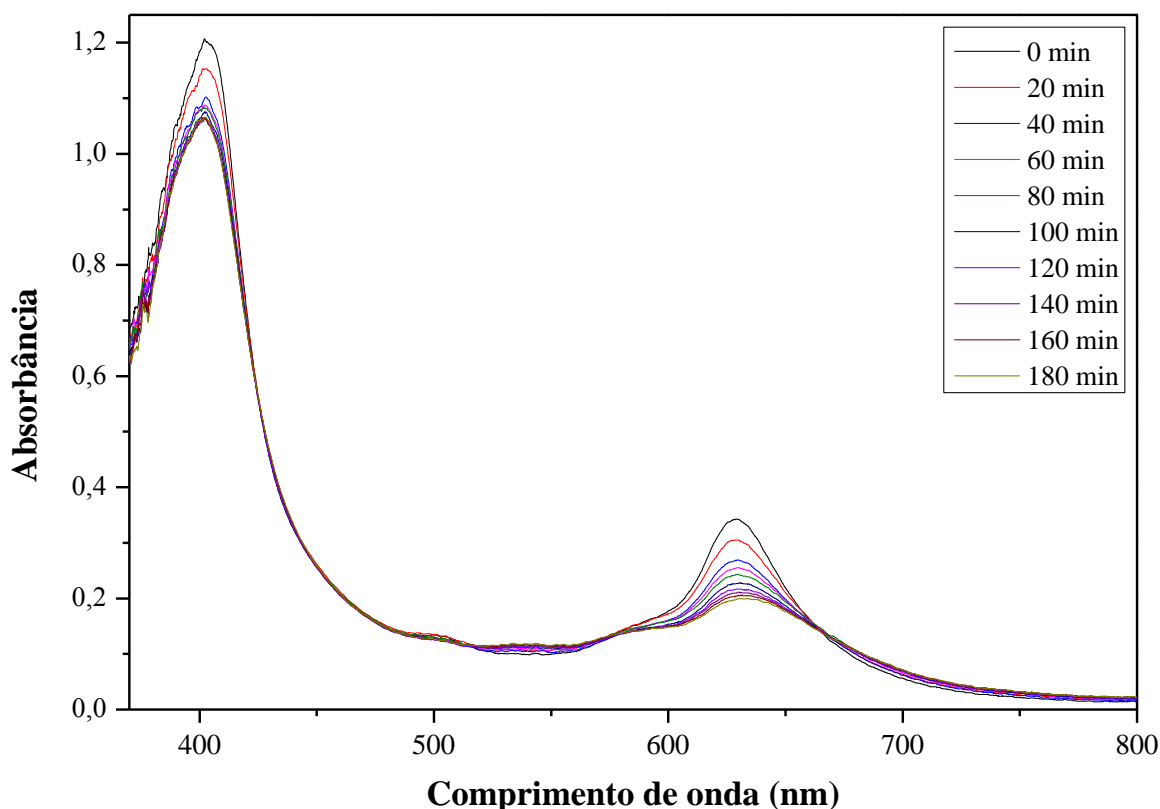
Na simulação da degradação por luz solar utilizou uma intensidade de irradiação de 100.000 lux (100 w m⁻²) equivalente ao sol do meio dia. É importante lembrar que a lâmpada de Xe apresenta majoritariamente irradiação na faixa do visível (VIS.), semelhante à irradiação solar.

Os resultados mostraram que as soluções de maiores concentrações de 25 e 50 mg L⁻¹, apresentaram a maior degradação relativa a concentração inicial durante a exposição de irradiação de 180 minutos respectivamente de 38,89% e 40,01%, a concentração de 5 mg L⁻¹ apresentou a menor degradação de 17,8%. Este fato mostra que a degradação é dependente do tempo de exposição á irradiação solar e à concentração do fotossensibilizador. Os valores da degradação das soluções de 25 e 50 mg L⁻¹ foram muito próximos; valores que podem estar associada a margem de erro dos experimentos. Essa pequena diferença de eficiência na fotodegradação das soluções de maiores concentrações se deve à alta saturação na coloração na solução, fazendo que os fótons incidentes não consigam uma boa penetração na solução, é possível, que interações ocorram entre as moléculas devido a concentração, alterando o padrão molecular de absorção, estabilidade e degradação, possivelmente, por maior concentração de moléculas e curtas distâncias das espécies radicais e/ou oxidantes para a ocorrência da degradação fotoinduzida.

Desse modo, pode-se escolher a solução de CCS de concentração de 25 mg L^{-1} ou intervalo adequado para estudos de fotossensibilização nos bioensaios de toxicidade irradiado e não irradiado.

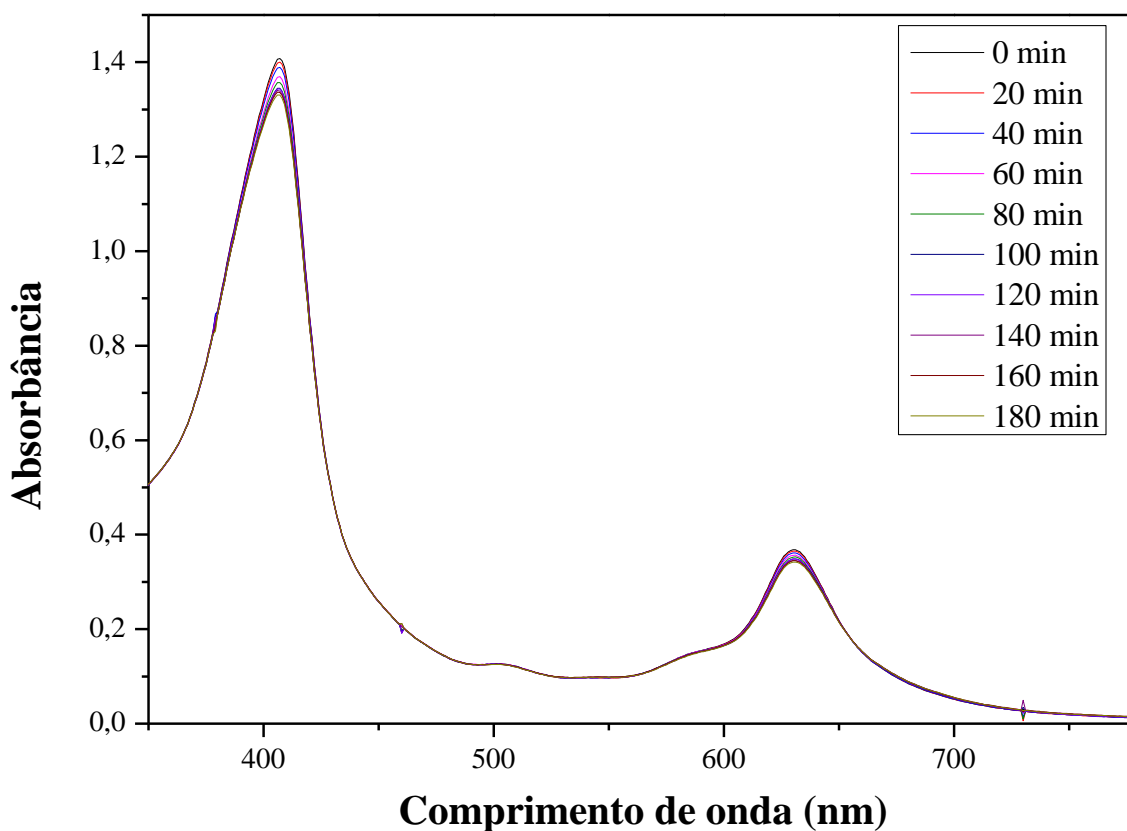
A análise dos espectros de absorção ótica na região do UV-Vis da solução de CCS de concentração de 25 mg L^{-1} durante o experimento de fotodegradação, observou-se que não surgiu novas bandas de absorção durante e após a fotodegradação, apenas diminuição da absorção das bandas de Soret e Q, devido a degradação dos grupos cromóforos conforme **Figura 12**. Nessa técnica não foi possível observar formações de novos grupos cromóforos durante e após a degradação.

Figura 12 - Espectros de absorção da solução de CCS concentração de 25 mg L^{-1} , durante e após fotodegradação.



Na **Figura 13**, pode observar-se que a CCS de concentração de 25 mg L^{-1} sem exposição a irradiação solar, foi analisada em período semelhante a CCS exposta a irradiação do simulador solar durante 180 minutos no escuro que não sofreu degradação fotoinduzida, o perfil de absorbância não apresentou grandes variações nas bandas de absorção de Soret e Q. Pode-se perceber que a CCS apresenta comportamento diferente com e sem exposição solar.

Figura 13 - Espectros de absorção da solução de CCS concentração de 25 mg L⁻¹, sem exposição a irradiação solar.



5.7 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO EM *ALLIUM CEPA*

O ensaio com *Allium cepa* avalia os efeitos tóxicos e citotóxicos da CCS sobre a germinação, crescimento das raízes e índice mitótico, sendo que esses processos podem apresentar sensibilidades distintas a um composto em diferentes concentrações.

Os dados de germinação apresentados na **Tabela 9** evidenciam que os tratamentos não inibiram a germinação, tendo a porcentagem de germinação relativa da semente (%GRS) de 128,57 diferido significativamente ($p < 0,05$) do controle negativo no tratamento a 100 mg L⁻¹. Este resultado mostra que houve potencialização/aumento da germinação das sementes quando expostas a esta concentração de CCS. Este fato não ocorreu com concentrações inferiores ou superiores, este resultado mostra/sugere que em determinadas concentrações a CCS pode realizar, possivelmente, um estímulo ou uma reação de estresse oxidativo “controlada” para um estímulo à germinação da planta ou ao metabolismo vegetal.

Quanto ao crescimento das radículas, os valores de crescimento médio relativo da raiz (CRR) evidenciaram que os tratamentos não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) no crescimento das radículas. O Índice de Germinação (IG), que correlaciona a germinação com o crescimento das raízes, indicou que não houve efeito tóxico capaz de alterar significativamente o metabolismo das sementes.

Quanto ao índice mitótico (IM), verificou-se um aumento significativo das células em mitose em todas as concentrações testadas relativamente ao controle negativo (CN), revelando que os tratamentos não apresentaram citotoxicidade para as sementes de *A. cepa*, tendo a CCS potencializado/estimulado a divisão celular.

Tabela 9 - Avaliação da toxicidade e citotoxicidade da CCS pelo teste em *Allium cepa*.

Tratamento (mg L ⁻¹)	% GRS	CRR (%)	IG (%)	IM (%)
50	85,71	83,22	71,33	74,43±12,20 ^a
100	128,57	85,15	109,48	72,98±12,48 ^a
200	75,00	88,58	66,43	80,91±4,81 ^a
CN	100,00	100,00	100,00	43,40±12,04 ^a

CN: Controle negativo; GRS: germinação relativa da semente; CRR: crescimento médio relativo da raiz; IG: índice de germinação; IM: índice mitótico. ^a Médias entre as mesmas concentrações não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Os efeitos genotóxicos dos tratamentos foram avaliados recorrendo à análise da frequência de alterações cromossômicas encontradas nas células do meristema das raízes de *A. cepa*, sendo elas anáfases multipolares, C-metáfase, poliploidia, aderências, perdas e pontes cromossômicas. Assim, de acordo com o exposto na **Tabela 10**, as diferenças no índice de alterações cromossômicas (IAC), entre cada concentração e o controle, e entre as concentrações, não foram significativas ($p > 0,05$), pelo que não foi observada genotoxicidade.

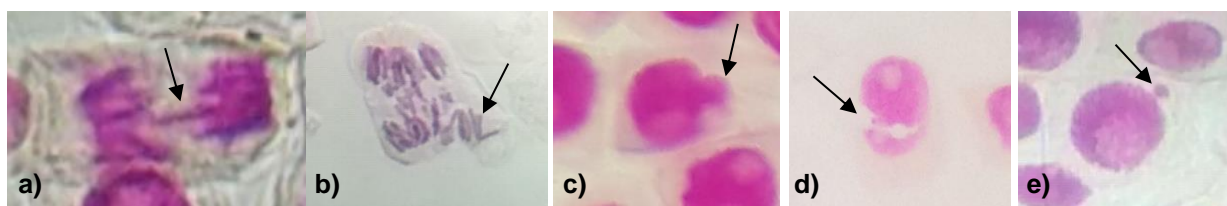
Tabela 10 - Avaliação da genotoxicidade (IAC) e mutagenicidade (IMT) da CCS pelo teste em *Allium cepa*.

Tratamento (mg L ⁻¹)	IAC (%)	IMT (%)
50	0,20±0,10 ^b	0,00±0,04 ^b
100	0,00±0,12 ^b	0,00±0,20 ^b
200	0,00±0,13 ^b	0,00±0,12 ^b
CN	0,35±0,41	0,00±0,00

CN: Controle negativo; IAC: Índice de alterações cromossômicas; IMT: Índice de micronúcleos. Significância de ^b $P > 0,05$ em relação ao CN e entre as concentrações.

As mutações podem ser observadas através da formação de micronúcleos (**Figura 14**). Estes são pequenos núcleos individuais com DNA no seu interior, localizados próximo ao núcleo normal das células em divisão, como resultado de quebras cromossômicas. Os fragmentos ou sequências de cromossomos nos micronúcleos não se prendem ao fuso mitótico e, assim, não alcançam os pólos das células durante os processos de mitose ou meiose [95]. De acordo com os valores do índice de micronúcleo apresentados na **Tabela 10**, observou-se que não houve significância estatística entre as frequências analisadas ($p > 0,05$), não existindo, deste modo, diferença significativa entre as médias dos micronúcleos encontrados nos tratamentos testados e no controle negativo, bem como entre tratamentos, pelo que não houve evidência de mutagenicidade da planta ao CCS.

Figura 14 - Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao tratamento com alterações cromossômicas: a) ponte cromossômica; alterações celulares: b) quebra e perda cromossômica; c) brotamento nuclear; d) núcleo lobulado; e) micronúcleo.



O IG, IM, IAC e IMT determinados utilizando *A. cepa* como organismo teste, mostraram-se eficientes para a avaliação do potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico da CCS.

A CCS potencializou a germinação na concentração de 100 mg L^{-1} e a divisão celular em todas as concentrações, não apresentando toxicidade e citotoxicidade para as sementes em qualquer concentração testada. As diferenças entre as médias de alterações cromossômicas e micronúcleos observadas são devidas à variabilidade amostral, tendo ocorrido ao acaso e, portanto, não existem indícios de genotoxicidade e mutagenicidade ao CCS. Diante do exposto, conclui-se que a CCS não apresentou potencial fitotóxico em *A. cepa* nas condições testadas.

5.8 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

A solução foi mantida em recipiente envolto com papel alumínio impedindo a ação da luz sobre a CCS (para evitar degradação fotoquímica). Assim, para todos os períodos de exposição da larva de *A. aegypti* à solução de CCS em ausência de luz pode-se observar que não houve mortalidade, uma vez que o efeito de danos ao organismo e mortalidade larval dá-se pela exposição das larvas, em solução, sob irradiação a depender da potência utilizada e/ou tempo de exposição (luz natural ou artificial).

A internalização da solução de CCS no organismo do inseto alvo, pode variar entre a população de larvas. Pode-se observar que enquanto uma larva ingere grande quantidade de solução, outra pode ingerir uma quantidade menor. Esta ingestão de forma diferenciada de CCS pode resultar em diferenças significativas na ingestão e saturação no organismo/metabolismo das larvas de *A. aegypti*. Porém, este fato pode ser contornado a partir da saturação por utilização de um tempo adequado de exposição ou tempo de internalização (TI) ao CCS. Este tempo é importante para não haja influencia na taxa de mortalidade a partir de ingestão e/ou saturação do organismo do fotossensibilizador. Pois, as larvas de *A. aegypti* devem possuir saturação do fotossensibilizador e permanecerem expostas durante um tempo suficiente para realizar a ingestão e excreção do CCS, saturando o sistema digestório para então receber irradiação e sofrer o efeito tóxico por radicais livres e espécies oxidantes após a irradiação.

A partir de experimentos de ingestão e excreção foi possível realizar o experimento para determinar os tempos de transito (TT) e internalização (TI) do CCS. A partir das imagens foi possível mostrar em qual porção do sistema digestório e/ou em qual período haverá maior efeito de mortalidade após o processo de irradiação por luz. Estas respostas foram confirmadas após a realização dos bioensaios de toxicidade irradiada e análise da mortalidade larval.

As imagens foram realizadas com as larvas de *A. aegypti* que haviam ingerido maior quantidade da solução de clorofilina em uma solução concentrada de CCS a 100 mg L^{-1} (100 ppm). As imagens mostradas na **Figura 15, 16 e 17** mostram os períodos de contato e/ou ingestão de 5, 20 e 60 minutos. Os resultados mostraram que seria desnecessário mostrar imagens para os períodos posteriores á 60 min, uma vez que a solução havia sido carreada por todo o sistema digestório das larvas de *A. aegypti* e estava em vias de excreção.

A estrutura anatômica das larvas de *A. aegypti* consiste em cabeça, tórax e abdômen, sendo o abdômen formado por oito segmentos e a constituição do sistema digestório pode ter afinidade por diferentes classes de corantes a partir dos grupos e/ou cargas superficiais [96,97]. Após 5 minutos de exposição é possível observar que a solução de CCS foi ingerida e/ou internalizada estando disposta/localizada na região do tórax onde está localizado o ceco gástrico, conforme ilustrado na **Figura 15**:

Figura 15 - Tempo de internalização de CCS a 100 mg L^{-1} , por larvas de *Aedes aegypti* após 5 min de exposição. A seta indica a localização da solução.



Autor: Isaías Cabrini.

Após 20 minutos, observou-se que a solução de CCS está na região do abdômen, mais precisamente no intestino médio (mesêntero), como ilustrado na **Figura 16**:

Figura 16 - Tempo de internalização da CCS a 100 mg L^{-1} , por larvas de *Aedes aegypti* após 20 min de exposição. A seta indica a localização da solução.



Autor: Isaías Cabrini

Aos 60 minutos, todo o sistema digestório está preenchido pela solução de CCS, sendo possível notar, na **Figura 17**, que a solução está sendo excretada, após o preenchimento de todo o sistema digestório.

Figura 17 - Tempo de internalização da CCS a 100 mg L^{-1} , por larvas de *Aedes aegypti* após 60 min de exposição. A seta indica o lóbulo anal próximo ao sifão respiratório e a solução sendo excretada, após a saturação do sistema digestório.



Autor Isaiás Cabrini

O intestino médio da larva de *A. aegypti* consiste em um tubo com uma camada única composta por células colunares que possuem microvilosidades e abundância de mitocôndrias [98], além de um gradiente de pH de 5 a 10/11 [98,99].

No processo de ingestão da CCS deve-se considerar a matriz peritrófica (MP). A maioria dos insetos possuem matriz peritrófica que é um filme composto de quitina e proteínas (peritrofinas), que tem por função separar o alimento do epitélio do intestino médio. A MP protege de danos o epitélio de microrganismos, abrasão e outros, e além disso possui/promove outras funções como a compartimentalização de enzimas, para o aumento da eficiência digestiva por diminuição da taxa de excreção das enzimas e por via de outros mecanismos envolvidos.

A MP é corada pela CCS durante o trânsito da substância no sistema digestório do inseto. Dessa forma, as imagens mostram que a CCS corou a MP e manteve sua coloração verde escuro no intestino da larva. Ainda, durante o tempo de trânsito, ocorre agregação molecular e a saturação/impregnação do sistema digestório, o que impõe certa dificuldade para o deslocamento da substância, possivelmente pela capacidade de partição e/ou interação

com as membranas biológicas favorecida pelo gradiente de pH de ácido a básico (pH 5 a 11). Esse retardamento do deslocamento da CCS favorece a ação tóxica no sistema digestório da larva quando posteriormente irradiado.

O intestino médio (mesêntero), na fase larval, é ser alcalino, apesar de estar relacionado com as condições do microambiente/estruturas formado no lúmen pelo bolo alimentar e pelo corante de ingestão [98,99,100]. Os resultados de mortalidade das larvas demonstram que em pH alcalino de 8-10 a CCS irradiada causa toxicidade para as larvas.

O tempo de internalização (TI) com ausência de luz é importante para a estabilidade da CCS e acúmulo/adsorção no bolo alimentar no sistema digestório das larvas, pois no momento da irradiação as larvas e as células terão recebido a substância, e desse modo a luz irradiada poderia proporcionar o efeito fototóxico. Considera-se que o tempo de contato das larvas com a clorofilina para o CFD (TT) deve ser no mínimo de 60 min., sendo este tempo suficiente para a internalização da CCS por todo o sistema digestório. Pode-se também definir para experimentos que o tempo de internalização (TI), seja no mínimo, 120 minutos ou 2 x TT. Os bioensaios de toxicidade irradiados por luz natural (solar) ou artificial (LED) responderam por meio do tempo de mortalidade e dos diferentes períodos, onde a CCS afetou a larva de *A. aegypti* causando sua mortalidade após a irradiação.

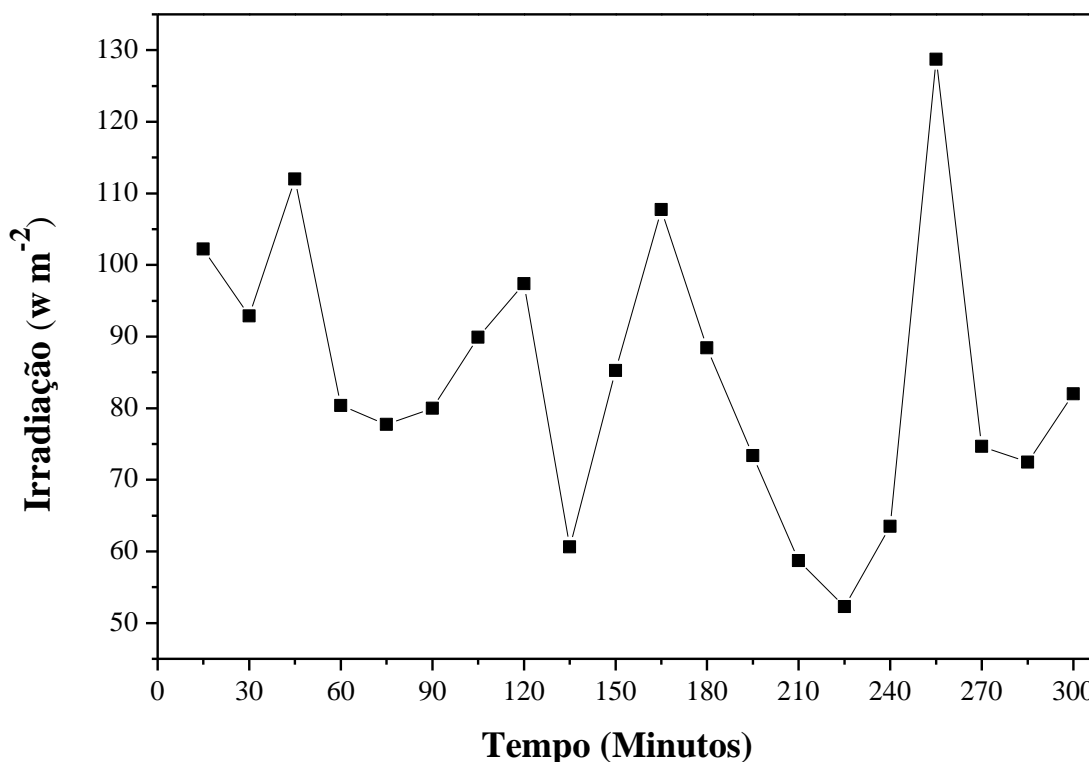
5.9 AÇÃO FOTODINÂMICA ‘IN VIVO’ SOBRE LARVAS DE 3º /4º ESTÁDIO (L3/L4) DE *Aedes aegypti* (ROCKFELLER)

5.9.1 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* COM EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO SOLAR

A irradiação solar é constituída por diferentes comprimentos de ondas sendo infravermelho, ultravioleta e a luz visível, o de interesse na TFD é a luz visível (Vis). A radiação solar média recebida sobre a terra como insolação solar é de 342 W m⁻².

Esta energia, apesar de variável, ao longo do dia (**Figura 18**) pode ser utilizada para fotossensibilizar e/ou induzir reações químicas ou metabólicas. Os resultados experimentais mostraram que a CCS pode ser utilizada como FS por apresentar atividades fotodinâmicas “*in situ*” causando a morte de larvas de 3º e 4º estádios (L3/L4) de *A. aegypti* em intervalo de intensidade luminosa de 52,27 W m⁻² (35.700 lux) a 128,7 W m⁻² (87.900 lux) conforme mostra a **Figura 18**.

Figura 18 - Intensidade de luz solar direta (natural) durante realização dos bioensaios de toxicidade.



Para garantir a ingestão e saturação do sistema digestório de forma homogênea de CCS pelas larvas de *A. aegypti* foi adotado que o tempo de internalização fosse 2 x TT, ou seja 120 min.. Este foi o tempo de internalização (TI) utilizado no bioensaio de toxicidade.

Na **Tabela 11** está demonstrado a mortalidade de larvas em concentrações entre 15 mg L⁻¹ e 35 mg L⁻¹ (ppm). O tempo limite de leitura de mortalidade foi de 5 h, pois após esse período a mortalidade se estabilizou, não havendo acréscimo acentuado no número de larvas mortas. Desse modo, definiu-se que o bioensaio se encerrará após 5 h de exposição das larvas a CCS.

Tabela 11 - Média de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas a CCS e irradiação solar média para diferentes períodos de leitura.

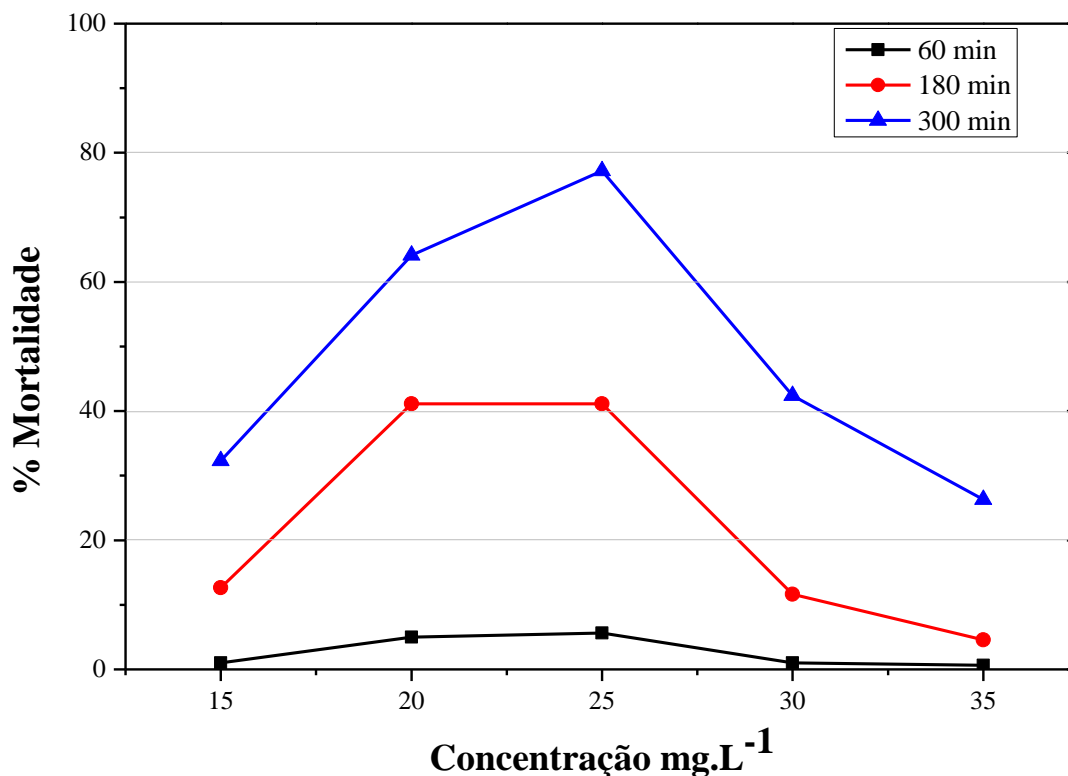
	Concentração (mg mL ⁻¹)					Irradiação	
	15	20	25	30	35	(lux . 10 ²)	(W/m ⁻²)
60 min	0,25±0,00	1,25±0,50	1,41±0,87	0,25±0,43	0,16±0,28	549,0±51,0	80,32±7,46
180 min	3,16±0,52	10,28±4,90	10,28±5,02	2,91±0,28	1,14±0,76	604,0±4,0	88,43±0,58
300 min	8,08±3,37	16,03±4,65	19,30±2,00	10,60±1,15	6,58±1,04	560,0±220,0	81,99±32,21

Observa-se que a mortalidade é dependente da concentração. No entanto, a relação se limita a 25 mg mL^{-1} pois nas concentrações maiores a mortalidade diminui. Isso se dá pelo fato da coloração da concentração ser mais escura, nas concentrações maiores (interação/agregação das moléculas de CCS), o que diminui a penetração luminosa na amostra e a CCS não é fotossensibilizada, não causando, conseqüentemente, mortalidade nas larvas, mesmo que tenham ingerido o FS e saturando seu metabolismo de CCS [59,81].

A exposição das larvas a incidência solar ocorreu no período do dia compreendido entre 9 h e 15 h. A mortalidade não tem relação com a incidência solar no momento da leitura de mortalidade, pois na **Tabela 11** está demonstrado que a irradiação estava maior em 180 min. de exposição e ainda a mortalidade não havia atingido seu limite maior. Desse modo, entende-se que a toxicidade ocorre de modo gradativo, e possivelmente continuado, não sendo possível determinar o momento inicial e final em que a larva realmente está sofrendo o efeito fototóxico da CCS. Uma larva pode ter ingerido a CCS nos 120 min. iniciais sem irradiação solar e durante o período de 5 h de exposição a luz solar, estar sofrendo o efeito fototóxico continuado com danos celulares até a sua morte.

Considerando os resultados da **Tabela 11** elaborou-se um gráfico com a finalidade de visualização da taxa de mortalidade das larvas de *A. aegypti* durante este experimento, conforme a **Figura 19**. A porcentagem de mortalidade foi satisfatória na concentração de 25 mg L^{-1} e apresentou a maior taxa de mortalidade (77,2 %) após 300 minutos de exposição a irradiação solar (**Figura 19**). É possível ainda observar que no tempo de 120 minutos a porcentagem de mortalidade não alterou nas concentrações de 20 mg L^{-1} e 25 mg L^{-1} .

Figura 19 - Porcentagem média de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas CCS e a irradiação solar direta.



Na **Tabela 12** estão demonstradas as concentrações letais medianas (CL_{50}) para 180 min. e 300 min. de exposição das larvas de *A. aegypti* em CCS sob irradiação solar direta. Conforme os resultados de mortalidade demonstraram 5 h (300 min.) (**Tabela 11**) é o tempo limite para determinação de mortalidade e também esse é período onde ocorreu o menor valor de CL_{50} . Em comparação ao inseticida organofosforado sintético temefós cuja concentração diagnóstico é de 0,012 mg L⁻¹ (concentração diagnóstico é 3 vezes maior que a CL_{99}) as CL_{50} aqui obtidas ainda são altas comparativamente. Porém, destaca-se que a CCS age, preferencialmente no sistema digestório como *Bti* (enquanto, organofosforados agem no sistema nervoso) [100,101] do inseto, sendo a ação mais demorada e exigindo maior concentração de produto, pois o produto tem que ser absorvido pela célula, saturada e fotossensibilizada para então causar algum efeito tóxico nas larva *A. aegypti*.

Esta técnica para o Controle Fotodinâmico (CFD) pode ser útil para controle de insetos adultos (alados), mas não de larvas ou pupa, uma vez que os criadouros são sombreados, e não recebem irradiação solar. Entretanto, o inseto adulto (alado) deve realizar alimentação e neste processo sofrer irradiação solar natural para a realização das reações e produção de espécies radicais e/ou oxidantes para causar danos e a sua morte.

Tabela 12 - Concentração Letal Mediana (CL₅₀) para larvas de *Aedes aegypti* submetidas a tratamento com CCS sob irradiação solar.

Minutos	CL ₅₀ (IC _{0,05})	b±EP	χ^2	G1
180	27,371 (19,961 – 22,781)	1,058±0,542	0,342	1
300	17,973 (16,635 – 19,132)	-1,916±0,641	0,217	1

A técnica de CFD se baseia na interação do FS com a fonte de luz, sendo que, quanto maior a concentração de radiação, mais fótons são espalhados/absorvidos na solução. Desse modo a luz não pode penetrar nas larvas e/ou sítios de acúmulo de FS por impregnação nas células e tecido do organismo e causar danos celulares.

Os danos induzidos a larva e/ou seu metabolismo deve ser interno e não pelo corante disperso na solução que também pode absorver luz/radiação e até degradar.

Este fato sugere que os fotossensibilizadores devem estar impregnados/absorvidos nas células do inseto e/ou no metabolismo para que em seguida seja fotoirradiados e a ação de CFD possa ocorrer de forma efetiva a partir da produção de espécies de radicais e/ou oxidantes.

Os fótons absorvidos pelo corante (FS) na solução e absorvido/internalizado no metabolismo do inseto pode não induzir a produção de oxigênio singleto ou radicais livres para a consequente produção de espécies radicais e/ou oxidantes e indução de danos celulares, se não houver irradiação a partir de uma potência mínima.

Na ausência de irradiação solar direta as diferentes concentrações de CCS não apresentaram mortalidade mesmo com exposição das larvas por um período de 48 horas (2.880 minutos) à CCS. Na ausência de irradiação solar a CCS é atóxica para as larvas de *A. aegypti*.

6 CONCLUSÃO

A clorofilina cúprica de sódio comercial (CCS) mostrou-se adequada para a realização dos experimentos de controle fotodinâmico (CFD) “*in vivo*” para larvas de 3^o/4^o estádios larvais (L3/L4) de *A. aegypti*. A caracterização molecular da CCS foi realizada e mostrou valores similares à ficha técnica do fabricante do produto comercial – Sigma-Aldrich, China, considerando que o grau de pureza é o comercial (70 a 90%).

A caracterização do comportamento óptico do fotossensibilizador (FS) mostrou que este absorve luz na região de 627nm, características adequadas para realização dos experimentos de controle fotodinâmico (CFD) sendo a janela fotodinâmica de absorção no identificada ente 600nm a 700nm.

A clorofilina cúprica de sódio (CCS) não apresentou toxicidade e citotoxicidade para as células de *Allium cepa*, desse modo, pode não apresentar riscos ao meio ambiente.

O tempo de internalização (TI) da clorofilina cúprica de sódio (CCS) determinado a partir do tempo de trânsito (TT) foi de 120 min. para saturação do metabolismo/sistema digestório das larvas. Não foram observadas alterações morfológicas relevantes a partir da análise das imagens em larvas de 3^o/4^o estádios larvais (L3/L4) de *A. aegypti* (Rockefeller). O fotossensibilizador (FS) clorofilina cúprica de sódio (CCS) não apresentou efeitos tóxicos as larvas de *A. aegypti* quando não irradiado

A ação fotodinâmica sobre as larvas de *A. aegypti* foi observada ser mais eficiente em 25 mg L⁻¹. Não foi possível determinar em que momento ocorre ação fotodinâmica da clorofilina cúprica de sódio (CCS) em larvas de *A. aegypti*. A ação de controle fotodinâmico (CFD) para larvas de *A. aegypti* é dependente da energia aplicada/potencia, possivelmente, de forma cumulativa para ocorrência dos danos celulares que foram percebidos de forma imediata e ao longo do tempo devido as mortes das larvas num período de 72 horas. O fato pode estar ligado estritamente à concentração de fotossensibilizador (FS) e a potência irradiada.

A luz solar direta foi a fonte primária para a atividade e/ou eficiência do fotossensibilizador (clorofilina cúprica de sódio - CCS) em experimentos realizados em ambiente natural. A luz solar é um fator importante para o controle fotodinâmico (CFD) em insetos imaturos e insetos adultos (alados). Estudos são necessários para análise da eficiência do controle fotodinâmico (CFD) para controle populacional da espécie, como também das

estratégias de aplicação e/ou utilização de misturas do FS em formulações para a minimização de danos a insetos não alvos, humanos e redução dos impactos ambientais.

7 REFERÊNCIAS

- [1]. WHO, World Health Organization. **Using climate to predict infectious diseases outbreaks: a review**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.
- [2]. WHO, World Health Organization. **Global strategy for dengue prevention and control, 2012-2020**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2012.
- [3]. Brasil, M. da S., Secretaria de Vigilância em Saúde. (2017). Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, p. 10, 2016.
- [4]. MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN S.; GUPTA V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.
- [5]. WHO, World Health Organization. **WHO pesticide evaluation scheme: 50 [fifty] years of global leadership**. Switzerland: World Health Organization, 2010.
- [6]. ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 17–23, 2001.
- [7]. LEHANE, M. J.; AKSOY, S. Control Using Genetically Modified Insects Poses Problems for Regulators. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1495, 2012.
- [8]. CABRINI, I. **Desenvolvimento de metodologia para imobilização de dípteros e avaliação de adulticidas – validação com mosquitos (Diptera: Culicidae) e moscas (Diptera: Chloropidae)**. Campinas, SP: Tese (Doutorado) - Instituto de biologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNICAMP), 2013.
- [9]. Cruz, I. **Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Embrapa Milho e Sorgo**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 21, 2002.
- [10]. ARRUDA, E.J. de; ROSSI, A.P.L.; ANDRADE PORTO, K. R. de; OLIVEIRA, L. C. S. de; ARAKAKI, A. H.; SCHEIDT, G. N.; ROEL, A. R.. Evaluation of toxic effects with transition metal ions, EDTA, SBTI and acrylic polymers on *Aedes aegypti* (L., 1762) (Culicidae) and *Artemia salina* (Artemidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 503–509, 2011.
- [11]. BOETHLING, R. S.; SOMMER, E.; DIFIORE, D. Designing Small Molecules for Biodegradability. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2207–2227, 2007.
- [12]. RAYMS-KELLER, A.; OLSON, K. E.; MCGAW, M.; ORAY, C.; CARLSON, J. O.; BEATY, B. J. Effect of Heavy Metals on *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) Larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, n. 1, p. 41–47, 1998.

- [13]. RODRIGUES, T. A. D. **Síntese e caracterização de complexos de L-Glut.-Cu(II) / L-Glut.-Fe(III) e L-Asp.-Cu(II) / L-Asp.-(Fe(III)) para controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Dourados, MS: Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal da Grande Dourados, 2013.
- [14]. BRASIL, M. DA S., Secretaria de Vigilância em Saúde. **MONITORAMENTO DOS CASOS E ÓBITOS DE FEBRE AMARELA NO BRASIL**, 2017b. Disponível em: <<http://sbim.org.br/images/files/ms-febre-amarela-16032017.pdf>>. Acesso em: 27 março 2017
- [15]. GABAN, C. R. G. **Avaliação histopatológica de danos celulares provocados por íons e microencapsulados com quelato metálico no sistema digestório de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Campo Grande, MS: Dissertação, [Mestrado em Biotecnologia], Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, 2009.
- [16]. BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 15, n. 5, p. 62–73, set. 1976.
- [17]. CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. de **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ, 1994.
- [18]. TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S99–S102, 2001.
- [19]. NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415–415, 2013.
- [20]. AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 1–6, 2015.
- [21]. WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2921, 2014.
- [22]. BRASIL, M. da S.-S. de V. em S., Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Febre de chikungunya: manejo clínico**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2015.
- [23]. HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET G. A.; BRASIL P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906–908, 2015.
- [24]. ALBUQUERQUE, I. G. C. de; MARANDINO, R.; MENDONÇA, A. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; VASCONCELOS, P. F. da C.; GUERRA, L. R.; BRANDÃO, B. C.; MENDONÇA, A. P. P.; AGUIAR, G. R.; BACCO, P. A. M. de. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 128–129, 2012.

- [25]. FAYE, O.; DUPRESSOIR, A.; WEIDMANN, M.; NDIAYE, M.; ALPHA SALL, A. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 96–101, 2008.
- [26]. CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- [27]. LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V.; VIEIRA, R. de M. dos. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 4, p. 785–788, 2015.
- [28]. EICKMANN, S. H.; CARVALHO, M. D. C. G.; RAMOS, R. C. F.; ROCHA, M. Â. W.; LINDEN, V. van der; SILVA, P. F. S. da. Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 7, 2016.
- [29]. WIWANITKI, V. Congenital Zika virus syndrome. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 11, 2016.
- [30]. BRASIL, M. DA S., Secretaria de Vigilância em Saúde, Centro de Operações de Emergência em Saúde Pública Sobre Microcefalia. **INFORME EPIDEMIOLÓGICO Nº 51 – SEMANA EPIDEMIOLÓGICA (SE) 44/2016 (30/10/2016 A 05/11/2016) - Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil**, 2016. Disponível em: <http://www.combateaedes.saude.gov.br/images/pdf/informe_microcefalia_epidemiologic_o51.pdf>
- [31]. VASCONCELOS, P. F. da C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 244–258, 2002.
- [32]. VASCONCELOS, P. F. da C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275–293, 2003.
- [33]. GOMES, A. de C.; TORRES, M. A. N.; GUTIERREZ, M. F. de C.; LEMOS, F. L.; LIMA, M. L. N.; MARTINS, J. F.; COSTA, Z. G. A. Registro de *Aedes albopictus* em áreas epizoóticas de febre amarela das Regiões Sudeste e Sul do Brasil (Diptera: Culicidae). **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 1, p. 71–76, 2008.
- [34]. BOLDRINI, A. Surto de febre amarela no Brasil é o maior de série histórica, desde 1980. **Folha de São Paulo**, 26 jan. 2017.
- [35]. WHO, World Health Organization. Vector resistance to pesticides. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 818, p. 1–62, 1992.
- [36]. MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; DUNLAP, P.; CLARK, D. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre (RS): ARTMED, 2010.
- [37]. BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S. da S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199–203, 2004.

- [38]. LIN, J.; WAN, M. T. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 145, 2014.
- [39]. KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694–707, 2007
- [40] HOPE, C. K. Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1227–1230, 2006
- [41]. SOUZA, S. C. de; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. C. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, n. 1, p. 34–38, 2006.
- [42]. PAULINO, T. P.; RIBEIRO, K. F.; THEDEI G.; TEDESCO A. C. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 3, p. 353–359, 2005.
- [43]. CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.
- [44]. O’RIORDAN, K.; AKILOV, O. E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 247–262, 2005.
- [45]. MAISCH, T.; BAIER, J.; FRANZ, B.; MAIER, M.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M.; BAUMLER, W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 17, p. 7223–7228, 2007.
- [46]. SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002.
- [47]. TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- [48] MARTINS, R. C.; SILVA, C. L. M. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **International Journal of Refrigeration**, v. 25, n. 7, p. 966–974, 2002.
- [49] SCHOEFS, B. *Chlorophyll and carotenoid* analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 11, p. 361–371, 2002.
- [50]. GROSS, J. **Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids**. Boston, MA: Springer US: Springer, 1991.

- [51]. STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO M. W. do; HECKTHEUER L. H. H.. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.
- [52] MOREIRA, L. M.; RODRIGUES, M. R.; OLIVEIRA, H. P. M. de, LIMA, A.; SOARES, R. R. S; BATISTELA, V. R; GEROLA A. P.; HIOKA, N.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M. S.; MACHADO, A. E. da H. Influência de diferentes Sistemas de solvente água-etanol sobre as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila α . **Quím. Nova** 2010; 33: 258–262;
- [53]. LEE, J. D.; Toma, H. E.; ARAKI K.; ROCHA R. C. **Química inorgânica não tão concisa**. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.
- [54]. VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. de F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. da S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.
- [55]. BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- [56]. WILLIAMS, R. M.; COLA, L. D.; HARTL F.; LAGREF J-J.; PLANEIX J. M.; CIAN A. D.; HOSSEINI M. W. Photophysical, electrochemical and electrochromic properties of copper-bis(4,4'-dimethyl-6,6'-diphenyl-2,2'-bipyridine) complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 230, n. 1–2, p. 253–261, 2002.
- [57]. SHRIVER, D. F.; Atkins, P. W.; OVERTON T. L.; ROURKE J. P.; WELLER M.; ARMSTRONG F. A.; FARIA R. DE B.; SANTOS C. M. P. DOS. **Química inorgânica**. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- [58]. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151–4202, 1998.
- [59]. NYMAN, E. S.; HYNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 73, n. 1–2, p. 1–28, 2004.
- [60]. MACDONALD, I. J.; Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 2001.
- [61]. TUMOLO, T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties? **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 451–459, 2012.
- [62]. FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S. J. Thermal Degradation of Commercial Grade Sodium Copper Chlorophyllin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7098–7102, 2005.
- [63]. FERRUZZI, M. G.; FAILLA, M. L.; SCHWARTZ, S. J. Sodium Copper Chlorophyllin: In Vitro Digestive Stability and Accumulation by Caco-2 Human Intestinal Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2173–2179, 2002.

- [64]. SOARES, R. R. . **Estudos de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. Maringa, PR: [Dissertação de Mestrado] - Universidade Estadual de Maringá., 2006.
- [65]. CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP**. Rio Claro, SP: Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2010.
- [66]. COIMBRA, R. dos S. C.; SANTOS, C. R. dos; SARAIVA V. B.; OLIVEIRA M. M. Biomarkers as tools in quality assessment of fish contaminated with trace metals. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, v. 7, n. 1, p. 153–172, 2013.
- [67]. CATINON, M.; AYRAULT, S.; DAUDIN, L.; SEVIN, L.; ASTA, J.; TISSUT, M.; RAVANEL, P. Atmospheric inorganic contaminants and their distribution inside stem tissues of *Fraxinus excelsior* L. **Atmospheric Environment**, v. 42, n. 6, p. 1223–1238, 2008.
- [68]. LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.
- [69]. CHERNOMORSKY, S.; RANCOURT, R.; SAHAI; PORETZ, R. Evaluation of commercial chlorophyllin copper complex preparations by liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of AOAC international**, v. 80, n. 2, p. 433–435, 1997a.
- [70]. U. S. P., United States Pharmacopia. Chlorophyllin copper complex sodium contains sodium salts of copper-chelated chlorophyll derivatives. In: Rockville: Enigma, 2007, p. p 478.
- [71]. CHERNOMORSKY, S. Quantitative procedure for chlorophyllin copper complex, *Journal of AOAC International*. 77(3):756-757. **Journal of AOAC international**, v. 77, n. 3, p. 756–757, 1993.
- [72]. CHERNOMORSKY, S.; RANCOURT, R.; VIRDI, K.; SEGELMAN, A.; PORETZ, R. D. Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. **Cancer Letters**, v. 120, n. 2, p. 141–147, 1997.
- [73]. GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, n. 3, p. 273–291, 1982.
- [74]. BESERRA, E. B.; FREITAS, E. M. de; SOUZA, J. T.; FERNANDES C. R. M.; SANTOS K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 99, n. 3, 2009.
- [75]. POLO-PC, A. User's Guide to Probit Or LOGit Analysis. **LeOra Software, Berkeley, CA**, 1987.

- [76]. ABBOTT, W. S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265–267, 1925.
- [77]. MONTES, V. A.; PÉREZ-BOLÍVAR, C.; AGARWAL, N.; SHINAR, J.; ANZENBACHER, P.. Molecular-Wire Behavior of OLED Materials: Exciton Dynamics in Multichromophoric Alq₃-Oligofluorene-Pt(II)porphyrin Triads. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 38, p. 12436–12438, 2006.
- [78]. GURINOVICH, G. P.; SEVCHENKO, A. N.; SOLOVEV, K. The spectroscopy of the porphyrins. **Soviet Physics Uspekhi**, v. 6, n. 1, p. 67–105, 1963.
- [79]. GEROLA, A. P. **Estudos físico-químicos de derivados de clorofila em sistemas homogêneos e micro-heterogêneos: aspectos fotofísicos, fotodinâmicos e fotoativantes sobre micro-organismos**. Maringá, PR: Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 2010.
- [80]. WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.; MARLAND, J.; WAREING, D.; BOLTON, F. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75–80, 1997.
- [81]. WAINWRIGHT, M.; GRICE, N.J.; PYE, L. E. Phenothiazine photosensitizers: part 2. 3, 7-Bis (arylamino) phenothiazines. **Dyes and pigments**, v. 42, n. 1, p. 45–51, 1999.
- [82]. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; PASQUINI, C. **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman, 2009.
- [83]. FARAG, A. Optical absorption of sodium copper chlorophyllin thin films in UV–Vis–NIR region. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 65, n. 3, p. 667–672, 2006.
- [84]. EL-NAHASS, M.; ZEYADA, H.; AZIS M.; MAKHLOUF, M. Optical absorption of tetraphenylporphyrin thin films in UV–Vis–NIR region. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 13, p. 3026–3031, 2005.
- [85]. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ G. S.; VYYYAN, J. R.. Introdução à espectroscopia. **São Paulo: Cengage Learning**, 2010.
- [86]. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos (7a. ed.)**. Grupo Gen - LTC, 2000.
- [87]. BUSCHINELLI, J. T.; KATO, M. **Manual para interpretação de informações sobre substâncias químicas**. São Carlos, SP: Fundacentreo, 2012.
- [88]. PRATT, M. M.; REDDY, A. P.; HENDRICKS, J. D.; PREIRA, C.; KENSLER, T. W.; BAILEY, G. S. The importance of carcinogen dose in chemoprevention studies: quantitative interrelationships between, dibenzo [a, l] pyrene dose, chlorophyllin dose, target organ DNA adduct biomarkers and final tumor outcome. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 611–624, 2006.

- [89]. PRUŽINSKÁ, A.; TANNER, G.; ANDERS, I.; ROCA, M.; HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron–sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 15259–15264, 2003.
- [90]. BREINHOLT, V.; SCHIMERLIK, M.; DASHWOOD, R.; BAILEY, G. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. **Chemical Research in Toxicology**, v. 8, n. 4, p. 506–514, 1995.
- [91]. SATO, M.; IMAI, K.; KIMURA R.; MURATA, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 32, n. 2, p. 716–722, 1984.
- [92]. SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; ROBERTS, D. Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141[i]) and chlorophyllin (E141[ii]) food colouring materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1163–1175, 2005.
- [93]. FRIESEN, D. A.; MORELLO, L.; HEADLEY J. V.; LANGFORD C. H. Factors influencing relative efficiency in photo-oxidations of organic molecules by Cs3PW12O40 and TiO2 colloidal photocatalysts. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 213–220, 2000.
- [94]. GAYA, U. I. **Heterogeneous Photocatalysis Using Inorganic Semiconductor Solids**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014.
- [95]. MILLER, R. C. The micronucleus test as an in vivo cytogenetic method. **Environmental Health Perspectives**, v. 6, p. 167–170, 1973.
- [96]. GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000.
- [97] ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, HIDEKO. Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento/Fronteiras. Cultura Acadêmica Editora (CAE). Editora da UNESP 1a ed. São Paulo, 2016. 344p.
- [98]. CLARK, T. M.; HUTCHINSON, M. J.; HUEGEL, K L.; MOFFETT, S. B.; MOFFETT, D. F... Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Tissue and Cell**, v. 37, n. 6, p. 457–468, 2005.
- [99]. DADD, R. H. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 11, p. 1847–1853, 1975.
- [100]. FILIETÁZ, C. F. T. **Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases**. São Paulo: Dissertação (mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2011.

- [101]. BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

8 ANEXO



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDENCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
SR.11 MARÍLIA

**FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE INSETOS CRIADOS EM
LABORATÓRIOS DA SUCEN – Marília - SP**

1. Solicitante:
Nome: Eduardo José de Arruda
Instituição: Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD / FACET –
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia – Laboratório de Insetos Vetores - LIVE
2. Finalidade: Bioensaios de toxicidade e restabelecimento de colônia de *Aedes aegypti* (Rockfeller) no Laboratório de Insetos Vetores – LIVE.
3. Espécie solicitada: ***Aedes aegypti* - Rockfeller**

4. Quantidade de exemplares: **3.000 ovos**
5. Idade: s/d 6. Sexo: s/d 7. Fase: s/d
8. Estado Nutricional: s/d
9. Geração: s/d
10. Procedência da colônia: ***Aedes aegypti* - Rockfeller**
11. Outras especificações: s/d
12. Cronograma de fornecimento: envio por correio

Tenho pleno conhecimento do Regulamento para Fornecimento de Insetos Criados em Laboratório e Material Biológico em vigor na Sucen e declaro total concordância com seu conteúdo, comprometendo-me a observá-lo naquilo que me couber.

Local e data: Dourados – MS, 31/03/2016

Assinatura do Solicitante: _____
Dr. Eduardo José de Arruda

Documento de Identidade: RG: 8.481.863-3 SSP/SP / CPF: 002.380.298-7