



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



Alessandra Ramos Lima

**AVALIAÇÃO DE CORANTES COMO AGENTE
FOTOSENSIBILIZADORES PARA CONTROLE
FOTODINÂMICO DA POPULAÇÃO DE LARVAS DE *Aedes
aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação - Mestrado em Química

**Dourados - MS, Brasil
MARÇO/2016**

ALESSANDRA RAMOS LIMA

**AVALIAÇÃO DE CORANTES COMO AGENTE
FOTOSENSIBILIZADORES PARA CONTROLE
FOTODINÂMICO DA POPULAÇÃO DE LARVAS DE *Aedes*
Aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)**

**Orientador: Anderson Rodrigues Lima Caires
Co-orientador: Eduardo José de Arruda**

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

Dourados - MS, Brasil

MARÇO/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

L732a Lima, Alessandra Ramos.
Avaliação de corantes como agente fotossensibilizadores para controle fotodinâmico da população de larvas de *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE). / Alessandra Ramos Lima. – Dourados, MS : UFGD, 2016.
75f.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Controle fotodinâmico. 2. Fotossensibilizador. 3. Eosina azul de metileno. 4. Luz branca. 5. *Aedes Aegypti*. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação 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 Fotossensibilizadores para Controle Fotodinâmico da População de Larvas de *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae)", de autoria de Alessandra Ramos Lima, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires (Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Ériton Rodrigo Botero
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Samuel Leite de Oliveira
Membro Examinador (UFMS)

Dourados/MS, 10 de março de 2016

DADOS CURRICULARES

ALESSANDRA RAMOS LIMA

1. DADOS PESSOAIS

Nascimento: 13 de fevereiro de 1990

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Dourados - MS

Estado Civil: Solteira

Filiação: Alberto Nolasco de Lima e Maura de Jesus Ramos Lima

Endereço: Rua Independência, 194, Dourados - MS

E-mail: ramosalessandra09@gmail.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Bacharel em Química com atribuições Tecnológica

Universidade Federal da Grande Dourados –UFGD. Dourados/MS. Concluído em 2013.

2.2 Ensino Médio

Escola Estadual Barão do Rio Branco. Douradina/MS. Concluído em 2007.

2.3 Ensino Fundamental

Escola Estadual Barão do Rio Branco. Douradina/MS. Concluído em 2004.

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

3.1. Depósito de patente

No dia 16/12/2015 foi aberto processo na UFMS de número 23104.007600/2015-21 a respeito da invenção intitulada: "*Uso do corante Eosina Azul de Metileno no controle fotodinâmico do inseto vetor Aedes aegypti*" desenvolvida pelos inventores **LIMA, A.R. et al.**

No mês de março será finalizado o processo de depósito da patente junto ao INPI.

3.2. Trabalhos publicados em periódicos indexados

LIMA, A. R.; ARRUDA, E. J.; CARVALHO, C. T.; SILVA, C. M.; FERNANDES, M. F.; KATO, M. F. H.; CABRINI, I.; ANDRADE, C. F. S. Insecticidal activity of Cu(II)-NTA in *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Orbital: the Electronic Journal of Chemistry*, v.7, p. 369-375, 2015.

3.3. Trabalhos publicados em congressos científicos

COSSA, T. M.; **LIMA, A. R.**; PAIVA, D. P.; CABRINI, I.; FERNANDES, M. F.; ALENCAR, J. A. F.; LIMA, J. B.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A.; ARRUDA, E. J. Atividade inseticida do complexo de Cu(II) de 3-(3-pentadecil-fenoxi)-propano-1,2-diol em larvas de *Ades aegypti* e *Anophles aquasalis*, SBQ-MS, 2015.

KATO, M. F. H.; **LIMA, A. R.**; ARRUDA, E. J.; CABRINI, I. Dispositivos poliméricos de liberação lenta com metalo-inseticidas para controle de insetos vetores, SBQ-MS, 2015.

3.4. Participação em congressos científicos

I Reunião da Sociedade Brasileira de Química Secretaria MS, (SBQ-MS) /VIII Semana Integrada de Química UFGD/UEMS. 2015.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você está fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

Dedicatoria

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado nesta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Maura de Jesus Ramos Lima e Alberto Nolasco de Lima, que tiveram paciência e me deram a base da educação, amor e incentivam a lutar por meus objetivos e sonhos.

Em especial ao meu orientador prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires pela orientação e aprendizado, pelo exemplo de competência e sabedoria, simplicidade e força. Obrigado por me ensinar a ver as situações de forma positiva, acreditando que é possível de se realizar as coisas desde que se queira, e em momentos difíceis acreditou que daria certo.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Eduardo José de Arruda que nunca desistiu de mim, nem por um instante, ao conhecimento transmitido e incentivo permanente.

E aos meus tios (as) que almejaram, torceram e oraram por mim, para que eu chegasse a alcançar os meus ideais.

À minha companheira de pesquisa Cícera Maria da Silva, por ajudar a realizar os experimentos. Obrigada pela amizade, por toda sua paciência, competência, troca de conhecimento e foi mais uma etapa vencida com você ao meu lado apoiando. Te admiro muito e tenho certeza que terá muito sucesso.

Agradeço ao meu grande amigo Flávio (o jovem), na ajuda nos experimentos, não tinha dia nem hora, você sempre presente com bom humor, companheirismo, paciência e competência. Por me ajudar na busca incansável do sistema de iluminação, são muitas histórias...

Ao meu namorado Fernando Santos Silva, por seu amor, carinho, atenção, compreensão, incentivo e apoio. Por dividir comigo os momentos de alegria e dificuldade.

A Luciana Piovesan mestranda que esteve comigo durante estes dois anos de mestrado, no desenvolvimento dessas pesquisas em TFD na luta também, se dividindo entre seu trabalho, pesquisa e sua família. Muito obrigada pelas conversas, risadas, companheirismo e por compartilhar comigo angústias e vitórias.

A Cynthia Caires pela parceria, companheirismo, incentivo e apoio no desenvolvimento desta pesquisa em TFD. Admiro muito sua dedicação.

Ao Esmael Prado pela construção do sistema de iluminação em parceria com Marcelo Texeira, sem estes não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Júnior Antônio todas as vezes que precisei estava lá para me ajudar com os hamster na Biologia.

Ao prof. Dr. Isaias Cabrini, pelo conhecimento transmitido e paciência em ensinar.

Aos Professores do Grupo de Óptica Aplicada/UFGD, Professor (a) Evaristo Falcão, Eriton Botero, Seila Rojas e José Ezequiel.

Às demais amigadas que cultivei durante esta caminhada, o meu muito obrigada por terem trilhado comigo que são eles: Willam Falco, Nicele Pimentel, Simone Bittencourt, Giuliane Felix, Eliene Santos, Glauciane Leite; Adalberto Mezacasa; Amanda Queiroz; Poliane Paixão, Rosimeire Nunes; Maithon Rocha, Deluana Martins, Wilson Passos.

A Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciência Exatas e Tecnológicas e ao Grupo de Óptica Aplicada pelo espaço e apoio.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

Alessandra R. Lima

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
$\cdot\text{O}_2^-$	Superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
^1PS	Estado fundamental singlete
$^1\text{PS}^*$	Estado excitado singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
$^3\text{PS}^*$	Estado tripleto
Acc	Corrente
AM	Azul de Metileno
Br	Bromo
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis var. israelenses</i>
C	Carbono
CA	Corrente alternada
CC	Corrente contínua
CF	Controle fotodinâmico
CHIK	Chikungunya
CHIKV	Vírus Chikungunya
Chl	Clorofila
Chl-Na	Clorofila-Sódica
Cl	Cloro
cm	Centímetro
cm ²	Centímetros quadrados
DENV	Vírus dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTV _s	Doenças transmitidas por vetores
EAM	Eosina Azul de Metileno
EXCL	Extrato de clorofila
FS	Fotossensibilizador
g	Gramas
H	Hidrogênio
H _v	Energia
LED	Diodo emissor de luz
mg	Miligramas
Mg ²⁺	Íon magnésio
min	Minutos
mL	Mililitros
mmHg	Milímetro de mercúrio
mW	MiliWatts
mWcm ⁻²	MiliWatts por centímetro quadrado
N	Nitrogênio
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
O	Oxigênio
°C	Grau Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico

ppm	Parte por milhão
RGB	Red/Green/Blue
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Enxofre
Si	Silício
TFD	Terapia fotodinâmica
TI	Tempo de internalização
UBV	Ultrabaixo volume
UV-Vis	Ultravioleta-visível
Vca	Tensão corrente alternada
ZIK	Zika
ZIKV	Vírus Zika

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais eventos do desenvolvimento da TFD ⁶⁹	26
Tabela 2: Parâmetros das cores individual do LED RGB utilizados na TF.....	39
Tabela 3: Tratamento realizado em larvas de <i>Aedes aegypti</i> nos bioensaios com os fotossensibilizadores EXCL, AM e EMA.....	41
Tabela 4: Tratamento realizado em larvas de <i>Aedes aegypti</i> de 3º estágio para o bioensaio com o fotossensibilizador EMA.....	41
Tabela 5: Dose de energia considerando diferentes tempos de irradiação.....	41
Tabela 6: Valores de temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade 13h30min às 19h35min, no campus da Universidade Federal da Grande Dourados, MS 19/01/2016.....	58

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1:** Diagrama simplificado do sistema de irradiação.....39
- Esquema 2:** Desenho experimental dos bioensaios realizado com larvas de *Aedes aegypti in vivo*.....42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Jablonski simplificado – mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas por luz ⁷⁵ , sendo ¹ PS: estado fundamental singleto (¹ PS); <i>hν</i> : energia; ¹ PS*: estado singleto excitado; ³ PS*: estado tripleto excitado; ³ O ₂ : estado tripleto oxigênio; ¹ O ₂ : estado singleto.....	28
Figura 2: Estrutura química da molécula de Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> ⁹¹	30
Figura 3: Estrutura química do azul de metileno ⁹⁸	31
Figura 4: Estrutura química da eosina Y ¹¹³ e B ¹¹⁴	33
Figura 5: Espectros de absorção UV-Vis dos fotossensibilizadores A) EXCL 0,0786 mg mL ⁻¹ ; B) AM 0,0462 mg mL ⁻¹ e C) EAM 0,0350 mg mL ⁻¹	44
Figura 6: Morfologia externa da larva do mosquito <i>Aedes aegypti</i> ¹⁴⁰	46
Figura 7: Internalização do fotossensibilizador EXCL na concentração de 0,1 mg mL ⁻¹ no sistema digestório de larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i>	47
Figura 8: Internalização do fotossensibilizador AM, na concentração de 0,1 mg mL ⁻¹ no sistema digestório de larvas de 3º estágio <i>Aedes aegypti</i>	48
Figura 9: Internalização do fotossensibilizador EAM na concentração de 0,1 mg mL ⁻¹ no sistema digestório de larva de 3º estágio <i>Aedes aegypti</i>	49
Figura 10: Cores das soluções dos fotossensibilizadores nas concentrações de 0,1; 0,05 e 0,01 mg mL ⁻¹ A) EXCL; B) AM.....	51
Figura 11: Taxa de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> nas concentrações de EAM (A) (■) 0,1 mg mL ⁻¹ ; (▼) 0,05 mg mL ⁻¹ ; (▲) 0,01 mg mL ⁻¹ para uma dose de energia de 32,4 J cm ⁻² ; (●) Controle sem fotossensibilizador (controle negativo), (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).....	52
Figura 12: Taxa de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes concentrações de EAM (A) (■) 0,1 mg mL ⁻¹ ; (►) 0,05 mg mL ⁻¹ ; (▲) 0,01 mg mL ⁻¹ ; (▼) 0,005 mg mL ⁻¹ ; (◆) 0,001 mg mL ⁻¹ ; (◄) 0,0005 mg mL ⁻¹ ; (●) Controle, para uma dose de energia de 32,4 J cm ⁻² . (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).....	53
Figura 13: Taxa de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> nas concentrações do corante EAM (A) (■) 0,1 mg mL ⁻¹ ; (►) 0,05 mg mL ⁻¹ ; (▲) 0,01 mg mL ⁻¹ ; (▼) 0,005 mg mL ⁻¹ ; (◆) 0,001 mg mL ⁻¹ ; (◄) 0,0005 mg mL ⁻¹ ; (●) Controle para uma dose de energia de 16,2 J cm ⁻² . (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).....	54
Figura 14: Taxa de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes concentrações de EAM (A) (■) 0,1 mg mL ⁻¹ ; (►) 0,05 mg mL ⁻¹ ; (▲) 0,01 mg mL ⁻¹ ; (▼) 0,005 mg mL ⁻¹ ; (◆) 0,001 mg mL ⁻¹ e (◄) 0,0005 mg mL ⁻¹ ; (●) Controle irradiado para uma dose de energia de 8,1 J cm ⁻² . (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).....	55
Figura 15: Taxa de mortalidade em função da concentração do fotossensibilizador EAM para as dose de energia (■) 32,4 J cm ⁻² ; (●) 16,2 J cm ⁻² 60 min; (▲) 8,1 J cm ⁻² , após 2h (120 min) leitura.....	56
Figura 16: Soluções do fotossensibilizador EAM nas concentrações de 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001; e 0,0005 mg mL ⁻¹ , utilizadas no CF em larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i>	57
Figura 17: Taxa de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes concentrações de EAM (A) (■) 0,1 mg mL ⁻¹ ; (►) 0,05 mg mL ⁻¹ ; (▲) 0,01 mg mL ⁻¹ ; (▼) 0,005 mg mL ⁻¹ ; (◆) 0,001 mg mL ⁻¹ ; (◄) 0,0005 mg mL ⁻¹ para a radiação solar com a intensidade de 129.475 Lux (●) Controle. (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).....	59

RESUMO

O *Aedes aegypti* é um vetor que pode-se infectar com o vírus da febre amarela, quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), chikungunya, zika vírus. O controle populacional do *Aedes aegypti*, deve ser realizado de forma integrada com manejo ambiental, controle biológico e controle químico. A utilização indiscriminada de produtos químicos organofosforados, piretroides, carbamatos, entre outros, contra a população de *Aedes aegypti*, tem selecionado populações de insetos resistentes a inseticidas, perdendo a eficácia do inseticida sob o inseto. Atualmente, apesar dos avanços científicos, ainda não existe vacina ou medicamento disponível no mercado que confira imunidade aos quatro sorotipos do vírus da dengue, chikungunya e zika. Tem sido relatado eficácia da utilização de fotossensibilizadores contra população de larvas de insetos. Neste trabalho foi investigado as propriedades fotodinâmica dos fotossensibilizadores extrato de clorofila (EXCL), Azul de Metileno (AM) e Eosina Azul de Metileno (EAM) em larvas do inseto *Aedes aegypti* Diptera: Culicidae linhagem Rockefeller. Os estudos mostraram que o tempo de trânsito metabólico dos fotossensibilizadores é de 45 min e o tempo de internalização nas larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* foi de 120 minutos. O controle fotodinâmico foi realizado com luz de LED RGB inicialmente com dose de $32,4 \text{ J cm}^{-2}$ para os três fotossensibilizadores nas concentrações $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (100 ppm); $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ (50 ppm) e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ (10 ppm). Os fotossensibilizadores EXCL e AM não apresentaram ação fotodinâmica para as larvas de *Aedes aegypti*, apenas o fotossensibilizador EAM mostrou-se ser fototóxico para as larvas. Posteriormente, foi realizado experimentos com seis concentração de EAM e duas fontes de irradiação (Luz de LED RGB, com três doses $32,4; 16,2$ e $8,2 \text{ J cm}^{-2}$, e luz solar). Os resultados indicaram que o controle fotodinâmico a partir do fotossensibilizador EAM pode ser utilizado de forma efetiva como parte de um controle integrado da população de larvas de *Aedes aegypti*.

Palavras-Chaves: Controle fotodinâmico; fotossensibilizador; Eosina azul de metileno; Luz branca; *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Aedes aegypti is a vector that can be infected by the yellow fever virus, four serotypes of the dengue virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4), chikungunya and zika virus. The population control of *Aedes aegypti* should be carried out in an integrated way with environmental management, biological control and chemical control. The indiscriminate use of organophosphorus, pyrethroids and carbamates and others insecticides, against the population of *Aedes aegypti*, has selected populations of insects resistant to insecticides, losing the effectiveness of the insecticide under the insect. Nowadays, despite scientific advances, there is no vaccine or drug available on the market that confers immunity to the four serotypes of the dengue virus, chikungunya and zika. The efficacy of photosensitizers against insect larval populations has been reported. In this work, the photosynthetic properties of the photosensitizers Chlorophyll Extract (EXCL), Methylene Blue (AM) and Eosin Methylene Blue (EAM) in insect larvae of the *Aedes aegypti* Diptera: Culicidae Rockefeller were investigated. The studies showed that the metabolic transit time of the photosensitizers is 45 min and the internalization time in the larvae at the 3th stage of *Aedes aegypti* was 120 minutes. The photodynamic control was performed with RGB LED light initially with a dose of 32.4 J cm⁻² for the three photosensitizers at concentrations 0.1 mg mL⁻¹ (100 ppm); 0.05 mg mL⁻¹ (50 ppm) and 0.01 mg mL⁻¹ (10 ppm). The photosensitizers EXCL and AM did not showed photodynamic action for the larvae of *Aedes aegypti*, only the photosensitizer EAM showed to be phototoxic for the larvae. Subsequently, experiments were performed with six concentrations of EAM and two sources of irradiation (RGB LED light, with three energy doses 32.4, 16.2 and 8.1 J cm⁻², and sunlight). The results indicated that the photodynamic control from the EAM photosensitizer can be effectively used as part of an integrated control of the *Aedes aegypti* larvae population.

Keywords: Photodynamic control; photosensitizer; Eosin methylene blue; White light; *Aedes aegypti*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO II.....	19
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO III	20
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 Doenças transmitidas por vetores	20
3.2 Estratégias de controle populacional do vetor <i>Aedes aegypti</i>	22
3.3 Histórico da Terapia Fotodinâmica	25
3.4 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica.....	27
3.5 Fotossensibilizadores	28
3.5.1 Clorofilas	29
3.5.2 Azul de Metileno	31
3.5.3 Eosinas.....	32
3.6 Fontes de luz	34
CAPÍTULO IV	36
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
4.1 Fotossensibilizador	36
4.2 Cultivo das plantas.....	36
4.3 Obtenção do Extrato	36
4.4 Caracterização do comportamento óptico dos fotossensibilizadores: Absorção UV-Visível.....	37
4.5 Obtenção das larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> e manutenção da criação	37
4.6 Determinação do tempo de internalização.....	38
4.7 Condições fotodinâmica <i>in vivo</i> sobre larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i>	38
4.7.1 Fontes de Irradiação.....	38
4.7.2 Parâmetros e tratamentos usados para realizar o controle fotodinâmico.....	40
4.7.3 Controle Fotodinâmico LED	42
4.7.4 Controle Fotodinâmico Luz solar	43

CAPÍTULO V	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Caracterização do comportamento óptico dos fotossensibilizadores: Absorção UV-Visível dos fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM.	44
5.2 Determinação do tempo de internalização (TI)	45
5.3 Ação fotodinâmica <i>in vivo</i> sobre larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i>	50
5.3.1 Controle Fotodinâmico LED RGB	50
5.3.2 Controle Fotodinâmico Luz solar	58
 CAPÍTULO VI.....	 62
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS.....	64
8 ANEXO.....	75

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Atualmente as doenças virais transmitidas por mosquitos são responsáveis por altas taxas e persistência de mortalidade entre a população humana. A dengue, febre amarela, chikungunya (CHIK), zika (ZIK) e malária são alguns exemplos, sendo que a dengue se classifica como a principal doença viral do mundo^{1; 2}. Estima-se que cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em mais de 100 países endêmicos e/ou em áreas onde os vírus da dengue podem ser transmitidos. A cada ano são estimadas entre 50 a 100 milhões de novas infecções^{2; 3}. As notificações de casos de dengue e outras doenças reemergentes e negligenciadas também ocorrem em países desenvolvidos. Especialistas relacionam essa situação a vários fatores como, condições ambientais, infraestrutura das cidades, ecologia e comportamento do inseto, problemas de urbanização e crescimento populacional desordenado, falta de infraestrutura na saúde, falta de controle preventivo e educação social, e a rápida disseminação do inseto por rotas comerciais entre diferentes partes do mundo, o que permite a manifestação das doenças na forma de epidemias ou surtos⁴. A prevenção é a forma de controle mais eficiente para a redução da dengue e demais doenças transmitidas pelos insetos vetores, pois considera a redução populacional do inseto por indisponibilidades de criadouros e controle permanente do vetor. O controle do vetor pode ser realizado de forma integrada com estratégias que incluem: manejo ambiental, controle biológico, controle químico com uso de inseticidas orgânicos ou inorgânicos, uso de repelentes, armadilhas, monitoramento de resistência entre outros. O controle químico realizado a partir do uso de inseticidas utiliza atualmente os piretróides, cipermetrina e deltametrina e o organofosforado malathion⁵.

Os esforços para controlar as epidemias e surtos das doenças têm sido focados, principalmente, na eliminação do vetor^{5; 6}. No entanto, as estratégias de controle não têm obtido sucesso devido à resistência do mosquito aos inseticidas, com consequente aumento no número de pessoas infectadas. A resistência ocorre por vários motivos, entre eles a aplicação de inseticidas em altas concentrações e em intervalos curtos, diminuindo a eficácia da molécula^{6; 7}.

A inconsistência das informações sobre o vetor, veiculadas pelos dos órgãos oficiais escassez de dados, supervalorização da mídia na cobertura das ações e atividades de controle e com foco nos resultados do controle que são insatisfatórios, tem levado a ideia simplista de que, para solucionar o problema, é suficiente intensificar o trabalho com a utilização de inseticidas e assim, pouco se avança no aprimoramento das estratégias de controle⁸.

A dengue, CHIK e ZIK não são simplesmente uma ameaça à Saúde Pública, mas têm e podem ter efeitos catastróficos sobre a situação econômica das pessoas que vivem na pobreza em todo o mundo⁹. Dessa forma, buscam-se alternativas de ativos inseticidas com base em novos modos de ação e/ou estratégias que possam ser obtidos a partir de fontes vegetais, toxinas de microrganismos e/ou novos ativos sintéticos¹⁰ com foco na eficiência, especificidade, segurança humana e menor impacto ambiental¹¹.

A possibilidade de utilização de compostos fotoativos para controlar a população de insetos vetores foi demonstrada pela primeira vez por Barbieri (1928), que usou uma combinação de derivados de xanteno, incluindo fluoresceína, eritrosina e rosa bengala os quais foram eficazes em matar larvas de *Anopheles* e *Aedes*¹². Estudos tem mostrado o potencial da porfirina C-14¹³, photogem® um derivado da porifina¹⁴, clorofilina e feoforbida derivados de clorofila como um fotoativador com intensa atividade larvicida contra *Aedes aegypti*¹⁵. O uso de compostos fotoativos tem por base a interação de uma dessas substâncias, denominado fotossensibilizador, com a luz e oxigênio molecular¹⁶.

Portanto, controle fotodinâmico da população de larvas de *Aedes aegypti* (Rockefeller) pode contribuir para o controle do vetor dengue, CHIK e ZIK. Baseadas nessas justificativas, a presente proposta objetiva avaliar o uso de substâncias fotoativas, - como o extrato clorofila (EXCL), azul de metileno (AM) e eosina azul de metileno (EAM) - para o controle fotodinâmico da população de *Aedes aegypti*. A justificativa para o uso é o fato delas exibem bandas de absorção na região da “janela da terapia fotodinâmica” (entre 600 e 800 nm). Esta abordagem poderá resultar em um adicional no controle do vetor transmissor de diversas doenças tropicais.

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade de três corantes (extrato de clorofila, azul de metileno e eosina azul de metileno segundo Giemsa) no controle fotodinâmico da população de larvas de *Aedes aegypti* (Rockefeller).

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar a “janela fotodinâmica” dos fotossensibilizadores por meio da espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis;
- ✓ Determinar o tempo de internalização dos fotossensibilizadores no interior das larvas;
- ✓ Avaliar a eficiência do controle fotodinâmico mediada pelos fotossensibilizadores, extrato de clorofila, azul de metileno e eosina azul de metileno, em larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* (Rockefeller) utilizando luz branca emitida por LEDs RGB;
- ✓ Avaliar o efeito da concentração do fotossensibilizador e da dose de energia utilizada durante o controle fotodinâmico sobre as larvas de *Aedes aegypti*;
- ✓ Determinar a eficiência do processo fotodinâmico ao usar diretamente a radiação solar como fonte de luz branca para o controle da população das larvas de *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO III

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doenças transmitidas por vetores

As doenças transmitidas por vetores (DTV's) respondem por 16% da quantidade global estimada de doenças transmissíveis². O cenário atual, com profundas mudanças globais, alterações climáticas, variabilidade do clima, disponibilidade e rapidez de transporte, desmatamento/uso da terra, armazenamento inadequado de água e irrigação, crescimento da população humana e urbanização, tem gerado a ressurgência de vetores que são disseminados rapidamente por diferentes partes do mundo¹⁷. A dengue é uma doença viral que ocorre em mais de 100 países e com cerca de 50 a 100 milhões de casos anuais. Desses mais de 25.000 acabam em mortes por ano, principalmente, de crianças e idosos. A dengue é uma doença típica de áreas tropicais e subtropicais sendo transmitida pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. O agente etiológico é um arbovírus, do gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, originário da África¹⁸⁻²⁰.

A distribuição geográfica da dengue tem se expandindo por meio dos transportes dos seus ovos, larvas e até do mosquito adulto em navios, aviões e veículos terrestres. No mundo moderno esse inseto se adaptou facilmente às áreas urbanas e vive no intra e peridomicílio, encontrado criadouros, tais como recipientes de plásticos descartados e outros itens abandonados, que acumulam água e proporcionam um *habitat* propício para as larvas. Também, se adaptaram a antropofagia, o que faz do ser humano seu principal alvo para obtenção de sangue^{3; 21; 22}.

O ciclo de vida do mosquito ocorre em cerca de sete dias, dependendo da temperatura, e se divide em quatro fases: ovo, larva, pupa e mosquito adulto. Após o acasalamento, as fêmeas precisam de sangue para amadurecimento dos seus ovos. Esses são ovipostos próximos ao nível d'água e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura. O contato desses ovos com a água por dois a três dias possibilita a eclosão das larvas. Vale ressaltar que esses os ovos podem resistir à dessecação, permanecendo viáveis na ausência de água por até 450 dias^{17; 20}.

Na fase larval ocorrem quatro estádios de desenvolvimento. A alimentação nessa fase está baseada em matéria orgânica e microrganismos que estão disponíveis na microbiota dos criadouros. A pupa possui formato de vírgula, não requer alimento, movimenta-se rapidamente na água, seu desenvolvimento dura em média três dias e, após este período, o inseto adulto alado emerge. Na fase adulta, os insetos se alimentam de fontes que possuam

carboidratos; porém a fêmea, além de consumir carboidrato também se alimenta frequentemente de sangue (repasto sanguíneo; hematofagia). Esta alimentação é essencial para a vitelogênese e conseqüentemente para continuidade do ciclo reprodutivo do inseto²⁰.

O *Aedes aegypti* é um mosquito antropofílico com atividade hematofágica principalmente diurna²⁰. Os vírus são transmitidos por meio da picada da fêmea infectada²³, sendo que o mosquito se infecta após ingerir sangue de um indivíduo em período de viremia (presença do vírus no sangue) até o quinto/sexto dia após a infecção²⁴. Uma vez infectado, o mosquito transmite o vírus pelo resto da sua vida²⁵. Os humanos são os principais portadores e multiplicadores do vírus, servindo como fonte de vírus para os mosquitos não infectados²⁴. Estudos tem confirmado sua capacidade de se infectar com os vírus da febre amarela, chikungunya (CHIKV) e zika vírus (ZIKV)²⁶, os quais causam manifestações clínicas muito semelhante e com efeitos desconhecidos^{20; 27}.

O vírus da dengue (DENV) se divide em quatro sorotipos antígenicamente distintos, mas geneticamente relacionados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (inclui-se também o DENV-5, recentemente notificado)²⁸. A dengue pode ocorrer tanto de forma assintomática quanto sintomática. Na forma clássica a dengue apresenta com quadro clínico de início repentino e amplo, manifestando-se como uma doença febril aguda benigna acompanhada por cefaleia e dores musculares e articulares. Na forma grave ocorrem hemorragias devido às alterações da coagulação sanguínea²⁹⁻³⁰, podendo evoluir para a síndrome de choque associado a dengue e morte se não houver rápido atendimento³¹.

A febre chikungunya é uma doença causada por um vírus do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. O CHIKV foi isolado inicialmente na Tanzânia por volta de 1952, quando ocorreu o primeiro surto no Sul do país³². A viremia persiste por até dez dias após o surgimento das manifestações clínicas e os sintomas são clinicamente parecidos com os da dengue sendo febre de início agudo, dores articulares e musculares, cefaleia, náusea, fadiga, erupção cutânea, inchaço e conjuntivite na fase aguda³³⁻³⁵.

Porém, a principal manifestação clínica que a difere da dengue são as fortes dores nas articulações (principalmente nos pulsos, tornozelos e cotovelos), o vírus avança nos pacientes e causa inflamações, que dificultam a realização de movimentos, então o indivíduo, por não achar uma posição confortável, posiciona-se de uma forma recurvada e é exatamente essa postura que justifica o nome do vírus CHIKV deriva de uma palavra em africano Makonde, língua falada por um grupo que vive no Sudeste da Tanzânia e Norte de Moçambique que significa “aqueles que se dobram”^{32; 36}. Após a fase inicial, a doença pode evoluir em duas

etapas subsequentes: fase subaguda e crônica. Embora o CHIKV não seja uma doença de alta letalidade, tem caráter epidêmico com elevada taxa de morbidade associada à dores nas articulações persistentes, tendo como consequência a redução da produtividade e da qualidade de vida³³.

A febre ZIK é uma doença causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae, este foi originalmente isolado de uma fêmea de macaco *Rhesus* febril na Floresta Zika (justificando o nome do vírus), localizada em Uganda na África em 1947^{20; 37; 38}. As manifestações clínicas do ZIKV incluem edema de extremidades, febre moderada, dor nas articulações, mais frequentemente nas articulações das mãos e pés, com possível inchaço; dor muscular (mialgia); dor de cabeça e atrás dos olhos; erupções cutâneas (exantemas), acompanhadas de coceira³⁹.

É importante diferenciar a infecção pelo ZIKV, do DENV, pois a dengue apresenta um quadro clínico mais grave. Além disso, pode ocorrer os casos de co-infecção, dengue e ZIK, no mesmo paciente. Em comparação com a dengue, a infecção por ZIKV tem um quadro clínico moderado, o início da febre é mais agudo e mais curto, não sendo identificada hemorragia ou choque⁴⁰. A ZIKV em casos mais severos pode acometer o sistema nervoso central, sendo associada à síndrome de Guillian-Barré⁴¹. No Brasil, o Ministério da Saúde confirmou a relação entre o ZIKV e casos de microcefalia²⁵ e a Organização Mundial da Saúde emitiu um alerta epidemiológico sobre a associação da infecção ZIKV com malformações congênitas e síndromes neurológicas¹.

É importante ressaltar que as medidas de prevenção e de controle vetorial que visam à redução da densidade, são fundamentais, e se eficaz, pode prevenir a transmissão das três arboviroses dengue, CHIK e ZIK associadas ao *Aedes aegypti*, minimizando o impacto dessas doenças na população⁴².

3.2 Estratégias de controle populacional do vetor *Aedes aegypti*

O controle populacional do vetor é uma componente chave na prevenção e controle de doenças transmissíveis. A estratégia mais utilizada é a redução da abundância populacional do vetor *Aedes aegypti*². O manejo integrado trata do planejamento unificado de controle, de acordo com as condições ambientais e a dinâmica populacional do vetor. São usados os métodos de controle mais apropriados com o objetivo de manter as populações do vetor em níveis que não cause danos à saúde humana²⁹.

As estratégias de controle do *Aedes aegypti* são classificadas em controle mecânico, biológico e químico. O controle mecânico consiste na eliminação dos criadouros, como pneus, latas, garrafas, plásticos e limpeza de terrenos baldios⁴³. O controle biológico baseia-se na introdução de inimigos naturais para eliminar ou diminuir a população de mosquitos, por exemplo, o uso organismo do *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (*Bti*), a qual produz um cristal proteico com toxinas do grupo *Cry*, que é uma bactéria fermentada industrialmente, formulada e utilizada como inseticida⁴⁴⁻⁴⁵. Os cristais (corpos de inclusão) produzidos pela bactéria, quando no sistema digestório do inseto, que é um ambiente alcalino se dissolve ativando as toxinas do tipo *Cry* que causa danos celulares intensos e morte do inseto. *Bti* vêm sendo utilizados onde foi detectada resistência do *Aedes aegypti* ao inseticida químico organofosforado o temephos⁴⁶⁻⁴⁷. Utiliza-se também vários predadores, invertebrados aquáticos (como *Toxorhynchites* ou copépodos) ou peixes (*Gambusia sp.* e outros) que comem larvas e pupas⁵. Como controle biológico também usam mosquitos estéreis para produzirem uma população que não conseguem se reproduzir⁴⁸.

O uso de inseticidas químicos ainda é a principal componente de controle do vetor⁴⁹. O tratamento químico do tipo focal é uma das formas mais utilizadas para o controle do mosquito *Aedes aegypti*. Esse consiste na aplicação do inseticida nos criadouros que não podem ser eliminados. São utilizados larvicidas de baixa toxicidade para humanos e os demais mamíferos. No método perifocal, a aplicação do inseticida residual é feita aos arredores dos criadouros (recipientes) do mosquito em pontos estratégicos como, por exemplo, borracharias e ferros velhos^{30; 50}.

Para o controle dos mosquitos na fase adulta um dos métodos utilizados são os tratamentos espaciais com a aplicação de inseticidas por meio de termonebulizadores, aplicação conhecida como “fumacê”, ou ultrabaixo volume (UBV), que consiste na aplicação de gotas micropulverizadas de inseticidas no ar. O UBV tem sido utilizado quando há epidemias de dengue, diminuindo a densidade populacional do vetor^{8; 30}. Esse tipo de aplicação pode ser realizado com veículos, aviões e com equipamentos portáteis⁵¹.

Os inseticidas são classificados de acordo com a estrutura e funcionalidade química. As quatro classes de inseticidas de maior importância são: organofosforados, carbamatos, piretroides e neonicotinoides, os quais somam 70 % das vendas no mundo⁵². Estes inseticidas atuam no sistema nervoso e enzimático dos insetos e têm sido utilizados nos programas de controle químico de vetores para a redução da incidência de doenças transmitidas por insetos vetores⁴⁹.

A utilização intensiva, entretanto, provoca por pressão seletiva o desenvolvimento de resistência de uma população de mosquitos⁸. Os principais problemas causadores da resistência são o emprego de maiores concentrações, na tentativa de recuperar sua eficácia resultando no aumento da frequência de aplicação. Neste caso a substituição do produto é necessária. Estas consequências são ambientalmente negativas⁵³.

A resistência é definida como o desenvolvimento da capacidade de uma determinada linhagem de um organismo em tolerar diferentes doses de agentes tóxicos, que seriam letais para a maioria da população da mesma espécie^{49; 54; 55}. Em termos genéticos, a resistência é uma característica herdável, em que os alelos aumentam de frequência na população, como um resultado direto dos efeitos seletivos de um dado inseticida^{49; 56}.

A redução da susceptibilidade aos inseticidas por parte dos insetos pode ser causada por diferentes mecanismos, tais como: alterações comportamentais, na cutícula do inseto, nos sítios alvos dos inseticidas e a resistência por via metabólica. O mecanismo de resistência por alteração do sítio alvo é caracterizado por mutações em moléculas, como a enzima acetilcolinesterase e o canal de sódio voltagem que podem diminuir ou inviabilizar a ligação do inseticida ao seu alvo biológico. A resistência por via metabólica é baseada na metabolização acelerada de compostos químicos por três principais enzimas de detoxificação: como esterases, glutathione S-transferases (GSTs) e oxigenases P450^{57; 58}. Durante o processo de resistência, a superexpressão destas enzimas ou alterações em suas estruturas pode levar a metabolização ou sequestro do inseticida antes deste se ligar ao sítio alvo⁵⁹.

Por outro lado, existe a tentativa da produção de uma vacina eficaz para a dengue, estudos estão em andamento avaliando seis tipos de vacinas, sendo elas: (CYD-TDV), DENVax, TV003/TV005, TDENV PIV, V180 e a D1ME 100, a mais específica foi a que teve maior positividade, a CYD-TDV. A vacina CYD-TDV, é do fabricante Sanofi Pasteur, é uma vacina tetravalente, onde os genes que codificam as proteínas da pré-membrana e do envelope da cepa, utilizada na vacina de febre amarela, foram substituídos pelos genes de cada um dos quatro sorotipos da dengue^{60; 61}. A CYD-TDV provou-se uma vacina de grande eficácia, mas com maior positividade nos sorotipos DENV-3 e DENV-4, porém a estudos em andamento para esclarecer o porquê da CYD-TDV não desenvolver a mesma eficácia nos sorotipos DENV-1 e DENV-2⁶⁰. Ainda não foi divulgada uma data específica para a comercialização dessas vacinas, visto que é necessário um maior aprimoramento das mesmas. Entretanto, apesar de algum sucesso, estas ainda não se mostram efetivas, pois há custo elevado para a produção e não eficácia plena para a dengue e a cocirculação de outras doenças a CHIK e

ZIKV não viabilizam a utilização na imunização da população. O controle populacional do vetor é necessário e novas classes de inseticidas e/ou a substituição podem ser alternativas, além da aplicação de métodos físicos e agentes biológicos para o controle efetivo por maior período de formar a minimizar a resistência e a transmissão das doenças³¹.

Neste cenário o processo fotodinâmico é uma das ferramentas disponíveis para o controle do vetor das doenças transmitidas por insetos vetores⁶². O controle envolvendo processos fotoquímicos faz uso de fotossensibilizadores, e tem-se mostrado uma alternativa interessante como opção de baixo impacto ambiental, devido a propriedade degradativa da exposição à luz^{12; 63}. Estes compostos podem ser utilizados em baixa concentração, uma vez que se utiliza de energia da luz para gerar toxicidade *in vivo* ou *in situ*⁶². As substâncias fotoativas mostram-se eficazes para matar larvas de uma variedade de insetos, incluindo mosquitos¹². Essas substâncias pertencem a várias classes de compostos químicos como acridinas, furocumarinas, tiofenos, fenotiazinas, porfirinas, tetrametilsilano e xantenos.

3.3 Histórico da Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é definida como uma reação fotoquímica utilizada com o objetivo de causar destruição seletiva de um tecido. A TFD é uma técnica terapêutica na qual se utiliza de uma droga sensibilizante, tópica ou sistêmica, em seguida utiliza-se irradiação de luz visível ou visível próximo^{64; 65}. Os relatos na literatura mostram que os primeiros registros da utilização desta técnica ocorreram há 4000 anos por egípcios, chineses e indianos para o tratamento de psoríases, vitiligo e raquitismos, sendo realizada a administração de uma planta (*Amni majus*) por via oral e em seguida a exposição à luz solar¹⁶.

Em 1900 Oscar Rabb descreveu o efeito letal do corante alaranjado de acridina, 3,6-dimetilaminoacridina ($C_{13}H_9N$) agindo em conjunto com a luz solar sobre um tipo de protozoário durante uma tempestade com raios, demonstrando que o protozoário podia morrer sob essas condições^{65; 66}. Ele postulou que a alteração das condições luminosas do ambiente pode transferir energia da luz para a substância química, semelhante ao que ocorre nas plantas no processo de fotossíntese⁶⁷. A ação do corante na presença da luz permitiu a identificação de uma substância fotossensibilizante⁶⁸.

Em 1901 Niels Finsen, desenvolveu a fototerapia ou o uso da luz para tratar doenças, demonstrando que a exposição à luz vermelha impedia a formação de pústulas de varíola, para o tratamento de tuberculose cutânea e *Lupus vulgaris*, uma doença de pele, por meio de calor (infravermelho)⁶⁰⁻⁶⁹.

Em 1903, o dinamarquês, Niels Finsen, ganhou o prêmio Nobel de Medicina com suas descobertas, e aprimorou a fototerapia no tratamento de doenças da pele⁶⁰. Neste mesmo ano os pesquisadores Tappeiner e Joddlbauer, realizaram a primeira aplicação clínica da terapia fotodinâmica com o uso tópico de eosina e exposição à luz para o tratamento de câncer de pele^{70; 71}. Tappenier (1907) definiu que a presença de oxigênio (O₂) é essencial para ocorrer a fotossensibilização. Sendo assim, a TFD é o efeito combinado de luz, oxigênio molecular e fotossensibilizador⁷¹. Na **Tabela 1**, encontram-se resumidos os principais eventos cronológicos do desenvolvimento da TFD⁶⁹.

Tabela 1: Principais eventos do desenvolvimento da TFD⁶⁹.

Ano	Cronograma da história da terapia fotodinâmica
1900	Oscar Raab demonstrou os efeitos tóxicos da combinação de acridina e a luz sobre um protozoário.
1901	Niels Finsen usou luz para tratar a varíola e tuberculose cutânea.
1903	Niels Finsen recebeu o Prêmio Nobel por seu trabalho sobre a fototerapia.
1903	Herman Von Tappeiner e A. Jesionek utilizou a eosina tópica e luz branca para tratamento de tumores na pele.
1907	Von Tappeiner e A. Jodlbauer introduziu a terminação fotodinâmica.
1911	W. Hausmann descreveu os efeitos tóxicos e fotossensíveis de hematoporfirina sobre a pele de camundongos.
1913	Friedrich Meyer-Betz realizou o primeiro estudo com terapia fotodinâmica (TFD) com porfirinas em suas próprias mãos.
1955	Samuel Schwartz desenvolveu um derivado de hematoporfirina (HPD) por acetilação e redução da hematoporfirina; duas vezes mais fototóxica como hematoporfirina
1960	Richard Lipson e Baldes relataram o acúmulo de HPD e seu uso na fotodeteção de tumores.
1972	I. Diamond demonstrou a fototoxicidade de hematoporfirina contra gliomas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .
1975	Thomas Dougherty tratou com sucesso pacientes com câncer de pele.
1975	JF Kelly utilizou HPD para tratar o câncer de bexiga em humanos.
1978	Dougherty realizou o primeiro estudo clínico controlado em humanos.
1999	O primeiro produto químico para a TFD foi aprovado no Canadá.

A TFD tem-se mostrado promissora para o tratamento de câncer e outras doenças. É considerada uma modalidade médica de tratamento que poderá ser utilizada de forma independente ou ser combinada com quimioterapia, cirurgia, radioterapia ou outras estratégias terapêuticas^{68, 69}.

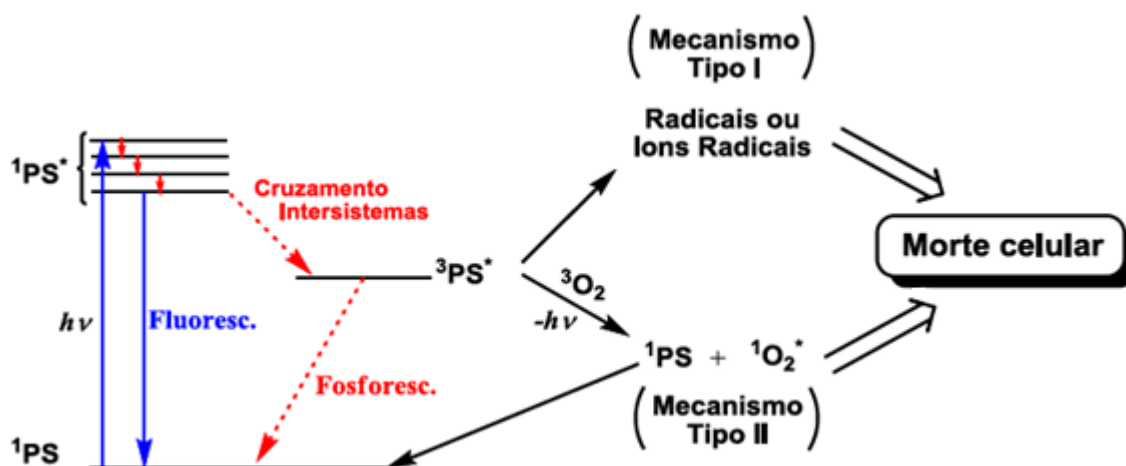
3.4 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

A ação da TFD baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um cromóforo (corante/fotossensibilizador) não tóxico sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado⁷². A ação da luz sobre o fotossensibilizador inicia processos fotofísicos, culminado em processos fotoquímicos em cadeia, que se propagam na presença de oxigênio e promovem ataque por radicais livres e/ou espécies oxidantes para desencadeamento de processo fotobiológico de morte celular (apoptose) e destruição do tecido biológico, componentes de células tumorais, vírus, fungos e bactérias^{16; 72}.

O mecanismo da TFD considera a absorção de fótons pelo fotossensibilizador em comprimento de onda na região do visível. Neste processo o estado fundamental singlete 1PS é excitado para o estado excitado singlete ($^1PS^*$), podendo decair para seu estado fundamental através da emissão de luz ou através de relaxação vibracional, gerando calor ou ainda ocorrer o processo de cruzamento intersistemas, no qual sofre a inversão de spin, conduzindo a molécula para o estado excitado tripleto ($^3PS^*$)^{73; 74}. A energia do estado excitado tripleto ($^3PS^*$) pode ser dissipada pelo processo de fosforescência, devolvendo a molécula para o estado 1PS , como ilustrado na **Figura 1**. Contudo, no estado $^3PS^*$ muitos pigmentos orgânicos possuem níveis de energia adequados para realizar transferência de energia para o oxigênio molecular (O_2). Assim, a molécula de O_2 , que ocorre naturalmente no estado tripleto (3O_2), é fotoexcitado pelo fotossensibilizador ($^3PS^*$) indo para o estado singlete ($^1O_2^*$)⁷⁵ podendo reagir com biomoléculas e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês, *reactive oxygen species*) tais como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e radical superóxido que destrói por oxidação as células⁷³.

Durante o processo de reação TFD, pode ocorrer por dois mecanismos de reação: a) transferência de elétrons ou b) transferência de energia, que são chamados de mecanismo Tipo I e Tipo II, respectivamente.

Figura 1. Diagrama de Jablonski simplificado – mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas por luz⁷⁵, sendo ¹PS: estado fundamental singlete (¹PS); $h\nu$: energia; ¹PS*: estado singlete excitado; ³PS*: estado tripleto excitado; ³O₂: estado tripleto oxigênio; ¹O₂: estado singlete.



No mecanismo **Tipo I** ocorre transferência de elétron ou abstrai um átomo de hidrogênio entre o fotossensibilizador no estado excitado tripleto com um substrato, ocorrendo reações de oxido-redução que causam danos diretos aos sistemas biológicos a partir da produção de ROS, como superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH^{\cdot})^{68; 74-75}.

No mecanismo do **Tipo II** a ação fotodinâmica é mediada pelo oxigênio singlete (¹O₂), uma espécie altamente reativa, gerada através da reação do fotossensibilizador excitado com o oxigênio molecular (³O₂), espécie essa naturalmente no estado fundamental encontrada no estado tripleto^{68; 69; 76}.

As reações dos mecanismos **Tipo I** e **Tipo II** podem ocorrer simultaneamente e dependem das propriedades físico-químicas do fotossensibilizador, da concentração do substrato e de oxigênio, assim como a afinidade de ligação do fotossensibilizador a uma determinada enzima^{68; 76}. No geral as espécies produzidas no mecanismo **Tipo II** (oxigênio singlete), são comumente as mais relevantes para a TFD⁷⁷.

3.5 Fotossensibilizadores

O fotossensibilizador é uma substância cromófora (corante), tornando o principal agente ativador do processo fotodinâmico. No entanto, os fotossensibilizadores devem ter características adequadas para serem utilizados em TFD⁷⁶⁻⁷⁸. O fotossensibilizador deve ser distribuído de forma localizada, absorver comprimentos de onda adequados, produzir a ação biológica desejada e ao mesmo tempo apresentar mínimos efeitos colaterais. O fotossensibilizador ideal deve satisfazer os seguintes requisitos^{76-77; 79-80}:

- Ser quimicamente puro e de composição conhecida;

- Devem ter baixos níveis de toxicidade no escuro para os seres humanos e animais e só ser citotóxico na presença da luz;
- Ser preferencialmente retido pelo tecido alvo;
- Ser rapidamente excretado do corpo, induzindo baixa toxicidade sistêmica;
- Ter alto rendimento quântico para o evento fotoquímico;
- Ter uma forte absorção a um comprimento de onda no intervalo de 600-800 nm (conhecida como janela terapêutica) onde ocorre absorção de luz pelos tecidos.

O fotossensibilizador pode sofrer reações de fotodegradação, causando modificações na sua estrutura. A molécula sofre reação, e pode perder a conjugação química e o produto não irá mais absorver luz no comprimento de onda de incidência, deixando assim de exercer a ação fototóxica⁸¹. A fotodegradação é evidenciada pelas mudanças nos espectros de absorção, interferindo na eficiência de processos relativos à TFD. Por outro lado, os processos de fotodegradação do fotossensibilizador são favoráveis à aplicação terapêutica quando se pensa em eliminação do fotossensibilizador do organismo e diminuição dos efeitos colaterais prolongados⁸².

Para ser viável a síntese de um fotossensibilizador deve ser relativamente fácil e os materiais de partida prontamente disponíveis para a produção em larga escala. O fotossensibilizador deve ter uma vida de prateleira estável, e idealmente ser solúvel em água ou solúvel em mistura de solventes aquosos que sejam atóxicos. Ele não deve agregar indevidamente em ambientes biológicos, o que pode reduzir sua eficiência fotoquímica⁷⁶.

Os principais fotossensibilizadores utilizados na TFD contra o câncer são os tetrapirrólicos (porfirinas, clorinas, bactericlorinas e ftalocianinas) devido a sua baixa toxicidade intrínseca em células de mamíferos e pelas características específicas de localização tecidual. Para os microrganismos os fotossensibilizadores estudados pertencem a diferentes grupos de compostos, como os xantênicos, fenotiazínicos, acridinas e conjugados de clorina⁸²⁻⁸⁴.

3.5.1 Clorofilas

Dentro da classificação dos derivados porfirínicos, as clorofilas pertencem à classe das clorinas. As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o metal magnésio (Mg), a clorofila é o principal pigmento fotossintético das plantas. A estrutura da clorofila é um macrocíclico assimétrico totalmente insaturado constituído por quatro anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, localizado ao lado do

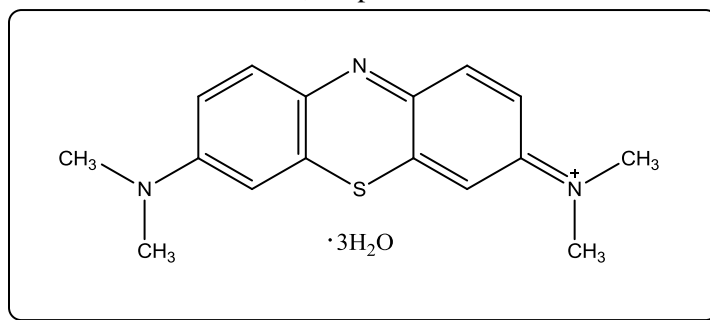
tempo de vida longo, o que possibilita um alto rendimento quântico, favoráveis à formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)⁹²⁻⁹³. Essas propriedades são extremamente favoráveis para a TFD^{77; 82}.

Clorofila e seus derivados têm sido usados como fotossensibilizador em processos fotodinâmico, a Chl *a* foi testada como fotossensibilizador para o tratamento de acne vulgar⁹⁴. Recentemente a clorofilina foi testada em larvas de *Chaoborus crystallinus* e demonstrou-se que as larvas podem ser mortas através de processos fotodinâmicos⁹⁵⁻⁹⁶. Os derivados de clorofila foram aplicados em larvas dos mosquitos *Culex sp* e mostrou ser eficiente para controle de larvas dos mosquitos com 50 % de mortalidade nos organismos testados⁹⁶. Estudo a base de fotossensibilização foi realizado com a clorofilina sódica (Na-Chl) em morangos com a possibilidade de controlar a contaminação microbiana. O estudo conclui que a fotossensibilização pode ser uma técnica de descontaminação microbiana eficaz, não térmica e ambientalmente amigável que amplia a vida útil de morangos, sem qualquer impacto negativo sobre a atividade antioxidante, e fenóis, antocianinas ou formação de cor⁹⁷. Os estudos da aplicação da clorofila e seus derivados oferecem referências para estudar os mecanismos de processos fotodinâmicos.

3.5.2 Azul de Metileno

O azul de metileno (AM), é um corante catiônico, cuja nomenclatura oficial é cloreto de 3,7- bis (dimetilamino) feniltiazin-5-íio ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$), é um fotossensibilizador que pertence à classe dos corantes fenotiazínico. Em meio aquoso tem coloração azul, sua estrutura é heteroaromáticos tricíclicas planar, altamente conjugada, como ilustrada na **Figura 3**, e pode formar agregados de acordo com as condições do meio⁹⁸, é um composto que possui uma estrutura básica de caráter hidrofílico, porém quando metilado apresenta hidrofobicidade^{99,100,101,102}.

Figura 3. Estrutura química do azul de metileno⁹⁸, adaptada.



O AM é usado como indicador e corante bacteriológico, apresentando diversas aplicações nos mais variados campos, como da biologia e química. O AM é um fotossensibilizador que possui grande propensão à formação de ROS, mediado pelo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). A banda de absorção do AM é intensa na região entre 600-700 nm, sendo essa a região útil do espectro para aplicações envolvendo a TFD, o que permite uma eficiente penetração da luz nos tecidos^{98;100}. Dependendo do estado de agregação molecular do AM, diversas características fotofísicas e fotoquímicas são alteradas¹⁰¹. Este fato pode alterar a eficiência da fotossensibilização, diminuindo a quantidade de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) gerada¹⁰¹⁻¹⁰².

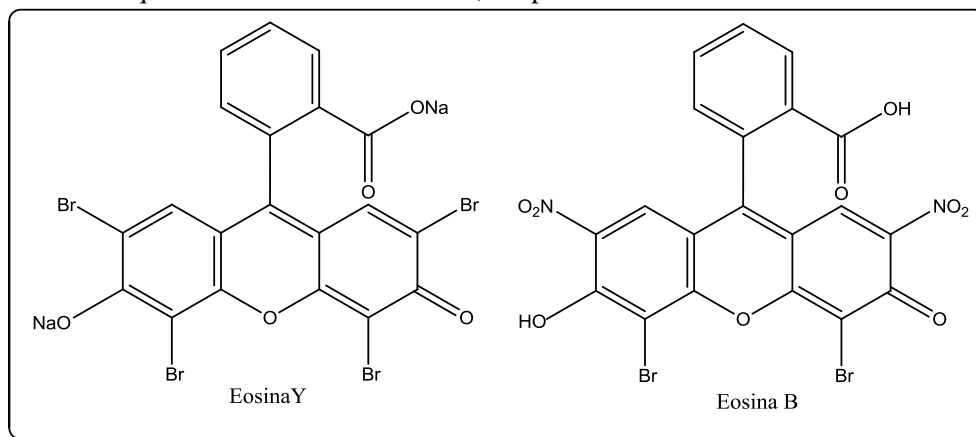
O AM possui baixa toxicidade em humanos. O uso seguro do AM é atestado há quase um século e suas aplicações, entre outras, incluem sua administração tópica oral como antisséptico, desinfetante e antídoto para envenenamento por nitrato¹⁰³.

As aplicações do AM em TFD podem ser realizada no tratamento de câncer de bexiga e, recentemente, contra tumores de esôfago inoperáveis, virulências da pele, psoríase (inflamação da pele) e adenocarcinomas (tecido glandular ou células que tem características secretórias)¹⁰⁴. É empregado em desinfecção viral do sangue¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ e na descontaminação de uma variedade de vírus congelado em plasma fresco¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. É eficaz para a inativação de vírus, bactérias e leveduras¹⁰⁷. Além de ser usado como marcador em procedimento de cirurgia¹¹⁰. O AM é um potencial fotossensibilizador para TFD, que pode ser usado para o tratamento de várias doenças¹⁰⁷.

3.5.3 Eosinas

A eosina define um conjunto de corantes. As eosinas mais comuns são: eosina Y (Y do inglês *yellow eosin*) ($\text{C}_{20}\text{H}_6\text{O}_5\text{Br}_4\text{Na}_2$) e a eosina B (B do inglês *blue eosin*) ($\text{C}_{20}\text{H}_8\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_9$), são fotossensibilizadores que pertencem à classe dos corantes xantenos. Os xantenos são compostos aniônicos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear com um átomo de oxigênio no centro do anel¹¹¹⁻¹¹², mostrado na **Figura 4**.

Figura 4. Estrutura química da eosina Y¹¹³ e B¹¹⁴, adaptada.



A mistura de eosina Y, azur 1 e AM produz a eosina azul de metileno (EAM)¹¹⁵. O corante EAM, utilizado neste trabalho é uma mistura de corante produzido por mistura de azur II (mistura equimolar de azur 1 e azul de metileno) e eosinato de azur II (corante formado pela combinação equimolar de azur 1, azul de metileno e eosina Y)¹¹⁵⁻¹¹⁶. O corante azur 1 é um análogo do AM desmetilado^{106; 117}.

Os xantenos apresentam bandas de absorção intensas na região verde do espectro visível, com a absorvância máxima entre 480 e 550 nm. No entanto, pode ocorrer deslocamentos da posição das bandas para a região vermelho devido ao número de substituintes de halogênio (bromo ou iodo) na estrutura da molécula, aumentando a massa molecular. Esses substituintes influenciam na eficiência fotodinâmica dos xantenos e aumentam o rendimento de cruzamento intersistema para o estado tripleto¹¹⁸. Uma característica importante dos corantes xantenos é a não ligação à membrana celular e localizam-se no citoplasma¹¹¹⁻¹¹². Os corantes dessa família são solúveis em água e são utilizados para coloração têxtil e alimentos¹¹⁹.

Este corante tem utilizações medicinais e seu mecanismo de ação tem sido amplamente investigado, para aplicação em fotodinâmica¹²⁰⁻¹²¹. Por exemplo, no ano de 1903, três pacientes com câncer de pele tornaram-se os primeiros a serem tratados com a TFD tópica usando eosina e uma combinação de luz solar e luz artificial¹²². Além do câncer foram tratadas com eosina outras doenças como lúpus e condilomas genitais em seres humanos através da aplicação tópica de eosina como fotossensibilizador e a combinação com a luz branca¹²⁰⁻¹²¹. Na década de 1980, eosina foi recomendada para uma série de doenças de pele no ABC de Dermatologia, incluindo: eczema; infecção de úlceras nas pernas; psoríase úmido¹²⁰⁻¹²⁴. Atualmente a eosina usada é como fotossensibilizador para tratamentos dermatológicos¹²².

A eosina Y possui atividade fotodinâmica em bactérias e fungos^{84; 125} extensivamente aplicada na quantificação e coloração de proteínas¹²⁶. Há diversas aplicações para o eosina B como em método simples, rápido e estável para a estimativa de proteínas¹²⁷. A eosina é aplicada em processo fotocatalítico, pois degrada na presença de TiO₂, irradiado com luz visível¹²⁸.

3.6 Fontes de luz

A radiação empregada em TFD é a luz nas regiões do visível e/ou do infravermelho próximo. O comprimento de onda escolhido estará diretamente relacionado com o fotossensibilizador a ser utilizado^{76; 129-130}. Para ativar as substâncias fotossensibilizadoras responsáveis pelo processo fotodinâmico é necessário o uso de luz com frequência ressonante com o nível de absorção óptica da referida substância.

Qualquer fonte emissora de luz de comprimento de onda adequado pode ser utilizado para TFD, lâmpadas, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação - laser (LASER do inglês *Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) ou diodos emissores de luz - LED (LED do inglês *Light Emitting Diode*). A ação dessas fontes depende do espectro de emissão, da distribuição espacial da luz e da potência da radiação¹³¹.

As primeiras fontes de luz utilizadas em TFD foram lâmpadas convencionais, uma luz não coerente, policromática e com um forte componente térmico associado. Com a descoberta do laser, este passou a substituir as demais fontes de luz, pois possuem certas características que os tornam especialmente adequados. Os lasers são capazes de proporcionar uma luz intensa com um elevado grau de monocromaticidade (apenas um comprimento de onda), o que torna a focalização do feixe de luz para uma fibra óptica possível, sem grande perda de energia¹²⁹. Entretanto os lasers podem ser acoplados em fibras ópticas para fornecimento de luz, como exemplo, para realização de endoscopia, locais onde é de difícil acesso nas cavidades corporais. No entanto, lasers oferecem uma alta potência, limitando a sua versatilidade, além ser caros, inviabilizando o uso em larga escala¹³⁰.

Com o avanço constante da tecnologia fotônica, novas fontes de luz são constantemente desenvolvidas e uma alternativa é a utilização de LED's para uso em TFD¹³²⁻¹³³. Os LED's são compactos, leves e requerem significativamente menos energia para produzir os comprimentos de onda desejados, baixo custo e emissão mais ampla, quando comparado com os lasers¹²⁹. Além disso, podem ser dispostos em diferentes inclinações para compensar áreas anatômicas de difícil acesso. Protótipos para a utilização de LED em TFD

estão atualmente em desenvolvimento¹³³. Estes sistemas possuem potências de saída de até 150 mW cm^{-2} ao longo de $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ de área¹³².

CAPÍTULO IV

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Fotossensibilizador

Nesse estudo foram utilizados três tipos de fotossensibilizadores: Extrato natural de clorofilas obtido da *Vicia faba* (EXCL); e os corantes sintéticos azul de metileno (AM) $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ (Dinâmica - P.A) e eosina azul de metileno segundo Giemsa (EAM) $C_{14}H_{14}ClN_3S$ (Vetec).

4.2 Cultivo das plantas

A planta utilizada para obtenção do extrato da clorofila foi a *Vicia faba* popularmente conhecida como feijão-fava¹³⁴. As sementes foram fornecidas por Isla Sementes® e tratadas com 0,15% de Captan 750, e semeadas em vasos contendo substrato constituído de húmus, cinza, matéria-orgânica, arenito moído e calcário (150 g de substrato em cada vaso com duas sementes). O cultivo foi realizado em câmara de germinação com fotoperíodo (modelo SL-224/364) de 8 horas de exposição à luz na temperatura de 25 °C e 16 h de exposição a 18 °C, por um período de quatro semanas para a coleta das folhas.

4.3 Obtenção do Extrato

As folhas da *Vicia faba* foram coletadas, lavadas em água corrente. Após isso foram submetidas a um banho com água a temperatura de 100 °C durante 2 min para eliminação de microrganismos. Posteriormente, as folhas foram lavadas com água destilada e em seguida secas com toalhas de papel para retirar o excesso de água. O procedimento utilizado para a extração foi um método adaptado^{77; 85} para a extração. As folhas foram trituradas e colocadas em um erlenmeyer de 500 mL (protegido da luz) na proporção de 150g: 150 mL de metanol (CH_3OH) (Synth - P.A) e 75 mL de éter de petróleo (Vetec - P.A). O processo de extração ocorreu em banho de gelo e agitação durante 30 min com o auxílio de um bastão de vidro. A solução do extrato foi armazenada em recipiente âmbar, o procedimento de extração foi realizado mais duas vezes. Na etapa final da extração, lavou-se as folhas com uma mistura de 45 mL de éter de petróleo e 45 mL de éter dietílico (C_2H_5)₂O (Vetec - P.A). O extrato foi transferido para um funil de decantação de 500 mL para separação das fases que se originou durante o processo de extração (orgânica e aquosa). A fase orgânica contendo éter de petróleo foi lavada com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec - P.A) por três vezes e água destilada.

Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) (Vetec - P.A), em seguida filtrada a vácuo. O filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo protegido da luz e rotaevaporado a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 min, com uma pressão de 650 mmHg a 75 rotações por minuto em um rotaevaporador (IKA® RV 10 basic.). Em seguida com uma espátula transferiu-se o extrato para um recipiente âmbar sendo armazenado em ambiente refrigerado.

4.4 Caracterização do comportamento óptico dos fotossensibilizadores: Absorção UV-Visível

A determinação da região de máximo de absorção de cada fotossensibilizador foi realizada através de um espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Varian). O espectrofotômetro de absorção molecular tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio, um monocromador Czerny-Turner 0,25 m e um detector de Si. As medidas de absorção foram realizadas no intervalo de comprimento de onda de 200 a 800 nm, usando cubeta quartzo de quatro faces polidas de 10 mm de caminho óptico.

Para realizar as medidas de absorção UV-Vis, o EXCL foi solubilizado em metanol grau HPLC 99% (Sigma-Aldrich S/A), na concentração de 0,0786 mg mL⁻¹. Os corantes AM e a mistura EAM foram solubilizados em meio aquoso (separadamente), nas concentrações de 0,0462 mg mL⁻¹ e 0,0350 mg mL⁻¹, respectivamente.

4.5 Obtenção das larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* e manutenção da criação

Para a execução dos bioensaios fotodinâmicos foi necessário à manutenção da criação dos mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller). Os mosquitos adultos foram alimentados com mel embebido em algodão, e para as fêmeas foi oferecida alimentação sanguínea, por meio da exposição á *hamster* anestesiado (Conselho de Ética; protocolo nº 012/2014-CEUA/UFGD) (anexo I). Após a alimentação sanguínea foi colocado um recipiente com água e papel filtro para as fêmeas realizarem a oviposição. Os mosquitos foram mantidos em sala de criação do Laboratório de Insetos Vetores/LIVE-(UFGD) com temperatura de aproximadamente 28±2 °C, com umidade relativa de 60±5% e fotoperíodo: 10 horas no escuro e 14 horas de luz.

Ovos de *Aedes aegypti*, em papel filtro, foram colocados para eclosão das larvas, em bandejas plásticas com aproximadamente 2 L de água de torneira e alimentadas com ração (Alcon) para peixe (ração macerada e dissolvida em água). Foram utilizadas larvas de 3º estágio para avaliar a eficiência fotodinâmica dos fotossensibilizadores.

4.6 Determinação do tempo de internalização

O tempo de internalização (TI) dos fotossensibilizadores no sistema digestório das larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* foi determinado com a realização de imagens de microscopia óptica (MO).

A solução estoque do fotossensibilizador EXCL foi preparada na concentração de 100 mg mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec) e em seguida diluída para a concentração de trabalho de 0,1 mg mL⁻¹. As soluções dos fotossensibilizadores AM e EAM foram preparadas em meio aquoso na concentração de 0,1 mg mL⁻¹.

A exposição das larvas aos fotossensibilizadores foi realizada transferindo-se 5 larvas para uma placa de petri de fundo redondo tamanho 60 x 15 mm com diâmetro interno de 52 mm, onde adicionou-se 5 mL do fotossensibilizador. Aguardou-se 5 min e logo após transferiu-se as larvas para um papel filtro para retirar o excesso de líquido. Em seguida, utilizando um pincel, colocou-se as larvas individualmente sobre uma lâmina de microscopia e adicionou-se uma gota de água destilada e lamínula. Quando necessário, bolhas de ar foram retiradas posicionando-se as lâminas a 90° e adicionando-se gotas de água entre a lamínula e lâmina. As imagens foram obtidas utilizando-se o software TSVIEW 7.1.1.7 para capturar as imagens em microscópio trinocular acoplado a uma câmera fotográfica TA-0124 (1.3MP).

Os tempos em que as imagens foram realizadas são o tempo zero sendo considerado o primeiro contato da larva com a solução do fotossensibilizador, e em seguida de 5 em 5 min até 45 min foi determinado como tempo de trânsito (TT). A última imagem foi obtida com 120 min determinado como tempo de internalização (TI). Após realizar a primeira imagem da larva com 5 min de exposição ao fotossensibilizador, a cada 5 min foi colocado um grupo novo de 5 larvas na solução de fotossensibilizador, as imagens representativas foram obtidas de diferentes larvas. Repetindo-se o procedimento inicial de exposição aos fotossensibilizadores em triplicata (3X).

4.7 Condições fotodinâmica *in vivo* sobre larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*

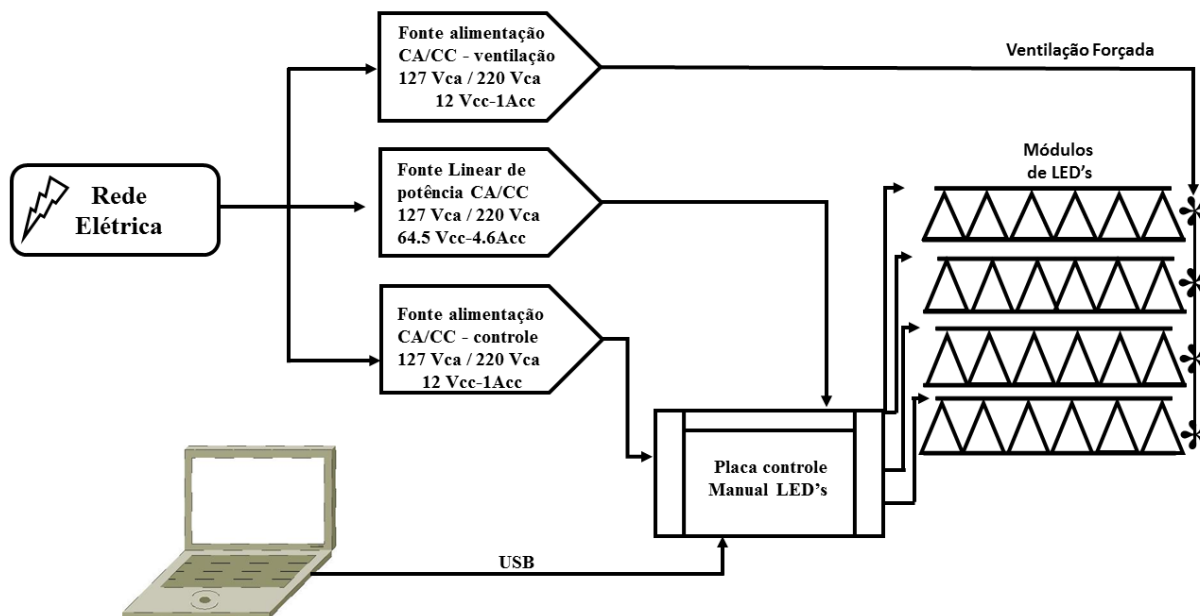
4.7.1 Fontes de Irradiação

LED

A irradiação foi realizada com luz branca, utilizando um conjunto de 24 LED's RGB, denominado de sistema de irradiação. O sistema de irradiação utilizado no estudo foi

desenvolvido por pesquisadores do Grupo de Óptica Aplicada (GOA) da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, ilustrado no **Esquema 1**.

Esquema 1: Diagrama simplificado do sistema de irradiação.



Fonte: Autor

Na **Tabela 2** são apresentados os parâmetros individuais para as cores do LED's RGB e intensidade de irradiação.

Tabela 2: Parâmetros das cores individual do LED RGB utilizados na TFD.

Parâmetros	Azul	Verde	Vermelho
Comprimento de onda (nm)	450	525	625
Intensidade (mW/cm ²)	(8,9 ± 0,1)	(8,9 ± 0,1)	(8,9 ± 0,1)

A intensidade de irradiação foi obtida através da medida de potência considerando a área do sensor de 0,785 cm², sendo a potência medida através do medidor de potência (Newport/1917-R), nos comprimentos de onda 450, 525, e 625 nm.

A luz branca utilizada para realizar o controle fotodinâmico foi à composição das três cores do LED's RGB. As larvas foram expostas a estas condições de irradiação em ambiente com temperatura controlada de 25 ± 2°C e umidade relativa 60 ± 5 %.

LUZ SOLAR

A intensidade da luz visível do sol é chamada de iluminação e pode ser medida em lux. A iluminância é o fluxo luminoso total incidente sobre uma superfície por unidade de área. O experimento foi realizado ao lado do prédio dos laboratórios de Agroenergia e Conservação Ambiental (INPAC), no Campus da Universidade Federal da Grande Dourados, no município de Dourados (MS), situada a uma altitude de 453 m, latitude 22° 11' 58" S e longitude 54° 56' 3" W em 19/01/2016.

As medidas de intensidade luminosa foram realizadas entre 13h30min e 19h30min no horário de verão com o auxílio de um luxímetro (marca TES[®], modelo TES 1332), mantendo o mesmo sobre um suporte de madeira com altura de 88 cm e largura de 47 cm em paralelo com o solo, fixo ao nível das amostras. As medidas de temperatura e umidade relativa do ar foram realizadas utilizando um termohigrometro digital INT -50+70 EXT -10 +70 (marca: J. Prolab), posicionado ao nível das amostras sobre o suporte de madeira.

4.7.2 Parâmetros e tratamentos usados para realizar o controle fotodinâmico

Preparo e aplicação das soluções dos fotossensibilizadores sobre as larvas

EXCL:

A solução do EXCL foi preparada como descrito na seção 4.6, em seguida, está solução foi diluída para as concentrações 0,05 mg mL⁻¹ e 0,01 mg mL⁻¹ em balão volumétrico de 250 mL.

AM e EAM

Os corantes AM e EAM foram preparados na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ com dissolução do corante de cada composto em béquer com água destilada e em seguida transferiu-se as soluções para balões volumétricos de 250 mL seguida da diluição para as concentrações de 0,05 mg mL⁻¹ e 0,01 mg mL⁻¹.

Os tratamentos e parâmetros usados nos bioensaios de controle fotodinâmico para investigar a eficiência dos fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM nas larvas de *Aedes aegypti* sob ação da luz branca de LED's RGB estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Tratamento realizado em larvas de *Aedes aegypti* nos bioensaios com os fotossensibilizadores EXCL, AM e EMA.

Tratamentos	Parâmetros
Concentração (mg mL ⁻¹)	0,1; 0,05 e 0,01
Tempo de irradiação (min)	60

Com base nos resultados obtidos com os experimentos de controle fotodinâmico realizou-se novos bioensaios com o fotossensibilizador EAM que apresentou melhores resultados de mortalidade das larvas. Utilizaram-se seis concentrações e três tempos de irradiação; os tratamentos e parâmetros usados nos experimentos estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4: Tratamento realizado em larvas de *Aedes aegypti* de 3º estágio para o bioensaio com o fotossensibilizador EMA.

Parâmetros	
Concentração (mg mL ⁻¹)	0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 e 0,0005
Tempo de irradiação (min)	15; 30 e 60

Na **Tabela 5** estão representadas as doses de energia utilizadas no controle fotodinâmico, obtida por meio de diferentes tempos de irradiação. Essas doses foram calculadas através da equação 1.

$$D = I \cdot t \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

D: dose de energia em J cm⁻²

I: intensidade de luz em mW cm⁻²

t: tempo de irradiação em segundos (s)

Sendo que 1 J = 1 W x s

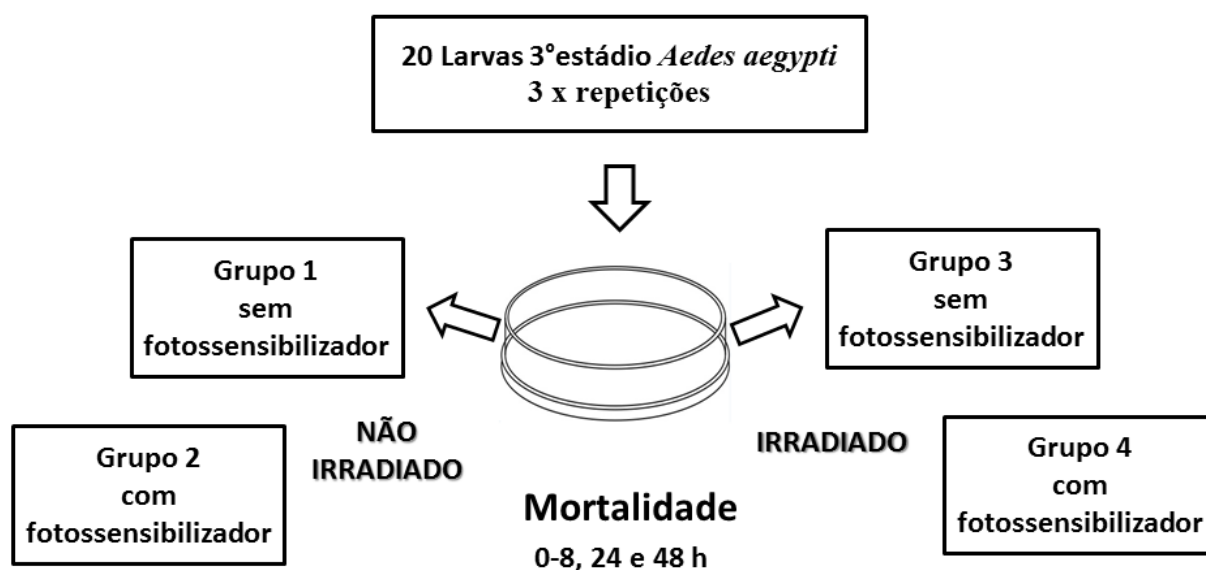
Tabela 5: Dose de energia considerando diferentes tempos de irradiação.

Tempo de irradiação (min)	Dose (J cm ⁻²)
15	8,2
30	16,2
60	32,4

4.7.3 Controle Fotodinâmico LED

Para realizar os experimentos de fotossensibilização 20 larvas de *Aedes aegypti* foram transferidas para uma placa de petri de fundo plano tamanho 60 x 15 mm com diâmetro interno de 52 mm, em seguida foi adicionado 20 mL do fotossensibilizador. O **Esquema 2** ilustra, os tratamentos realizados nos experimentos.

Esquema 2. Desenho experimental dos bioensaios realizado com larvas de *Aedes aegypti* *in vivo*.



Fonte: Autor

Os bioensaios *in vivo* utilizando a fonte de irradiação de LED's foram planejados com quatro grupos experimentais: (1) controle; (2) fotossensibilizador; (3) irradiação LED; (4) controle fotodinâmico. O grupo experimental de maior interesse foi o do controle fotodinâmico (4), que consiste no tratamento de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* com solução de fotossensibilizador seguida da irradiação.

O controle desse grupo experimental e os demais foram organizados, da seguinte forma. O controle negativo (1) foi aquele em que as larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* não foram submetidas a nenhum tratamento, sendo mantidas em água destilada. O grupo tratado com o fotossensibilizador (2) foi semelhante ao grupo tratado com controle fotodinâmico, porém não houve a irradiação com os LED. Na sequência o grupo tratado com LED (3) era semelhante ao grupo controle negativo, porém recebeu irradiação com LED, na mesma intensidade e tempo que o grupo tratado com controle fotodinâmico. Os experimentos com os quatro grupos experimentais foram realizados em paralelo. A irradiação ocorreu após 120 min (TI) de exposição das larvas a solução de fotossensibilizador foi procedida à aplicação da

irradiação com LED. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada grupo experimental em cada experimento. O número de larvas usados em cada repetição foi de 20 larvas de *Aedes aegypti*.

Em seguida após a irradiação foi monitorada, a mortalidade das larvas nas primeiras 8 horas (480 min) de experimento, depois com 24 horas (1440min) e 48 horas (2880min). O critério de mortalidade assumido foi o de larvas que não reagiriam ao estímulo do toque de um pincel e estavam incapacitadas de alcançar a superfície¹³⁵.

4.7.4 Controle Fotodinâmico Luz solar

Os bioensaios utilizando a fonte de irradiação luz solar foram planejados com quatro grupos experimentais: (1) controle; (2) fotossensibilizador; (3) irradiação luz solar; (4) controle fotodinâmico. O grupo experimental de maior interesse foi o do controle fotodinâmico (4), que consiste no tratamento de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* com solução de fotossensibilizador seguida da exposição a luz solar.

O controle negativo (1) foi aquele em que as larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* não foram submetidas a nenhum tratamento, permaneceram em água destilada. O grupo tratado com o fotossensibilizador (2) foi semelhante ao grupo tratado com controle fotodinâmico, porém, não houve a incidência de irradiação solar. Esses dois grupos foram mantidos sob as mesmas condições experimentais dos que estavam expostos à luz solar, porém foram protegidos da radiação. Na sequência o grupo tratado com irradiação solar (3) era semelhante ao grupo controle negativo, porém recebeu a mesma intensidade e tempo de irradiação solar que o grupo tratado com controle fotodinâmico. Os experimentos de fotossensibilização foram conduzidos de acordo com item 4.7.3, porém após o período de internalização do fotossensibilizador as larvas foram expostas a irradiação da luz solar.

As leituras de mortalidade larval foram realizadas iniciando em 20 min após a exposição das larvas ao sol, e seguindo a cada 20 min até 6 h de leitura e exposição à luz solar. O critério de mortalidade assumido foi o de larvas que não reagiriam ao estímulo do toque de um pincel e estavam incapacitadas de alcançar a superfície¹³⁵.

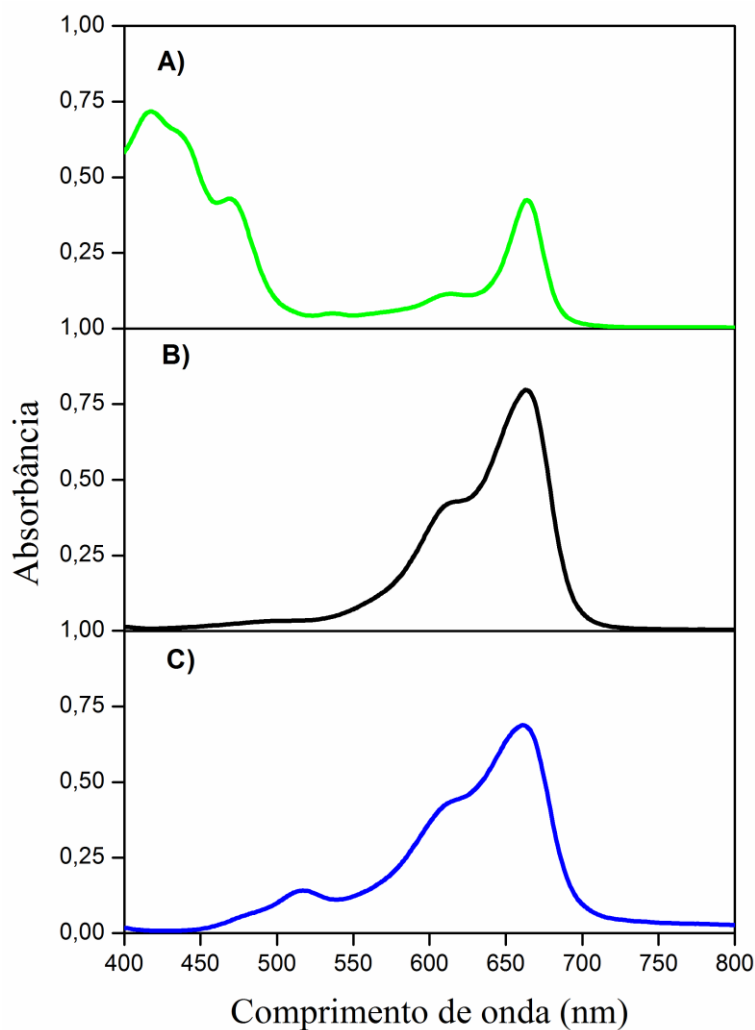
CAPÍTULO V

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do comportamento óptico dos fotossensibilizadores: Absorção UV-Visível dos fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM.

Os fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM são moléculas com estrutura conhecida composta por um sistema de anel aromático planar, altamente conjugado. A **Figura 5** apresenta os espectros de absorção UV-Vis dos fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM.

Figura 5: Espectros de absorção UV-Vis dos fotossensibilizadores **A)** EXCL 0,0786 mg mL⁻¹; **B)** AM 0,0462 mg mL⁻¹ e **C)** EAM 0,0350 mg mL⁻¹.



O espectro **A** do fotossensibilizador EXCL apresenta duas bandas de absorção características entre as regiões de 400 a 500 nm e entre as regiões de 650 a 700 nm. Essas

bandas são resultantes das transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ no anel porfirínico¹³⁶. As clorofilas *a* e *b* apresentam máximo de absorção na região de 665 nm^{77; 82}.

O espectro **B** do fotossensibilizador AM apresenta uma banda de absorção máxima na região de 664 nm em soluções diluídas, que é correspondente à forma monomérica do fotossensibilizador, e é possível observar a existência de um ombro em 610 nm, correspondente a uma transição com acoplamento vibracional, característico do fotossensibilizador AM^{98, 137}.

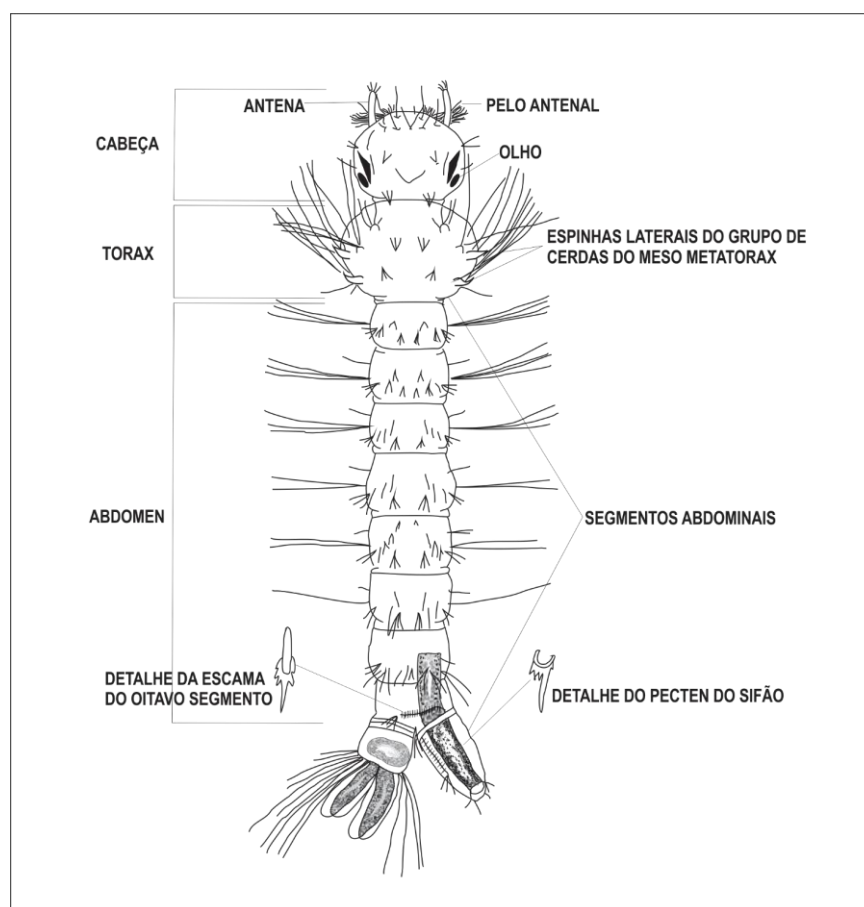
O espectro **C** do fotossensibilizador EAM apresenta bandas características da mistura policrômica de AM, azures e eosina Y, componentes de sua composição¹³⁸. É possível observar no espectro uma banda de absorção máxima na região de 664 nm associada a outra banda em formato de ombro na região de 609 nm. Essas bandas são característica do fotossensibilizador AM o monômero possui uma banda de absorção máxima na região entre 600-700 nm referente a forma monomérica do fotossensibilizador AM^{98;100}. Adicionalmente, também é possível observar no espectro uma banda na região de 514 nm. Essa banda é característica do fotossensibilizador eosina Y que apresenta uma banda de absorção máxima entre 515-518 nm¹³⁹.

De acordo com os espectros apresentados na Figura 5, para os fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM apresentam comportamento de absorbância em regiões características ao encontrado na literatura^{77; 82; 98; 100, 136; 137, 138,139}. Essas regiões de absorção são favoráveis para o uso em processos que envolve a TFD.

5.2 Determinação do tempo de internalização (TI)

A estrutura anatômica das larvas de mosquitos *Aedes aegypti* consiste em cabeça, tórax e abdômen¹⁹, como mostrado na **Figura 6**. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como os olhos, as antenas e os palpos. No tórax estão os apêndices responsável pela locomoção, isto é, as patas e as asas. O abdome inclui a maior parte dos órgãos internos, o aparelho reprodutor, digestivo e excretor da larvar de *Aedes aegypti*¹⁹.

Figura 6: Morfologia externa da larva do mosquito *Aedes aegypti*¹⁴⁰.



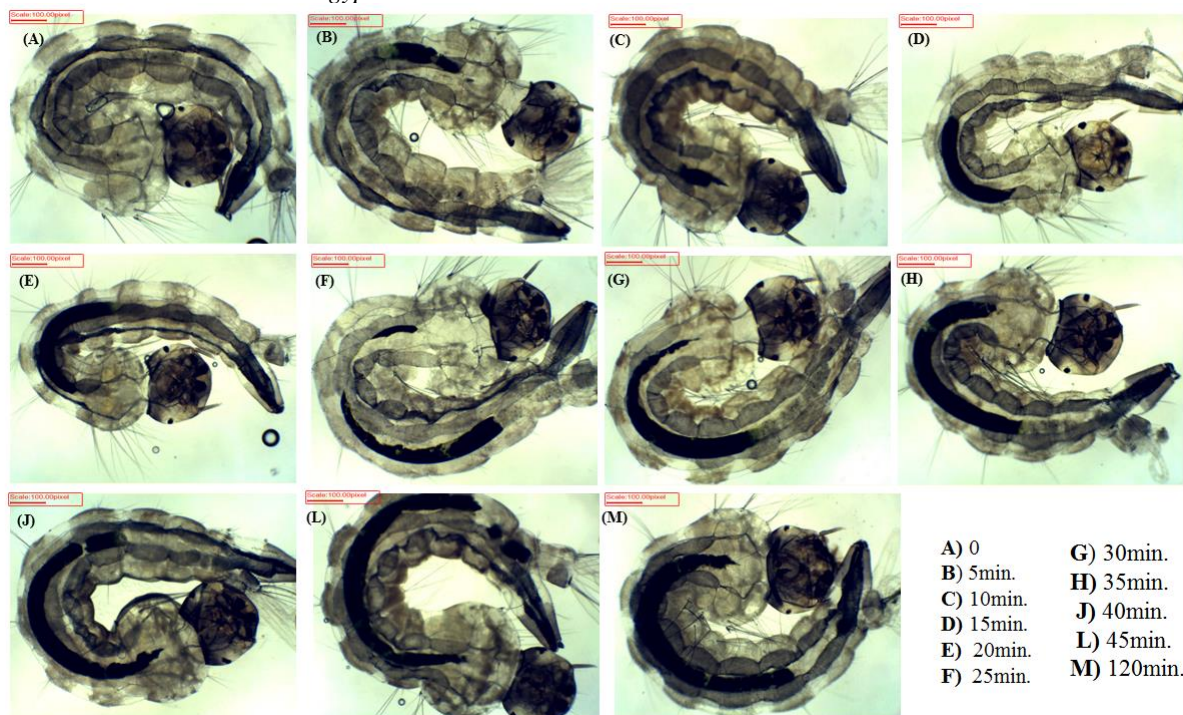
Fonte: Adaptado de BRASIL (2001)¹⁴⁰.

O abdômen da larva é composto por oito segmentos, sendo que o último possui quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água¹⁴¹, o sifão é curto, grosso e mais escuro que o corpo.

O intestino médio que está presente no abdome da larva de *Aedes aegypti* consistiu-se de um tubo com uma camada única composta por células simples responsável pela produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos ingeridos. Essas células são colunares e apresentam microvilosidades, citoplasma e abundância de mitocôndrias¹⁴².

O tempo que o fotossensibilizador EXCL leva para começar a internalização nas estruturas anatômicas das larvas de *Aedes aegypti* é de 5 min quando ocorre a exposição ao fotossensibilizador como mostrado na **Figura 7**, é possível observar o comportamento médio do EXCL nos sistemas digestórios das larvas, a internalização do EXCL começou no tórax da larva seguindo para o abdômen.

Figura 7: Internalização do fotossensibilizador EXCL na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ no sistema digestório de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.

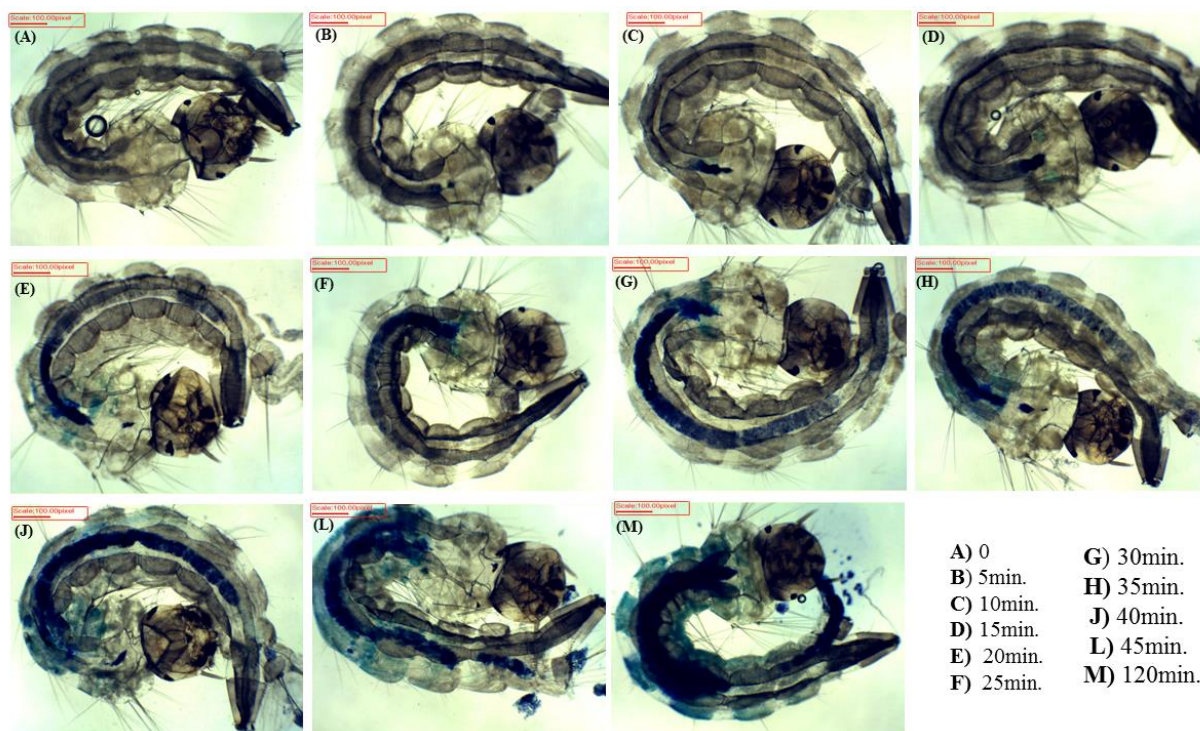


No processo de ingestão do alimento/ou fotossensibilizador deve-se considerar que a matriz peritrófica envolve o alimento no sistema digestório e pode ser corada pelo fotossensibilizador. A variação de cor do fotossensibilizador pode indicar diferenças de pH no sistema digestório da larva. Da ingestão a excreção do alimento o pH no sistema digestório da larva pode variar de 5 até 11¹⁴³.

O EXCL manteve sua coloração verde-escura durante os tempos de exposição, provavelmente devido a hidrofobicidade das clorofilas, a qual, permite a agregação molecular e dificulta o trânsito no sistema digestório da larva do inseto, possivelmente pela capacidade de interação do EXCL com as membranas biológicas.

Na **Figura 8**, observa-se o comportamento médio do fotossensibilizador AM no sistema digestório das larvas de *Aedes aegypti*, com 5 min de exposição ao AM, começa a ocorrer a internalização do fotossensibilizador no tórax da larva, seguindo o trânsito do bolo alimentar para o abdômen.

Figura 8: Internalização do fotossensibilizador AM, na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ no sistema digestório de larvas de 3º estágio *Aedes aegypti*.

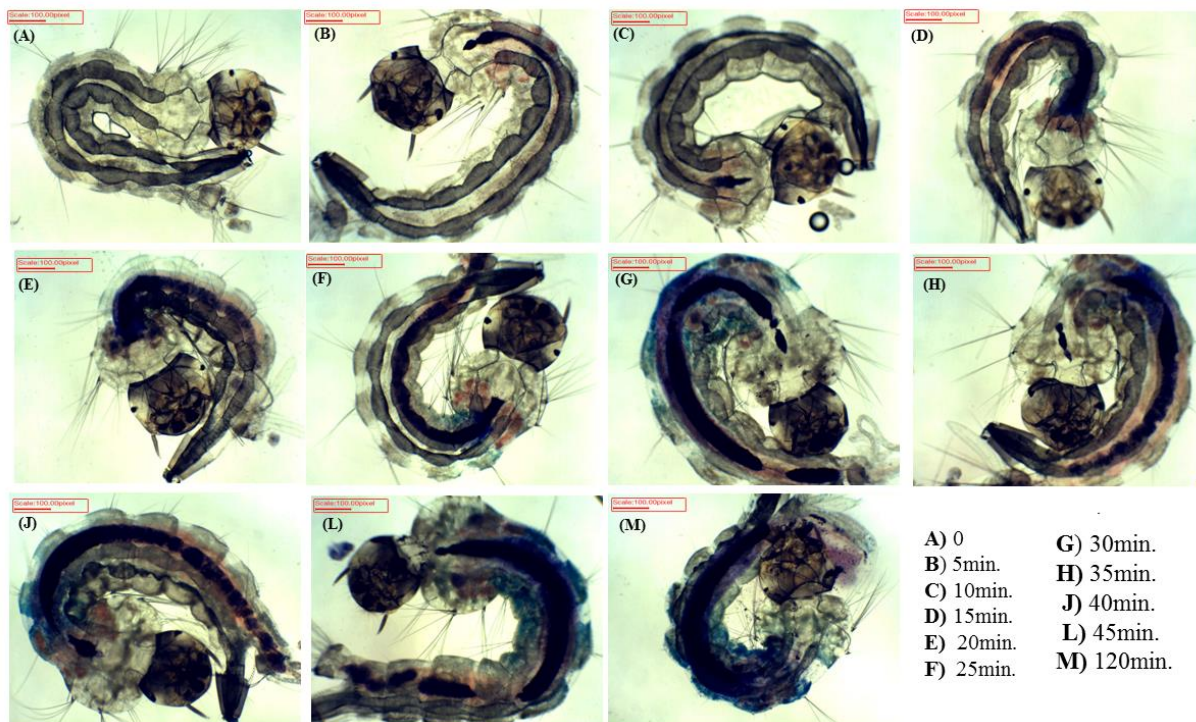


O fotossensibilizador AM não mudou a coloração, mantendo-se a sua cor azul escuro intenso durante todo o processo de internalização até a sua excreção de dentro da larva como mostrado na Figura 8 M. O AM é um fotossensibilizador catiônico e hidrofílico, que se associa as condições do meio que está presente⁹⁸. Em componentes celulares, o corante acumula-se preferencialmente na mitocôndria e é atraído pelo ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial¹⁰².

Na **Figura 9**, é possível observar o comportamento médio do fotossensibilizador EAM no sistema digestório das larvas de *Aedes aegypti*, com 5 min de exposição ao EAM, começa a ocorrer a internalização do fotossensibilizador no tórax da larva, seguindo o trânsito do bolo alimentar para o abdômen. Segundo a literatura o fotossensibilizador EAM cora o citoplasma com tonalidade rósea, atuando sobre as fibras do colágeno¹¹¹⁻¹¹². Durante o processo de internalização mostrado na Figura 9 do EAM a coloração se altera de azul para rosado, semelhante à coloração que cora o citoplasma. Essa alteração na coloração provavelmente pode ter ocorrido¹⁴⁴ devido ao gradiente de pH que existe no sistema digestório da larva que pode ter uma variação entre os pH 5 a 11¹⁴³. O intestino médio na fase larval pode ser

extremamente alcalino, apesar de estar também relacionado com as condições do microambiente formado no lúmen pelo bolo alimentar e fotossensibilizador^{142,145}.

Figura 9: Internalização do fotossensibilizador EAM na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ no sistema digestório de larva de 3º estágio *Aedes aegypti*.



O tempo de internalização do fotossensibilizador no escuro é necessário para o acúmulo do bolo alimentar com os corantes no sistema digestório das larvas, para posteriormente realizar o controle fotodinâmico com a exposição à luz. Neste sentido, por meio dos experimentos foi obtido o tempo de trânsito (TT) de 45 min, uma vez que este, é o tempo que os fotossensibilizadores levaram para percorrer o sistema digestório da larva até a sua excreção. Para garantir o equilíbrio entre as espécies dos fotossensibilizadores nas células das larvas de *Aedes aegypti* foi utilizado tempo maior de 120 min de exposição aos fotossensibilizadores antes de realizar o processo do controle fotodinâmico. Este tempo foi chamado de tempo de internalização (TI). Durante a pré-incubação as imagens sugerem que não ocorreu alterações morfológicas nas larvas de *Aedes aegypti*.

5.3 Ação fotodinâmica *in vivo* sobre larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*

5.3.1 Controle Fotodinâmico LED RGB

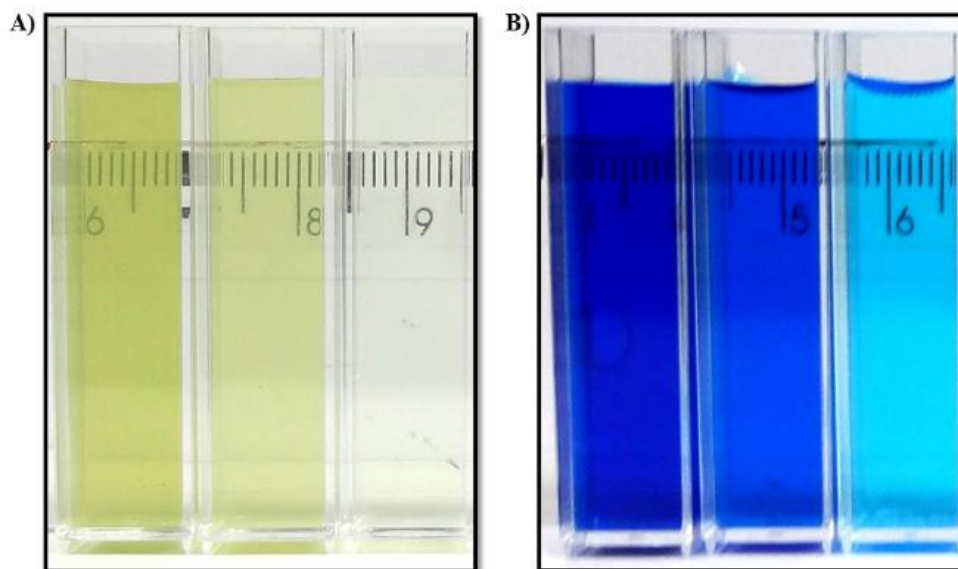
Os fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM não apresentaram mortalidade para as larvas de *Aedes aegypti* na ausência da irradiação. A dose de energia $32,4 \text{ J cm}^{-2}$, utilizada na irradiação não exerceu efeitos danoso/tóxico sobre as larvas de *Aedes aegypti* expostas a luz sem o fotossensibilizador (controle negativo).

O fotossensibilizador EXCL não apresentou ação fotodinâmica sobre a população de larvas de *Aedes aegypti* em nenhuma das concentrações testadas 0,1; 0,05 e 0,01 mg mL⁻¹, provavelmente, porque as moléculas do EXCL podem agregar em função da concentração e/ou a matriz peritrófica que é constituída por uma estrutura bioquímica complexa de quitina, proteínas e proteoglicanas⁶. Outro fator importante de relato é que a molécula de clorofila no estado excitado é extremamente instável e rapidamente libera parte da energia ao meio, podendo ser facilmente degradada⁹¹. Pesquisadores demonstraram que derivados de clorofila como clorofilina (derivado solúvel em água, que pode ser obtido por remoção da cauda fitol (hidrofóbica) da clorofila) e feoforbida (que pode ser obtida por acidificação de clorofilina) tem sido usado como fotossensibilizadores naturais eficazes contra larvas de várias espécies de insetos^{60; 62; 95}.

O fotossensibilizador AM não apresentou ação fotodinâmica sobre a população de larvas de *Aedes aegypti*, após a irradiação nas concentrações 0,1; 0,05 e 0,01 mg mL⁻¹ testadas. Este resultado pode sido influenciado pela formação de agregados/ou interações de acordo com as condições do meio e concentração⁹⁸. Em solução aquosa o AM é encontrado na forma de monômeros (soluções diluídas), dímeros e agregados maiores (soluções concentradas), podendo ser diferenciados pelas respectivas bandas de absorção de no ultravioleta visível (664 nm; 600 nm e 550 nm)¹⁰⁶. Dependendo do estado de agregação, as características fotofísicas e fotoquímicas são alteradas, conseqüentemente, pode diminuir a quantidade de oxigênio singleto ou ROS gerada por uma fonte luminosa/irradiante^{102; 106}.

Os resultados sugerem que a concentração e absorção da solução podem ter influenciado na ação fotodinâmica dos fotossensibilizadores EXCL e AM. Na **Figura 10** são mostradas a intensidade de cor das concentrações testadas o que permitem a visualização da transparência da solução dos fotossensibilizadores.

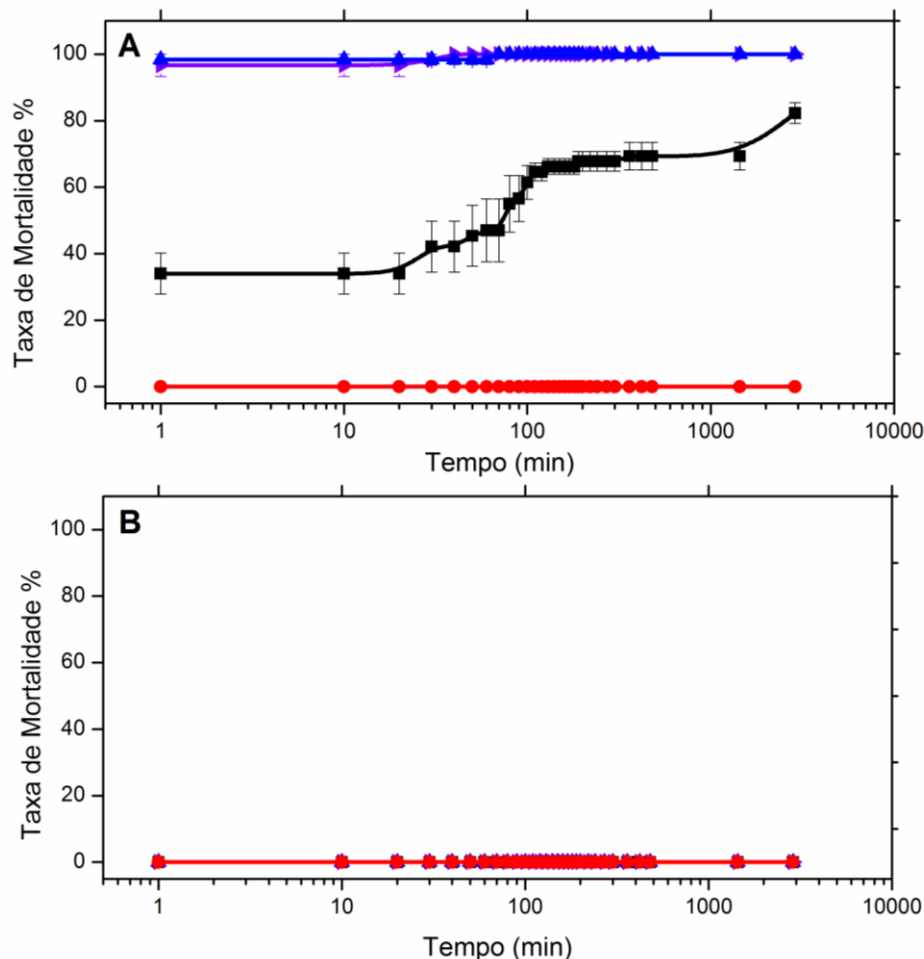
Figura 10: Cores das soluções dos fotossensibilizadores nas concentrações de 0,1; 0,05 e 0,01 mg mL⁻¹ A) EXCL; B) AM.



O processo fotodinâmico, aqui denominado de controle fotodinâmico (CF) se baseia na interação do fotossensibilizador com a fonte de luz, sendo que, quanto maior sua concentração, maior será a dificuldade de penetração da luz no meio, induzindo uma menor absorção da luz pelos fotossensibilizadores presente nas larvas distribuídas na solução. Os danos induzidos à larva ou a seu metabolismo devem ser internos e não pela dispersão do fotossensibilizador na solução. Este fato sugere que os fotossensibilizadores devem estar impregnando nas células do inseto, para que a ação fotodinâmica efetivamente ocorra, pois, os fótons absorvidos pelo corante na solução não induzem a produção de oxigênio singlete ou radicais livres.

O fotossensibilizador EAM, apresentou ação fotodinâmica, causando mortalidade nas larvas de *Aedes aegypti*, para as concentrações testadas 0,1 mg mL⁻¹; 0,05 mg mL⁻¹ e 0,01 mg mL⁻¹. As taxas de mortalidade após a incidência da irradiação são mostradas na **Figura 11**. A mortalidade para as larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações de 0,05 mg mL⁻¹ e 0,01 mg mL⁻¹ teve início após a irradiação com 32,4 J cm⁻². A eficiência de mortalidade para essas concentrações é de 100 % com 10 min de leitura após o termino da incidência da irradiação. No entanto a mortalidade para a concentração de 0,1 mg mL⁻¹ o máximo de eficiência é aproximadamente 80 % após 2880 min de leitura, mostrando que há diferença no tempo para atingir a taxa de mortalidade. Essa diferença está relacionada com a concentração do fotossensibilizador.

Figura 11: Taxa de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações de EAM (A) (■) 0,1 mg mL⁻¹; (▼) 0,05 mg mL⁻¹; (▲) 0,01 mg mL⁻¹ para uma dose de energia de 32,4 J cm⁻²; (●) Controle sem fotossensibilizador (controle negativo), (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).



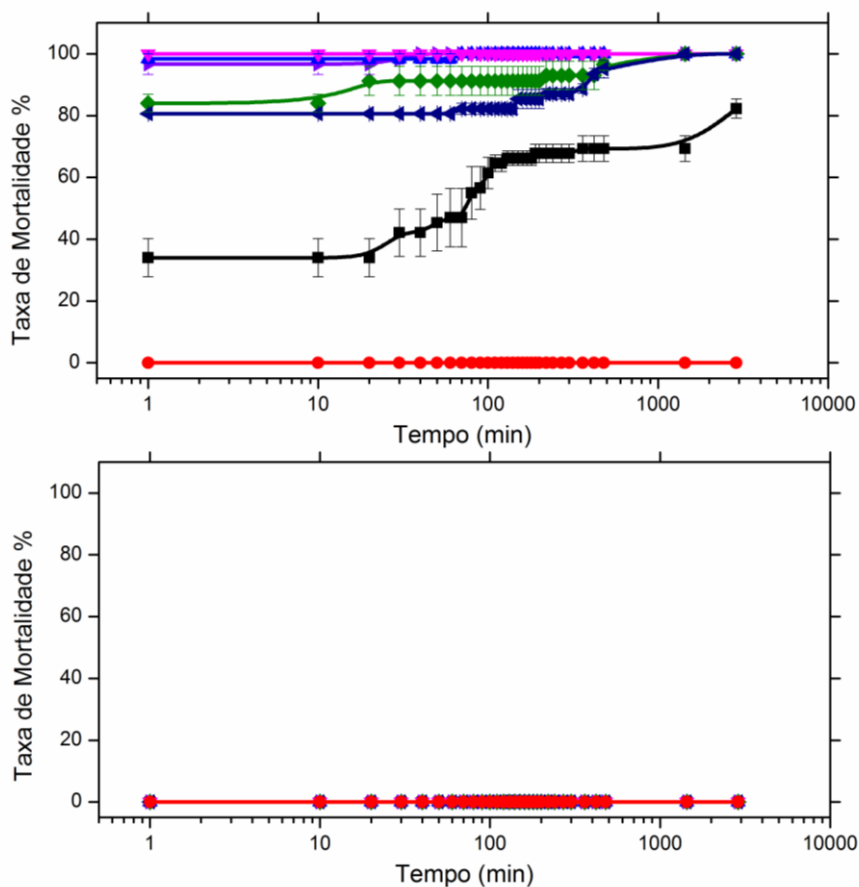
A solução concentrada impede que a luz incidente chegue às larvas impregnadas com o fotossensibilizador, justificando a menor taxa de mortalidade para a concentração de 0,1 mg mL⁻¹. O controle de utilizado com larvas de *Aedes aegypti* expostas a incidência de irradiação por luz sem o fotossensibilizador não apresentou mortalidade. A **Figura 11B**, mostrar que não teve mortalidade das larvas, na ausência da irradiação (escuro), o fotossensibilizador não é tóxico para as larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações avaliadas. O resultado mostra que há necessidade de luz para ativar a ação do fotossensibilizador, gerando assim, espécies radicais reativas e toxicidade para as larvas de 3^o estágio de *Aedes aegypti*.

A EAM apresentou resposta a irradiação e efeito tóxico as larvas de *Aedes aegypti*. Para os fotossensibilizadores EXCL e AM as taxas de mortalidade foram nulas, indicando que, nessas concentrações, estes corantes não são tóxicos para as larvas de *Aedes aegypti*. A

partir desses resultados optou-se em realizar os estudos com o fotossensibilizador EAM em função da concentração e as doses de energia.

A **Figura 12A** mostra a taxa de mortalidade para larvas de 3º estágio *Aedes aegypti* para as seis concentrações 0,1 mg mL⁻¹; 0,05 mg mL⁻¹; 0,01 mg mL⁻¹; 0,005 mg mL⁻¹; 0,001 mg mL⁻¹; 0,0005 mg mL⁻¹ que foram submetidas a uma dose de energia de 32,4 J cm⁻².

Figura 12: Taxa de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* em diferentes concentrações de EAM (A) (■) 0,1 mg mL⁻¹; (►) 0,05 mg mL⁻¹; (▲) 0,01 mg mL⁻¹; (▼) 0,005 mg mL⁻¹; (◆) 0,001 mg mL⁻¹; (◄) 0,0005 mg mL⁻¹; (●) Controle, para uma dose de energia de 32,4 J cm⁻². (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).



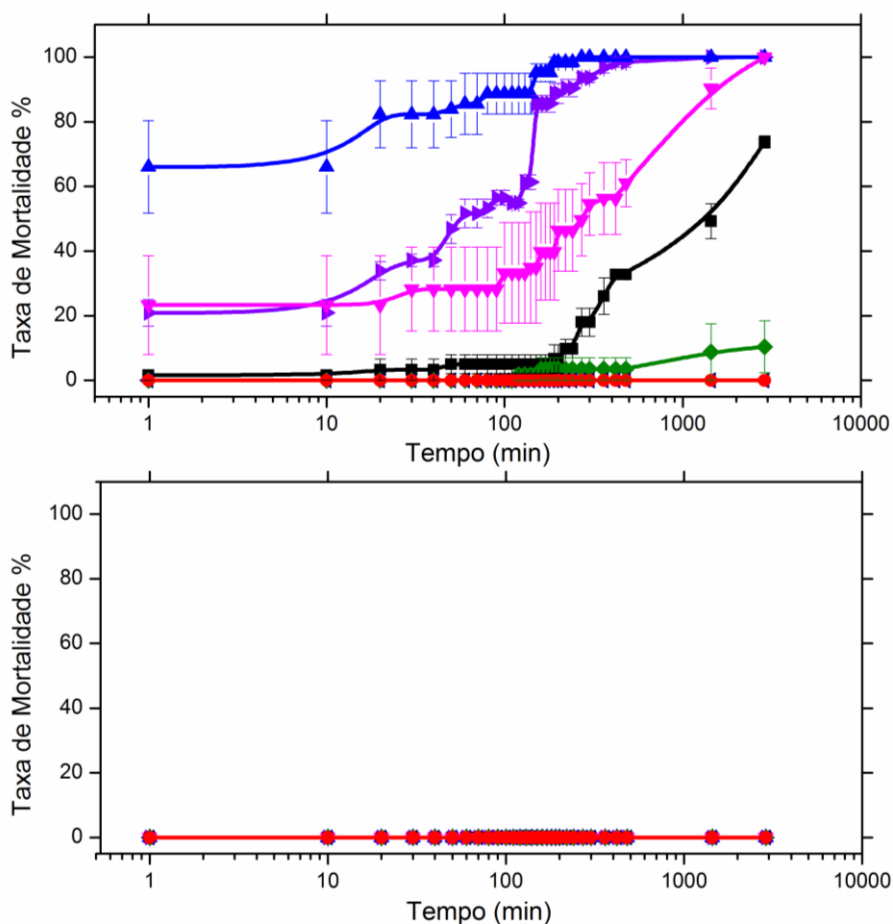
As taxas de mortalidade de larvas de 3º estágio *Aedes aegypti* para as concentrações 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹ foram de 69%, 100%, 100%, 100%, 95% e 95%, respectivamente, após 8 horas (480min) da incidência de irradiação.

As taxas de mortalidade com 24 h (1440min) de leitura após a incidência da irradiação para as concentrações 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹ foram de 100% de mortalidade. Nesse mesmo período a concentração de 0,1 mg mL⁻¹ mostrou uma taxa de mortalidade de 69,0% e, em 48 horas (2880min) apresentou uma taxa de mortalidade de 82,0%. O grupo controle com água, sem o fotossensibilizador, recebeu a mesma incidência de

irradiação que os grupos tratados com o fotossensibilizador, e não apresentou mortalidade larval. Considera-se que as concentrações testadas do fotossensibilizador EAM com a dose de energia de $32,4 \text{ J cm}^{-2}$ podem ser prospectadas com um potencial fotolarvicida, pois obteve-se a porcentagem média de mortalidade das larvas entre 82,0 % a 100 %. Na **Figura 12B** estão demonstrados os resultados do controle na ausência da luz, o fotossensibilizador EAM não apresenta toxicidade para as larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.

A **Figura 13A** mostra as taxas de mortalidade para larvas de 3º estágio *Aedes aegypti* para as seis concentrações $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$ que foram submetidas a uma dose de energia de $16,2 \text{ J cm}^{-2}$.

Figura 13: Taxa de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações do corante EAM (A) (■) $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$; (►) $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$; (▲) $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$; (▼) $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$; (◆) $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$; (◄) $0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$; (●) Controle para uma dose de energia de $16,2 \text{ J cm}^{-2}$. (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).



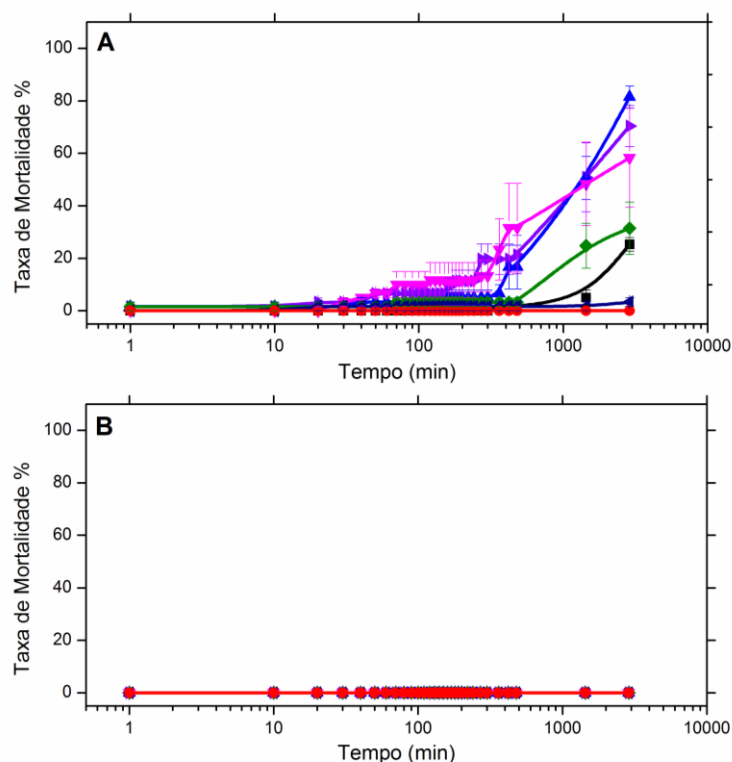
As taxas de mortalidade das larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* para as concentrações $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ foi de 100% após 8 horas (480min) da incidência de irradiação. Nesse mesmo período as concentrações de $0,005$; $0,001$ e $0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$ as

taxas de mortalidade foram de 61,0%; 3,50% e 0%. Por outro lado, a taxa de mortalidade para a concentração de 0,1 mg mL⁻¹ foi de 32,0 %.

As taxas de mortalidade com 24 h (1440min) de leitura após a incidência da irradiação para as concentrações foram de 0,005 mg mL⁻¹ (90,0%); 0,001 mg mL⁻¹ (8,70%); 0,0005 mg mL⁻¹ (0%) e 0,1 mg mL⁻¹ (49,9%). Em 48 horas (2880min) de leitura a concentração de 0,005 mg mL⁻¹ apresentou 100% de mortalidade, para as concentrações de 0,1; 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹ as taxas de mortalidade foram de 73,0, 10,4 e 0%, respectivamente. O grupo controle com água, sem o fotossensibilizador, recebeu a mesma incidência de irradiação que os grupos tratados com o fotossensibilizador, e não apresentou mortalidade larval. Na **Figura 13B**, foram avaliados os efeitos das concentrações na ausência da luz, o fotossensibilizador EAM não tem efeitos de toxicidade para as larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.

A **Figura 14A** mostra as taxas de mortalidade para larvas de 3º estágio *Aedes aegypti* para as seis concentrações 0,1 mg mL⁻¹; 0,05 mg mL⁻¹; 0,01 mg mL⁻¹; 0,005 mg mL⁻¹; 0,001 mg mL⁻¹; 0,0005 mg mL⁻¹ que foram submetidas a uma dose de energia de 8,2 J cm⁻².

Figura 14: Taxa de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* em diferentes concentrações de EAM (A) (■) 0,1 mg mL⁻¹; (►) 0,05 mg mL⁻¹; (▲) 0,01 mg mL⁻¹; (▼) 0,005 mg mL⁻¹; (◆) 0,001 mg mL⁻¹ e (◄) 0,0005 mg mL⁻¹; (●) Controle irradiado para uma dose de energia de 8,2 J cm⁻². (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).



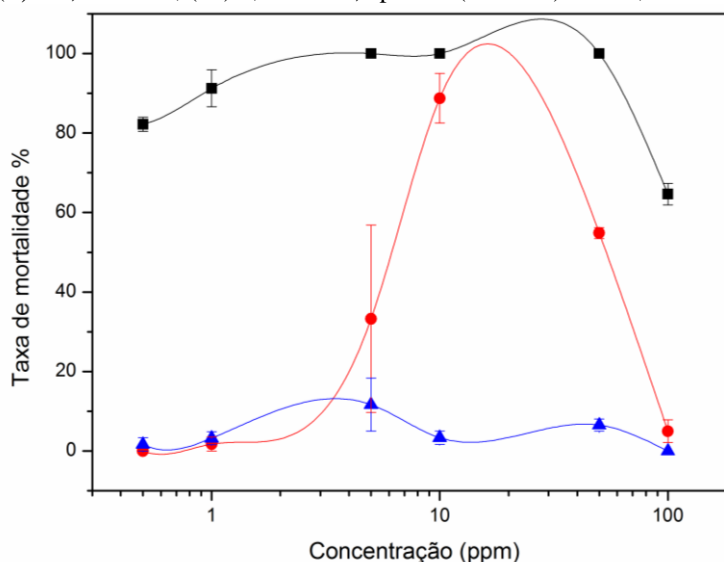
As taxas de mortalidade para as larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações de 0,1;

0,05; 0,01; 0,005; 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹ foram de 1,66; 21,4; 16,6; 31,6; 3,25 e 1,66%, respectivamente, após 8 horas (480min) da incidência de irradiação.

As taxas de mortalidade com 24 h (1440min) de leitura após a incidência da irradiação nas concentrações de 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹ foram 5,0; 49,7; 50,8; 48,3; 24,7 e 1,85%, respectivamente. Em 48 horas (2880min) as taxas de mortalidade nas concentrações de 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹ foram de 25,0; 69,9; 81,6; 58,9; 31,7 e 3,35%, respectivamente. O grupo controle com água, sem o fotossensibilizador, recebeu a mesma incidência de irradiação que os grupos tratados com o fotossensibilizador, e não apresentou mortalidade larval. Na **Figura 14B**, foram avaliados os efeitos das concentrações na ausência da luz, o fotossensibilizador EAM não tem efeitos de toxicidade para as larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.

A **Figura 15** mostra o gráfico da Taxa de mortalidade das larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* para faixa de concentração de zero a 100 ppm respectivamente (0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹) para as doses de energia de 32,2; 16,2 e 8,1 J cm⁻² após 2 horas (120min) de leitura.

Figura 15: Taxa de mortalidade em função da concentração do fotossensibilizador EAM para as doses de energia (■) 32,4 J cm⁻²; (●) 16,2 J cm⁻²; (▲) 8,2 J cm⁻², após 2h (120 min) leitura;



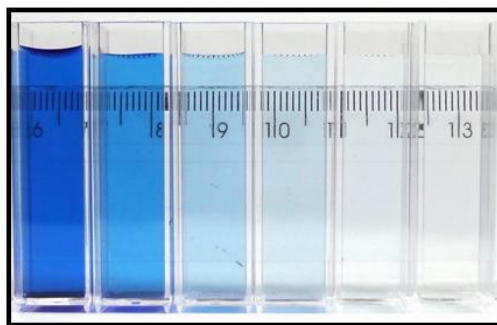
A dose de 8,2 J cm⁻² apresentou a menor taxa de mortalidade para as concentrações avaliadas do fotossensibilizador EAM quando comparada com a dose de 16,2 e 32,4 J cm⁻². A dose de 32,4 J cm⁻² obteve-se 100% de mortalidade na faixa de concentração de 10 á 50 ppm. Para concentrações maiores que 50 ppm a porcentagem de mortalidade diminui para as três doses de energia.

No entanto pode-se observar que até a concentração de 10 ppm há um aumento na mortalidade. A partir dessa concentração há uma tendência de redução da taxa de mortalidade em função da concentração. Assim, pode-se concluir que a taxa de mortalidade com a incidência de irradiação é dose-dependente até 10 ppm. Este resultado reforça a observação que para as concentrações maiores do fotossensibilizador/corante, não necessariamente, uma taxa de mortalidade maior é encontrada, mas, há dependência de um tempo mínimo/dose de energia aplicada

A concentração de 0,1 mg mL⁻¹ não alcançou a 100% da taxa de mortalidade, provavelmente, porque a solução mais concentrada absorve fótons de luz que seriam utilizados para a fotossensibilização e indução da produção de radicais livres e espécies oxidantes em relação as concentrações menores. Pode-se concluir que soluções mais diluídas em relação a 0,1 mg mL⁻¹ são mais eficientes para o controle fotodinâmico.

Na **Figura 16** é possível observar a intensidade da coloração das concentrações 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001; e 0,0005 mg mL⁻¹ utilizadas no CF em larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*, conforme aumenta a concentração (direita para esquerda) a coloração vai sendo intensificada.

Figura 16: Soluções do fotossensibilizador EAM nas concentrações de 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001; e 0,0005 mg mL⁻¹, utilizadas no CF em larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.



Nas soluções mais concentradas tem uma quantidade maior do fotossensibilizador/corante EAM que absorvem e/ou espalham uma quantidade maior de luz, logo a radiação incidida não penetra nas larvas, ocorrendo a diminuição de geração de ROS, ocasionando uma diminuição na mortalidade quando comparado as soluções mais diluídas.

Pode-se deduzir/inferir que o conjunto luz irradiada, fotossensibilizador e meio molecular é responsável pela geração de ROS e conseqüentemente promove a morte das larvas no CF, uma vez que as concentrações avaliadas do fotossensibilizador não apresentaram toxicidade na ausência da luz e o mesmo resultado foi obtido quando se avaliou somente as doses de irradiação da luz na ausência do fotossensibilizador.

5.3.2 Controle Fotodinâmico Luz solar

A luz do Sol tem variados comprimentos de onda. Metade da energia é emitida como luz visível na parte de frequência mais alta do espectro eletromagnético e o restante na forma de infravermelho próximo e radiação ultravioleta. As intensidades da insolação, apesar das variações que podem ocorrer ao longo do dia e dias claros ou nublados são suficientes para ativar o fotossensibilizador e causar mortalidade nas larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti*.

Na **Tabela 6**, são apresentados os valores de temperatura, umidade relativa do ar e luminosidade.

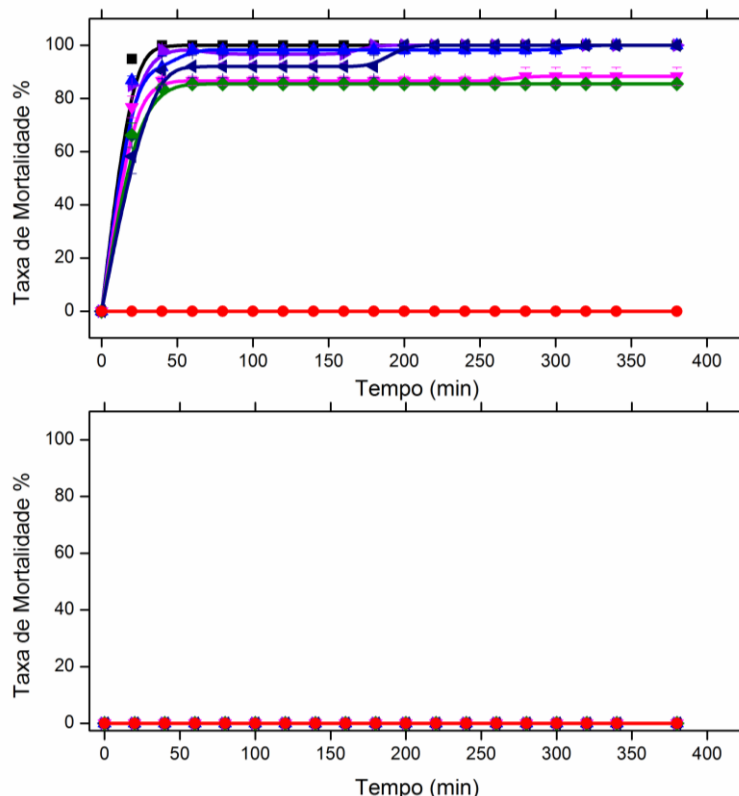
Tabela 6: Valores de temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade 13h30 min às 19h35 min, no campus da Universidade Federal da Grande Dourados, MS 19/01/2016.

Hora	Luminosidade (Lux)	Temperatura (°C)	Umidade Relativa %
13:35	133.500	38,6	15
13:55	129.900	38,5	15
14:15	128.500	38,3	15
14:35	126.000	38,4	15
14:55	125.400	38,5	19
15:15	101.700	38,5	16
15:35	96.000	38,5	17
15:55	91.800	38,0	23
16:15	78.800	37,4	23
16:35	73.000	36,4	20
16:55	59.800	36,0	22
17:20	46.900	35,9	23
17:35	38.700	35,9	28
17:55	25.900	35,6	30
18:15	19.400	33,2	35
18:35	11.100	32,0	39
18:55	6.600	28,7	42
19:15	1000	25,9	46
19:35	0	25,5	49

Para determinar um valor médio de intensidade luminosa da radiação solar, foi calculado a média dos valores de luminosidade (129.475 Lux) da primeira hora de experimento, pois essa luz induziu as mortes nos primeiros minutos de exposição a luz solar.

A **Figura 17A** mostra os resultados da ação fotodinâmica do CF para os experimentos realizado sob a incidência da irradiação solar direta no período das 13:35 às 19:35 horas.

Figura 17. Taxa de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* em diferentes concentrações de EAM (A) (■) 0,1 mg mL⁻¹; (►) 0,05 mg mL⁻¹; (▲) 0,01 mg mL⁻¹; (▼) 0,005 mg mL⁻¹; (◆) 0,001 mg mL⁻¹; (◄) 0,0005 mg mL⁻¹ para a radiação solar com a intensidade de 129.475 Lux (●) Controle. (B) Taxa de mortalidade das larvas não irradiada, nas mesmas concentrações de fotossensibilizador (controle positivo).



As taxas de mortalidade para as concentrações 0,0005 a 0,1 mg mL⁻¹ é crescente e alcança valores superiores a 80% nas concentrações mais baixas (0,0005 a 0,005 mg mL⁻¹) e 100% nas concentrações mais elevadas (0,01 a 0,1 mg mL⁻¹) durante os primeiros 60 minutos. De maneira geral, os resultados mostraram que a taxa de mortalidade é sempre superior a 50 % para as larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* durante todo o tempo de análises 360 min (6 h). O controle irradiado nas mesmas condições não apresentou mortalidade. O grupo controle com água, sem o fotossensibilizador, recebeu a mesma incidência de irradiação que os grupos tratados com o fotossensibilizador, e não apresentou mortalidade larval. O grupo que foi mantido protegido da irradiação da luz solar na presença do fotossensibilizador também não

induziu mortalidade, como mostra a **Figura 17B**. Todos os bioensaios foram realizados simultaneamente sob as mesmas condições de temperatura e umidade relativa do ar.

Os resultados indicam que a mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* está relacionada com a ação fotodinâmica que o fotossensibilizador EAM e exercem através da geração de ROS no organismo do inseto na fase de larva, a partir da impregnação dos corantes fotossensibilizantes nas células do sistema digestório da larva do mosquito.

No entanto, não se pode descartar a ocorrência paralela de processos radicais envolvendo à fotolabilidade devido às ligações covalentes e interações entre os halogênios e anéis aromáticos¹². Nas células, os xantenos podem se localizar na membrana celular constituídas de fosfolipídeos, proteínas com resíduos de carboidratos, de modo que a nível molecular, pode ser fotossensibilizada a reticulação das proteínas da membrana e ocorrer a formação de hidroperóxidos a partir de lipídios insaturados, que aumenta a fragilidade osmótica das células¹⁴⁶.

A ação fotodinâmica afeta intensamente sistemas biológicas, a radiação é extremamente destrutiva por duas razões principais: a falta de mecanismos de defesa eficaz e disponibilidade de vários sítios de ataque para as espécies radicais e oxidantes em células, hormônios, enzimas, proteínas e metabólitos. Embora as células possuam defesas naturais contra ROS, o nível de desequilíbrio redox gerado pela ação fotodinâmica é várias ordens de grandeza maior do que o nível de proteção via homeostase, regulado por enzimas e espécies moleculares antioxidantes nas células. Além disso, enzimas celulares antioxidantes tais como catalase e superóxido dismutase são inativados por oxigênio singleto^{110,147}.

A reatividade das ROS em moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para o CF. Assim, a multiplicidade de alvos torna-se ainda mais difícil para as células desenvolverem resistência celular, sendo essa uma das vantagens da ação fotodinâmica, que ocasiona a morte celular (apoptose) por fotoindução⁶.

Os inseticidas convencionais utilizados hoje para o controle de larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*, por sua vez, geram resistência por pressão seletiva a médio e longo prazo, perdendo sua eficiência ou atividade biológica devido à resistência adquirida. Para os inseticidas há sempre vários mecanismos de resistência, um dos mecanismos, em termos genéticos, a resistência é uma característica herdável, em que os alelos aumentam de frequência na população, como um resultado direto dos efeitos seletivos de um dado inseticida^{49; 56}. O controle populacional e o manejo requerem a utilização de inseticidas ou a

substituição/complementação por métodos físicos e agentes biológicos para o controle efetivo durante o maior período de tempo para reduzir/suprimir a resistência.

CAPÍTULO VI

6 CONCLUSÕES

A técnica de extração mostrou-se eficiente para obtenção da quantidade de necessária do EXCL para realizar a caracterização e os experimentos de controle fotodinâmico *in vivo*.

A caracterização do comportamento óptico dos fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM, mostrou que estes absorvem luz na região de 600-800 nm, característica para realizar o controle fotodinâmico.

A determinação do tempo de internalização para os fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM, pode-se concluir que foi de 45 min sendo denominado de tempo de trânsito, o tempo em que os fotossensibilizadores gastam para percorrer o sistema digestório da larva e ser excretado. Diante disso o tempo de internalização de 120 min foi usado para garantir o equilíbrio entre das espécies dentro das larvas. Durante a pré-incubação as imagens sugerem que não ocorrem alteração morfológicas nas larvas *Aedes aegypti*.

Os fotossensibilizadores EXCL, AM e EAM estudados não apresentaram efeitos tóxicos quando não irradiados com uma fonte de luz. Dentre os fotossensibilizadores estudados, EXCL e AM quando irradiado com a luz de LED branca não apresentaram ação fotodinâmica para as larvas nas concentrações 0,1; 0,05 e 0,01 mg mL⁻¹ testadas. Por outro lado, pode-se verificar que fatores experimentais podem influenciar a ação fotodinâmica como, os meios de aplicação e concentração, entre outros possíveis.

Nos experimentos apenas o EAM apresentou ação fotodinâmica acentuada para larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* nas concentrações 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹ quando submetidas a irradiação com luz de LED branca. Sendo assim, EAM pode tornar-se uma alternativa viável como potencial inseticida para a aplicação em CF em larvas de *Aedes aegypti*. O efeito CF para as larvas é dependente da dose de energia aplicada e concentração de fotossensibilizador utilizado.

Com relação aos experimentos realizados com a luz solar pode-se avaliar a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador EAM nas concentrações 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹ em ambiente aberto, é um fato importante para uma possível implementação da técnica de CF em larvas de *Aedes aegypti*. Porém, ainda é necessário que haja aprofundamento dos estudos para garantir que não irá causar danos à saúde humana e/ou impacto ao meio ambiente.

Os resultados mostram que as larvas de *Aedes aegypti* suportam irradiação contínua e que podem proliferar em criadouros que não estão abrigados da radiação. Estes dados são importantes e sugerem uma verificação cuidadosa sobre o comportamento e hábitos dos mosquitos. A literatura informa que os mosquitos preferem criadouros abrigados da radiação, entretanto, mesmo submetidas a radiação as larvas a suportam por longos períodos.

A ação fotodinâmica das substâncias fotossensibilizantes através da indução de reações de estresse oxidativo, surgem como uma estratégia promissora para abordagem complementar para o controle de insetos vetores. O CF pode ser eficaz e realizado ao ar livre sob radiação solar, mesmo nos ambientes protegidos ou semi-protegidos dos criadouros. Os resultados do presente trabalho demonstraram o potencial da ação fotodinâmica do corante EAM para o controle de formas imaturas do *Aedes aegypti*, vetor do transmissor da febre amarela, dengue, CHIK e ZIKV.

7 REFERÊNCIAS

1. WHO-World Health Organization. Zika virus outbreaks in the Americas. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, 609 – 610, 2015.
2. WHO-World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control. 2012-2020. <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/97892415040eng.pdf>>. Acesso em: 08/04/2014.
3. WHO-World Health Organization 2004. Using climate to predict infectious diseases outbreaks: a review. Disponível em:< <http://www.who.int/globalchange/publications.pdf> >. Acesso em: 25/04/2014.
4. WHO-World Health Organization 2007 b. *Impact of Dengue*. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html> >. Acesso em: 15/05/2008.
5. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), Brasília: Ministério da Saúde, 160 p, 2009.
6. LEHANE, M. J.; AKSOY, S. Control Using Genetically Modified Insects Poses Problems for Regulators. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1495, 2012.
7. CRUZ, I. **Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith)**. Embrapa Milho e Sorgo. Documentos 21, p. 15, 2002.
8. CABRINI, I. **Desenvolvimento de metodologia para imobilização de dípteros e avaliação de adulticidas – validação com mosquitos (Diptera: Culicidae) e moscas (Diptera: Chloropidae)**. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, p. 225, 2013.
9. VILLAR L. *et al.* Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. **The New England Journal of Medicine**, vol. 372 no. 2, p. 113-23, 2015.
10. ARRUDA, E. J. *et al.* Evaluation of toxic effects with transition metal ions, EDTA, SBTI and acrylic polymers on *Aedes aegypti* (L., 1762) (Diptera: Culicidae) and *Artemia salina* (artemidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 335-341, 2010.
11. BOETHLING, R. S.; SOMMER, E.; DIFIORE, D. Designing small molecules for biodegradability: review. **Chemical Review**, v. 107, n. 6, p. 2207-2227, 2007.
12. AMOR, T. B.; JORI, G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 10, p. 915-925, 2000.
13. LUCANTONI, L. *et al.* Novel, meso-substituted cationic porphyrin molecule for photo-mediated larval control of the dengue vector *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. 1434, 2011.

14. DE SOUZA, L. M. *et al.* Efficacy of Photodynamic Therapy against larvae of *Aedes aegypti*: Confocal Microscopy and Fluorescence-Lifetime Imaging. **Proceedings of SPIE**, v. 8947, p. 89472D-1 – 89472D-9, 2014.
15. AZIZULLAH, A. *et al.* Chlorophyll derivatives can be an efficient weapon in the fight against dengue. **Parasitol Research**, v. 113, p. 4321-4326, 2014.
16. CHOUDHARY, S.; NOURI, K.; ELSAIE, M. L. Photodynamic therapy in dermatology: a review. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 6, p. 971-980, 2009.
17. TAUIL P. L. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.
18. BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 2, p. 62-73, 2005.
19. CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 225, 1994.
20. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Dengue: orientações técnicas para pessoal de campo**. Florianópolis, 2007/REVISADO 2015.
21. KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global Spread and Persistence of Dengue. **Revista de Microbiologia**, v. 62, p.71-92, 2008.
22. GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 7-16, 2010.
23. FORATINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. Sao Paulo: **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 676 - 677, 2003
24. RIGAUPÉREZ, J.G. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Lancet**, v. 19, n.352, p. 971-977, 1998.
25. HALSTEAD S. Dengue virus-mosquito interactions. **Annual Review Entomology** v. 53, p. 273-91. 2008.
26. LIMA, A.; LOVIN, D. D.; HICKNER, P. V.; SEVERSON, W. D. Evidence for an Overwintering Population of *Aedes aegypti* in Capitol Hill Neighborhood, Washington, DC. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 231 - 235, 2016.
27. ZANLUCA, C. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569 - 572, 2015.
28. FUCHS, J., *et al.* Investigating the efficacy of monovalent and tetravalent dengue vaccine formulations against DENV-4 challenge in AG129 mice. **Vaccine** v.32, n.48, p. 6537-6543, 2014.

29. OPAS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **DENGUE: Guías de atención para enfermos en la región de las Américas**. La Paz: OPAS/OMS. MS – Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica/Fundação Nacional de Saúde, Brasil, 2002.
30. MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE-SVS. **Nota técnica: O uso racional de inseticidas no controle do *Aedes aegypti* e sua utilização oportuna em áreas com transmissão de dengue**. Brasília, 2010.
31. OMS - Organização Mundial de Saúde, OMS: **Mais de 1 Milhão Morrem de Doenças Transmitidas por Insetos por Ano**, 2014, Disponível em: <<http://envolverde.com.br/saude/ano/>> . Acessado: 01/12/2014.
32. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil**, 2014.
33. BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Febre de chikungunya: manejo clínico**, 2015.
34. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Preparedness and response for Chikungunya virus: introduction in the Americas**. Washington, DC: PAHO/CDC, 2011.
35. NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **Biomed central Medicine**, v. 13, p. 1-10, 2015.
36. DONALISIO, M. R., FREITAS, A. R. R., Chikungunya in Brazil: an emerging challenge, **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 18, n. 1, p. 283 - 285, 2015.
37. DICK G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus I. Isolation and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509 -520, 1952.
38. DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.
39. IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies infectieuses**. p. 302-307, 2014.
40. PAHO/WHO. **EPIDEMIOLOGICAL ALERTA ZIKA VIRUS INFECTION 7 MAY 2015**. Disponível em: <<http://www.paho.org> 2015-archive-by-disease-zika-viruinfectios
41. OEHLER, E.; *et.al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome: Case report, French Polynesia. **Euro Surveill**, v. 19 n. 9, p. 207-210, 2014.
42. VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2 p. 9-10, 2015.

43. TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia da dengue. **Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001.
44. MADIGAN, M. T. *et. al.* **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.
45. DONALÍSIO, R. M.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.
46. BRAGA, I. A. *et al.* *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.
47. ROBERTS, F.; TURNER, D. F. Pharmacokinetics and anaesthesia. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. v. 7, n. 1, p. 25 - 29, 2007.
48. WALLACE, H. **Mosquitos Geneticamente Modificados: Preocupações Atuais**. 1 ed. Malasia: Third World Network, 2013.
49. BRAGA, I. A; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência / *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n. 4, p. 279 - 293, 2007.
50. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAUDE (OPAS). **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control**. Washington DC, n. 548, p. 109, 1995.
51. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília. 34p. 2002.
52. NAUEM, R. Insecticide mode of action: Return of the ryanodine receptor. **Pest Management Science**, v. 63, n. 7, p 628-633, 2007.
53. CRUZ, I. **Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith)**. Embrapa Milho e Sorgo. Documentos 21, p. 15, 2002.
54. HEMINGWAY, J., RANSON, H., Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 371-391, 2000.
55. WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Nomenclature and classification of drug and alcohol related problems: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ* 1981; 59: 225-45.
56. CROW, J. F. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual review of entomology**, v. 2, n. 1, p. 227-246, 1957.
57. OPPENOORTH, F. J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, p. 731-773, 1985.

58. HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, p. 1009-1015, 2000.
59. HEMINGWAY, J. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 7, p. 653-665, 2004.
60. SCHWARTZ, L. M. *et al.* The dengue vaccine pipeline : Implications for the future of dengue control. **Vaccine**, p. 3293-8, 2015.
61. GUY B, *et al.* Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. **Revista Pan-Amazônica Saúde**. p. 51-64, 2011.
62. RICHTER, P. R. *et al.* Chlorophyllin as a possible measure against vectors of human parasites and fish parasites. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, n. 18, p. 1-6, 2014.
63. BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2011.
64. KURWA, H. A.; BARLOW, R. J. The role of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical and Experimental Dermatology**, v, 8, p. 24-143, 1999.
65. KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 42, p.389-413, 2000.
66. DENIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of Photodynamic therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61. p. 340-348, 1991.
67. RYSKOVA, L.; BUCHTA, V.; SLEZAK, R. Photodynamic antimicrobial therapy. **Open Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 400-406, 2010.
68. MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas, **Química nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.
69. DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, D. K. Photodynamic Therapy for Cancer, **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 380-387, 2003.
70. ISSA, M. C. A.; AZULAY, M. M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.
71. TAPPEINER, H. V.; JODLBAUER, A. **Die sensibilisierende wirkung fluorieszierender substanzer. Gesamte Untersuchungen uber die photodynamische Erscheinung.** 1 ed. Leipzig: FCW Vogel, 1907.
72. DOUGHERTY, T.J. *et al.* Photodynamic Therapy: Review. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, p. 889-902, 1998

73. PRATES, R. A.; et. al. Terapia Fotodinâmica: Mecanismos e Aplicações. In: Fundamentos de Odontologia **Lasers em Odontologia**. Rio de Janeiro, p. 36-42, 2010.
74. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
75. DE OLIVEIRA K. T. *et. al* Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porphirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual Química**. v.7, n. 1, p. 310-335, 2015.
76. 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, p. 279-293, 2004.
77. SOARES, R. R. S. **Estudos de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
78. ALLISON R. R.; *et. al*. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 27-42, 2004.
79. DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.
80. SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 507-517, 1999.
81. SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002.
82. GEROLA, A. P. **Estudos Físico-Químicos de Derivados de Clorofila em sistemas homogêneos e Micro-Heterogêneos: Aspectos Fotofísicos, Fotodinâmicos e Fotoativantes sobre Micro-Organismos**. Dissertação Mestrado em Química. Faculdade de Química Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.
83. STERNBERG, E. D; DOLPHIN, D. Porphyrin - based Photosensitizers for use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.
84. PERUSSI, J. R. Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, 988-994, 2007.
85. DOLPHIN, D. **The porphyrins. Physical Chemistry. Part A. v.3**. New York: Academic Press, p. 463, 1978.
86. FIEDOR, L. *et. al*. Phytol as one of the Determinants of Chlorophyll Interactions in Solution. **Photosynthesis Research**, v. 78, p. 47-57, 2003.

87. AGOSTIANO, A. *et. al.* Relevance of the chlorophyll phytyl chain on lamellar phase formation and organisation. **Biophysical Chemistry**, v. 84, p. 189-194, 2000.
88. SCHEER, H. **Chlorophylls and Bacteriochlorophylls**. In: **An Overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications**. 1 ed. Illinois: Springer, p. 1-26, 2006.
89. GROSS, J. **Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 351, 1991.
90. SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p. 361-371, 2002.
91. TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
92. NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy, **Journal Photochemistry and Photobiology B**, v. 73, n. 1, p. 1-28, 2004.
93. BRANDIS, A. S.; SALOMON, Y.; SCHERZ, A. **Chlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy**. In: **Chlorophylls and Bacteriochlorophylls**. 1 ed. Illinois: Springer, p. 461-483, 2006.
94. BYONG, H.S.M.D. Photodynamic therapy using chlorophyll-a in the treatment of acne vulgaris: A randomized, single-blind, split-face study. **American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 4, p. 764-771, 2014.
95. ERZINGER, G. S. *et.al.* Optimizing conditions for the use of chlorophyll derivatives for photodynamic control of parasites in aquatic ecosystems. **Parasitology Research**, v. 109, p. 781-786, 2011.
96. WOHLLEBE, S. *et al.* Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbid as photodynamic substances. **Parasitology Research**, v. 104, p. 593-600, 2009.
97. LUKSIENE, Z.; PASKEVICIUTE, E. Novel approach to the microbial decontamination of strawberries: chlorophyllin-based photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**. v.110, p. 1274-1283, 2011.
98. WAINWRIGHT, M.; GRICE, N. J.; PYE, L. E. C. Phenothiazine photosensitizers: part 2. 3,7-Bis(arylamino)phenothiazines. **Dyes and Pigments**, v. 42, p. 45-51, 1999.
99. LIMA, L. D.; **Estudo dos efeitos da bioestimulação e da terapia fotodinâmica em *Candida albicans* monitorada por espectroscopia fotoacústica**. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004
100. MARINHO S. A. **Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida spp.* e de células epiteliais: estudo *in vitro***. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

101. WAINWRIGHT, M. *et. al.* study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75-80, 1997.
102. SEVERINO, D. *et. al.* Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 459-468, 2003.
103. HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitizers: photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications, **Current Drug Targets**, v. 6, p. 615- 627, 2005.
104. ORTH, K.; *et. al.* Photodynamic therapy of small adenocarcinomas with methylene blue. **Chirurg**, v. 66, p. 1254-1257, 1995.
105. KIRSZBERG, C.; RUMJANEK, V. M.; CAPELLA, M. A. M. Methylene blue is more toxic to erythroleukemic cells than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy, **Cancer Chemother Pharmacology**, v. 56, p. 659-665, 2005.
106. TARDIVO, J. P. *et. al.* Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 175-191, 2005.
107. MOHR, H. *et. al.* Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. **Photochemistry and Photobiology**. v. 65, n. 3, 441 - 445, 1997.
108. MOHR, H.; LAMBRECHT, B.; SELZ, A. Photodynamic Virus Inactivation of Blood Components Immunological Investigations, **Immunological Investigations**, v. 24, p. 73-85, 1995.
109. MOHR, H., LAMBRECHT, B., SCHMITT, H. Photo-Inactivation of Viruses in Therapeutical Plasma, **Developments in biological standardization**, v. 81, p. 177-183, 1993.
110. CREAGH, T.A. *et. al.* Is there a role for in vivo methylene blue staining in the prediction of bladder tumour recurrence? **British Journal of Urology**, v. 75, p. 477-479, 1995.
111. SCHAFER, M. *et. al.* Systematic Study of Parameters Influencing the Action of Rose Bengal with Visible Light on Bacterial Cells: Comparison Between the Biological Effect and Singlet-Oxygen Production. **Photochemistry and Photobiology**. v. 71, p. 514-523, 2000.
112. TSENG, S. C. G.; FEENSTRA, R. P. G.; WATSON, B. D. Characterization of Photodynamic Actions of Rose Bengal on Cultured Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 35, p. 3295, 1994.
113. ZHILIANG J., *et al.* Improved quantum yield for photocatalytic hydrogen generation under visible light irradiation over eosin sensitized TiO₂—Investigation of different noble metal loading. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.259, p. 275-280, 2006.

114. VERA F. *et al.* Preparation and characterization of Eosin B- and Erythrosin J-sensitized nanostructured NiO thin film photocathodes. **Thin Solid Films** v. 490 p.182-188, 2005.
115. FLEISCHER, B. 100 years ago: Giemsa's solution for staining of Plasmodia. **Tropical Medicine and International Health**. V. 9, p. 755-756, 2004.
116. LILLE *et. al.* Two component stain composition for producing a Giemsa blood stain effect. **Histopathologic Technique and Practical Histochemistry**, 3rd ed., McGraw Hill, New York p. 584-589, 1965.
117. WAINWRIGHT, M.; AMARAL, L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. **Tropical Medicine & International Health**, v. 10, n.6, p. 501-1, 2005.
118. JORI, G.; REDDI, E. **Second-generation photosensitizers for the photodynamic therapy of tumours**. In: **Light in Biology and Medicine**. 1 ed. London: Plenum Press, p. 253-266, 1991.
119. STRACKE, F.; HEUPEL, M.; THIEL, E. "Singlet molecular oxygen photosensitized by Rhodamine dyes: correlation with photophysical properties of the sensitizers". **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 126, p. 51-58, 1999.
120. BONNET, R. Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 19-33, 1995.
121. ZIMCIK, P.; MILETIN, M. **Dyes and Pigments: New Research**. 1 ed. New York: Nova Science Publishers, 2009.
122. HAIGH, D. A. Eosin solution: A dermatology treatment rediscovered. **Journal of community Nursing**, v. 29, n. 3, p. 54-60, 2015.
123. BUXTON P. K. ABC of dermatology: bacterial infection. **British Medical Journal**, v. 296, p. 189-192, 1988.
124. BUXTON P. K. ABC of dermatology. Leg ulcers. **British Medical Journal**, v. 295, p. 1542-1545, 1987.
125. WANG, H. *et al.* The phototoxicity of xanthene derivatives against *Escherichia Coli*; *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, v. 52, p.15, 2006.
126. GAO, D. *et. al.* Investigation of the pH dependent binding of eosin Y and bovine serum albumin by spectral methods. **Journal of Luminescence**, v.127, p.515-522, 2007.
127. GOING, S. M. ABC of dermatology. Treatment of psoriasis. **British Medical Journal**, v. 295, p. 984-986, 1987.
128. WAHEED, A. A.; GUPTA, P. D. Application of an eosin B dye method for estimating a wide range of proteins. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 33, p. 187-196, 1996.

129. NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal Photochemistry and Photobiology B**, v. 73, n. 1, p.1-28, 2004.
130. WILSON, B. C. Light sources for photodynamic therapy. **Photodynamic Therapy News**. v. 1, p. 6-8, 1998.
131. TOREZAN, L.; NIWA, A.B.M.; NETO, F. C. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles and clinical use. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.84, n.5, p.445-59. 2009.
132. MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future; **Photodiagnosis Photodyn Ther**. v. 1, p. 43-48, 2004.
133. BRANCALEON, L.; MOSELEY, H.; Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. **Lasers Medical Science**, v. 17, p. 173-186, 2002.
134. SOUZA, J. S. I. **Enciclopédia agrícola brasileira**: E-H. EdUSP. pp. 190 – 191. ISBN 978-85-314-0584-6, 1995.
135. CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Resistência a inseticidas em populações de *Simulium* (Diptera, Sumiidade). **Cadernos Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 661-671, 2002.
136. NONOMURA, Y. *et. al.* Spectroscopic properties of chlorophylls and their derivatives. Influence of molecular structure on the electronic state. **Chemical Physics**. v. 220, p.155-166, 1997.
137. RABINOVITCH, E.; EPSTEIN, L. F. Polymerization of dye stuffs in solution-Thionine and methylene blue. **Journal of the American Chemical Society**, v. 63, p. 69-78, 1941.
138. KIERNAN, J. A. On chemical reactions and staining mechanisms, subsection what is Giemsa stain and how does it color blood cells, bacteria and chromosomes? In: Kumar GL, Kiernan JA, editors. Education Guide-Special Stains and H and E. 2nd ed. California: Dako North America, Carpinteria, Cap. 19, p. 167-76, 2010.
139. BELLO, O. S.; OLUSEGUN, A. O.; NJOKU, V. O. Fly ash: an alternative to powdered activated carbon for the removal of eosin dye from aqueous solutions. **Chemical Society of Ethiopia**, v. 27, p.191-204, 2013.
140. BRASIL, Controle de vetores: Procedimentos de segurança. FUNASA. Brasília: Ministério da Saúde: 208 p. 2001a.
141. BRASIL, Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. FUNASA. Brasília: Ministério da Saúde: 84 p. 2001b.
142. CLARK, T. M. *et. al.* 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, p. 457 - 468, 2005.

143. DADD, R. H. Alkaline within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. **Journal Insect Physiol.** v. 21, p. 1847-1853, 1975.

144. LOZOVEI, A. L. **Culicídeos** (Mosquitos). In: C. B. Marcondes (Ed.). Entomologia média e veterinária. Atheneu, p. 432, 2001.

145. FILIETAZ, C. F. T. **Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos o papel fisiológico das lipases.** Dissertação Mestrado em Biologia. Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo USP, São Paulo, 2011.

146. POOLER, J. P.; VALENZENO, D. P. The role of singlet oxygen in the photooxidation of excitable cell membranes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 30, p. 581– 589, 1979.

147. SPIKES, J. D.; MACKNIGHT, M. L. Dye-sensitized photooxidation of proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 171, p. 149 – 162, 1970.

8 ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 06 de agosto de 2014.

Senhora Pesquisadora:

Alessandra Ramos Lima

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **012/2014 – CEUA/UFGD** - intitulado **“Avaliação de metalo-clorofilas como agente fotossensibilizador em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)”** foi integralmente **APROVADO** e poderá ser conduzido.

Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio de notificação à CEUA sobre o término do projeto.

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA