



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Thiago Revers Dreyer

Estudo fotodinâmico da clorofila α , azul de metileno e rosa bengala como agente inseticida contra *Aedes aegypti*

Botucatu
2009

Thiago Revers Dreyer

Estudo fotodinâmico da clorofila α , azul de metileno e rosa bengala como agente inseticida contra *Aedes aegypti*

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Botucatu
2009

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP

Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Dreyer, Thiago Revers.

Estudo fotodinâmico da clorofila a, azul de metileno e rosa bengala como agente inseticida contra *Aedes aegypti* / Thiago Revers Dreyer. – 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Física Médica) –
Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

1. Inseticidas - Pesquisa. 2. *Aedes aegypti* - Controle

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Azul de metileno; Clorofila *a*;
Rosa bengala; Terapia fotodinâmica

Agradecimentos

À minha família pelo apoio em todos os aspectos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, pela oportunidade oferecida, pela formação acadêmica e respeito profissional, além dos momentos de descontração e bom humor.

Ao pessoal de casa, Woner e Angelo, pela ajuda com a instrumentação. Ao Zandoná pelos conselhos e pelas conversas. E especialmente à Carine pelo carinho, amor e paciência incondicionais.

À Fapesp, pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.

Resumo

Terapia fotodinâmica (TFD), termo introduzido por von Tapeinner em 1900, pode ser definida como a administração de uma droga não tóxica, ou seja, um corante, conhecido como fotossensibilizador (FS) que posteriormente será iluminado com luz com comprimento de onda específico. A TFD se baseia na interação entre o FS, oxigênio e luz, que através de reações fotoquímicas causam morte celular. As moléculas do FS tem uma alta probabilidade de formação do estado singleto após a excitação, o qual pode induzir mudanças químicas na vizinhança por duas vias, chamadas de reações tipo I e reações tipo II. A reação tipo II se baseia na troca de energia para o oxigênio molecular, que passa a um estado de maior energia (singleto), tornando-se altamente reativo. Os mecanismos propostos para a morte celular são ligados ao dano no DNA, à mitocôndria, dano à membrana citoplasmática. Vários testes pré-clínicos e clínicos já foram realizados e a TFD já é regulamentada em vários países para tratamento principalmente contra determinados tipos de câncer. A terapia também vem ganhando força no controle antimicrobiano, uma vez que os microorganismos tem se apresentado cada vez mais resistentes aos antibióticos atualmente utilizados. Outra tentativa de utilização da TFD é na inativação de macroorganismos, tais como os microcrustáceos e mosquitos. Com esta finalidade foi testada a ação fotodinâmica dos fotossensibilizadores azul de metileno, rosa bengala e clorofila *a* contra o mosquito vetor da dengue e da febre amarela, o *Aedes aegypti*. Uma vez que tais doenças não possuem tratamentos eficazes, seu controle está ligado ao controle do vetor, o qual vem apresentando resistência aos inseticidas químicos utilizados. Com base nisso o trabalho mostra sua importância, pois se trata de uma nova modalidade de controle do mosquito, uma vez que todos os fotossensibilizadores utilizados são de baixo custo, nas concentrações utilizadas não geram produtos tóxicos e apresentaram bons resultados de mortalidade, sendo que a melhor foi a do rosa bengala e a pior a da clorofila *a*.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, azul de metileno, rosa bengala, clorofila *a*, *Aedes aegypti*.

Abstract

Photodynamic therapy, term introduced by von Tapeiner in 1900, can be defined as the administration of a non toxic drug, i.e., a dye, known as photosensitizer (FS), which subsequently will be illuminated with light of specific wavelength. PDT is based on the interaction among FS, oxygen and light, which through photochemical reactions cause cell death. The FS molecules must have a high probability to form the singlet state after the excitation, which can induce chemical changes in the neighborhood in two ways, called reactions type I and type II. The type II reaction is based on the exchange of energy to molecular oxygen, exciting it to its state of higher energy (singlet), which is highly reactive. The proposed mechanisms for cell death are linked to damage to the DNA, mitochondria and to the cytoplasmic membrane. Several pre-clinical and clinical trials have been carried out and the PDT is already used in many countries for treatment mainly against certain types of cancer. The therapy also has been gaining strength in antimicrobial control, since the microorganisms have appeared increasingly resistant to current antibiotics. Another attempt to use the PDT is for the inactivation of macro-organisms, such as micro-crustaceans and mosquitoes. To this end I tested whether the photosensitizers methylene blue, rose Bengal and the chlorophyll *a* has insecticidal activity against the yellow fever and dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. Since these diseases have no effective treatments, its control is linked to the vector control, which has shown resistance to chemical pesticides used. Based on this, this work shows its importance, because it is a new type of mosquito control since all the photosensitizers used are low cost, do not generate toxic products at the concentrations used and showed good results in mortality. The best photosensitizer was rose Bengal and the worst was chlorophyll *a*.

Key-words: photodynamic therapy, methylene blue, rose Bengal, chlorophyll *a*, *Aedes aegypti*.

Índice

	Página
Resumo	4
<i>Abstract</i>	5
1 Introdução	7
2 Objetivo	12
3 Metodologia	13
3.1 Metodologia da extração e quantificação da clorofila α	13
3.2 Avaliação do efeito da clorofila α , rosa bengala e azul de metileno, sem exposição à luz, sob o desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	13
3.3 Montagem dos sistemas de iluminação	13
3.4 Avaliação do efeito da clorofila α , rosa bengala e azul de metileno, com exposição à luz, sobre a mortalidade do mosquito <i>A. aegypti</i>	15
4 Resultados e discussões	16
4.1 Avaliação do efeito da clorofila α , rosa bengala e azul de metileno, sem exposição à luz, sob o desenvolvimento do mosquito <i>A. aegypti</i>	16
4.2 Avaliação do efeito fotodinâmico da clorofila α , rosa bengala e azul de metileno sobre a mortalidade do mosquito <i>A. aegypti</i>	24
5 Conclusões	27

1 Introdução

Terapia fotodinâmica (TFD), termo introduzido por von Tappeiner em 1900 (von Tappeiner, 1900), pode ser definida como a administração de uma droga não tóxica, ou seja, um corante, conhecido como fotossensibilizador (FS) que posteriormente será iluminado com luz com comprimento de onda específico (Robertson et. al, 2009).

A TFD se baseia na interação do fotossensibilizador, oxigênio e luz, que através de reações fotobioquímicas causam morte celular. As moléculas do FS tem uma alta probabilidade de formação do estado singlete após a excitação. O fotossensibilizador ativado no estado tripleto pode induzir mudanças químicas na vizinhança por duas vias, chamadas de reações tipo I e reações tipo II (Maisch, 2007; Juzeniene et al., 2006; Castano et al., 2004; Huang, 2006).

A reação tipo I ocorre quando há transferência de elétrons ou prótons para o oxigênio ou moléculas adjacentes para formar um ânion ou cátion. Esses radicais reagem com oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse tipo de reação frequentemente resulta na formação de ânions superóxidos pela transferência de um elétron do fotossensibilizador ao oxigênio molecular (Plaetzer et. al, 2009).

As reações tipo II se baseiam na troca de energia (não elétrons) para o oxigênio molecular. Esta molécula tem um atributo especial, pois a configuração do estado tripleto ($^3\text{O}_2$) representa o estado de mais baixa energia da molécula. Durante a transferência de energia, o oxigênio singlete, altamente reativo é formado. As reações do tipo I e tipo II ocorrem paralelamente e a taxa de ocorrência depende de vários parâmetros, como o FS usado e da concentração do oxigênio (Plaetzer et. al, 2009). Mas para a maioria dos fotossensibilizadores, as reações do tipo II são predominantes (Maisch, 2007; Juzeniene et al., 2006; Castano et al., 2004; Huang, 2006).

Há alguns mecanismos que foram propostos para a morte de microorganismos, por exemplo: (i) dano no DNA (Robertson et. al, 2009); (ii) dano à mitocôndria, que pode levar a apoptose mesmo em baixas doses de luz (Zhu & Finlay, 2008); (iii) dano à membrana citoplasmática, permitindo o extravasamento de substância intracelular ou inativação de membrana causando dano aos sistemas de transportes e enzimas (Hamblin & Hasan, 2004).

Todos os corantes utilizados em TFD devem possuir algumas características básicas, são elas: (i) alta absorção para longos comprimentos de onda, para máxima penetração da luz no tecido, (ii) alto rendimento quântico, e que, de preferência, seja fluorescente para fácil monitoramento de distribuição por espectroscopia ou imageamento, (iii) alta estabilidade, (iv) seleção preferencial em alguns tecidos (Wilson & Patterson, 2008; Soares, 2006; Detty et al., 2004; Allison et al., 2004). Outro fator que está sendo considerado atualmente é a lipossolubilidade, que é relacionada com a localização intracelular (Juzeniene, 2006).

Os fotossensibilizadores podem ser administrados sistemicamente ou de forma tópica, dependendo do tratamento e da finalidade a ser obtida. A terapia pode ser realizada de forma repetida, pois ela não apresenta efeitos tóxicos cumulativos e geralmente não é realizada de forma invasiva (Castano et al., 2004).

As quatro principais classes de fotossensibilizadores são os derivados de porfirina, clorinas, ftalocianinas e porfírenos que exibem diferentes propriedades fotoquímicas e fotofísicas em termos de mecanismos de ação e de ativação pela luz (Robertson et. al, 2009).

As maiores desvantagens associadas com a primeira geração de fármacos (porfirinas), eram a sensibilidade na pele e baixa absorção a 630nm, não possibilitando o tratamento de alguns tipos de câncer e outras doenças, reduzindo significativamente o êxito da aplicação destes fotossensibilizadores para um campo mais vasto de doenças (Juzeniene, 2006; Soares, 2006). Isso impulsionou o desenvolvimento de uma segunda geração de drogas, concebidas para minimizar os inconvenientes da primeira geração, que foi chave para o desenvolvimento da terapia fotodinâmica. A pesquisa na chamada terceira geração de fármacos vem sendo desenvolvida para aumentar a seletividade e especificidade do fotossensibilizador para aumentar a absorção celular (Josefsen & Boyle, 2008). Várias estratégias vem sendo desenvolvidas, seja por emulsões óleo-água em lipossomos, nanopartículas como veículos carreadores, para que seja aumentada a eficiência do tratamento (Alvarez et al., 2004; Nyman & Hynninen, 2004). Novas pesquisas também tem sido realizadas acoplando-se o fotossensibilizador a peptídeos, para que a nova molécula conjugada consiga permear mais facilmente as barreiras das células neoplásicas, aumentando assim o rendimento do tratamento (Thomas et. al, 2009).

Alguns grupos vem desenvolvendo novos fotossensibilizadores derivados de produtos naturais, tal como as clorofilas e feofitinas. A clorofila é o mais abundante pigmento verde distribuído entre as plantas, sendo que ela pode ser transformada em diferentes formas (Li et al., 2007).

A clorofila *a* é um protótipo da classe das clorinas de produtos naturais, sendo considerada uma fonte para o desenvolvimento de fotossensibilizadores efetivos para TFD (Detty et al., 2004; Brandis et al., 2005). Durante 15 anos de trabalho o Centro de Terapia Fotodinâmica do Instituto Roswell Park Center (Bufalo, Nova Iorque, Estados Unidos) sintetizou e testou mais de 600 novos fármacos derivados de clorofila *a* e bacterioclorofila *a* para teste de eficácia *in vitro/in vivo* em variadas doses e concentrações, testou também a absorção da droga por tumores, localização intracelular, fototoxicidade e imageamento através de fluorescência e ressonância magnética (Pandey et al., 2006).

Após a realização de testes pré-clínicos e clínicos, vários fotossensibilizadores/tratamentos já foram aprovados, pelos órgãos competentes, em diversos países, alguns deles são: câncer de esôfago, pulmão, bexiga, displasia cervical já foram aprovados no Canadá (1993), Holanda (1994), Japão (1994), EUA (1995), dentre outros países, utilizando-se o Photofrin; câncer de pescoço e cabeça foi aprovado na Europa (2001) utilizando-se o Foscan; psoríase e câncer de pele não melanômico, aprovado na Alemanha (1997) utilizando o ATMPn (Josefsen & Boyle, 2008; Plaetzer et. al, 2009), dentre vários outros.

Outro ramo da TFD, a chamada Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, ficou desde a metade do século passado “esquecida” devido à descoberta dos antibióticos. Certamente, nas últimas décadas em todo o mundo ocorreu a seletividade natural dos microorganismos que levou à pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas (Maisch, 2007), as quais têm apresentado vários resultados satisfatórios no controle microbiano (Wilson, 2004; Tegos et al., 2005; Kreitner et al., 2003).

Esta modalidade de inativação de microrganismos tem uma grande vantagem, pois até hoje não há relato sobre mecanismos de resistência contra as espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, o mecanismo de ação do ROS é mais ou menos específico em termos de dano oxidativo da bactéria em contraste aos antibióticos atualmente utilizados (Maisch, 2009).

Outra tentativa de utilização da TFD é na inativação de macroorganismos, tais como os mosquitos que também apresentam cada vez mais resistência aos inseticidas utilizados. Mosquitos são responsáveis pelo espalhamento de mais doenças que qualquer outro grupo de artrópodes (Gu et. al, 2009). Uma das piores arboviroses transmitidas pelos mosquitos é a dengue, e uma vez que, um tratamento específico e uma vacina eficiente ainda não são viáveis para o controle da doença (Chapagain et. al, 2008), a única medida disponível depende do controle do vetor, no caso o *Aedes aegypti*. O controle químico com inseticidas de origem orgânica ou sintética é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (Rose, 2001). Os de origem botânica apresentam uma vantagem sobre os sintéticos, pois são menos tóxicos, tem menor tendência ao desenvolvimento de resistência e são facilmente biodegradáveis (William, 2007).

De modo geral, os mosquitos vetores de agentes infecciosos manifestam alto grau de “plasticidade” genética, geram indivíduos com resistência múltipla a inseticidas tanto químicos como biológicos utilizados no seu controle (Groetes & Tabachnik, 2000; Hemingway & Ranson, 2000; Ferre & Van Rie, 2002).

O ciclo de desenvolvimento do *A. aegypti* compreende quatro estágios: ovo, larva (4 estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 1). O crescimento e o desenvolvimento das larvas variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro. Este ciclo geralmente se desenvolve em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 10 e 15 dias, contribuindo para o aumento da densidade populacional desta espécie. O período de vida do mosquito adulto é de poucas semanas, podendo chegar a 45 dias. Os ovos de *A. aegypti* têm alta capacidade de resistir à dessecação. Esta capacidade deve-se a um fenômeno denominado diapausa que é caracterizado pela suspensão de função e desenvolvimento desses ovos. Nos culicídeos este fenômeno ocorre quando a larva de primeiro estágio já está formada, mantendo-se viável na ausência de água por até 450 dias. Os ovos com desenvolvimento completo quando colocados em contato com a água, desencadeiam o processo de eclosão das larvas dando início ao ciclo de desenvolvimento (Honório, 1999).

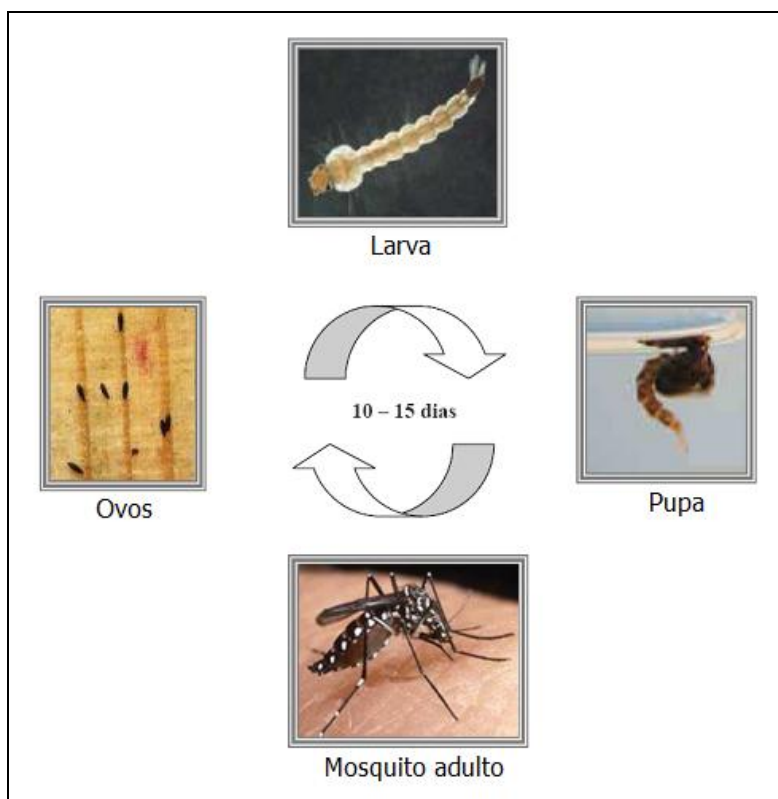


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

Fatores como o rápido crescimento da população humana, investimentos limitados para os programas de controle do mosquito, falta de consciência com as mudanças ambientais e com a adaptabilidade dos mosquitos vetores, resultaram em um aumento nas doenças transmitidas por mosquitos (Koodalingam et. al, 2009). Por isso, os esforços no controle do mosquito continuam sendo uma importante estratégia na prevenção de doenças (Billingsley, 2008). O uso de sintéticos químicos com propriedades inseticidas como os organoclorados, organofosfatados e piretróides tem provado ser o método efetivo mais importante no controle de mosquitos e de outros insetos por todo o mundo. Entretanto suas aplicações extensivas e indiscriminadas fizeram com que mosquitos desenvolvessem resistência e causaram efeitos tóxicos e letais aos organismos não alvos (Koodalingam et. al, 2009). Devido a tais consequências dos inseticidas químicos, vários pesquisadores (Chapagain et. al, 2008; Costa et. al, 2005; Lucia et al., 2008) tem se voltado à pesquisa de plantas para encontrar alternativas e compostos não danosos ao ambiente com potente atividade antimosquito.

2 Objetivo

Avaliar o efeito fotodinâmico dos fotossensibilizadores azul de metileno, rosa bengala e clorofila *a* como agente inseticida contra o mosquito *Aedes aegypti*.

3 Metodologia

3.1 Metodologia da extração e quantificação da clorofila-a.

A adaptação da metodologia de Ritchie (Ritchie, 2008) para extração e quantificação da clorofila *a* para a espécie *Citrus limon* foi supervisionada e aprovada pelo departamento de Química e Bioquímica da Unesp – Botucatu. A quantificação foi realizada com espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, EUA) em comprimentos de onda de 630, 647, 664 e 691nm. E a concentração foi calculada através da equação:

$$[\text{Clorofila-a}] = -0.3319 \cdot A_{630} - 1.7485 \cdot A_{647} + 11.9442 \cdot A_{664} - 1.4306 \cdot A_{691} \quad (\text{Equação 1})$$

em que “A” significa a absorção aferida pelo espectrofotômetro e o índice subscrito refere-se ao valor do comprimento de onda e [Clorofila-a] indica a concentração final de clorofila *a* na solução.

3.2 Avaliação do efeito da clorofila *a*, do rosa bengala e do azul de metileno, sem exposição à luz, sob o desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*.

Foram colocados ovos de mosquitos em diferentes concentrações de clorofila *a* (0,5µg/mL, 0,05 µg/mL e 0,005 µg/mL), e foi verificado o tempo necessário para eclosão e para o desenvolvimento das larvas até a fase de mosquito. Também foram colocadas larvas (fase L1) nas concentrações supracitadas de clorofila para verificar a taxa de sobrevivência após 24 horas. Para o azul de metileno e para o rosa bengala foram realizados os mesmos procedimentos com concentrações de 0,1mg/mL, 0,01mg/mL e 0,001mg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata e com todos os controles necessários.

3.3 Montagem dos Sistemas de Iluminação

O sistema de iluminação com LED foi projetado e executado pelo aluno de Iniciação Científica em conjunto com dois outros discentes do curso de Física Médica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Botucatu.

O Sistema para iluminação do corante azul de metileno consiste de 6 LEDs (LPEL-06R3-B, Cromatek, Brasil), com comprimento de onda predominante em 630nm. Os LEDs foram ligados

em série e fixados em uma placa de alumínio. Todo o sistema é refrigerado por um *cooler* para maior dissipação do calor, evitando superaquecimento e grandes variações de temperatura.



Figura 2. Vista lateral (foto esquerda) e vista inferior (foto direita) do equipamento para iluminação confeccionado para iluminação das soluções com azul de metileno.

O sistema para iluminação do corante rosa bengala foi projetado e executado do mesmo modo, apenas substituindo-se os LEDs anteriormente citados por LEDs (LPEL-06G3-B, Cromatek, Brasil) com comprimento de onda dominante de 530nm.

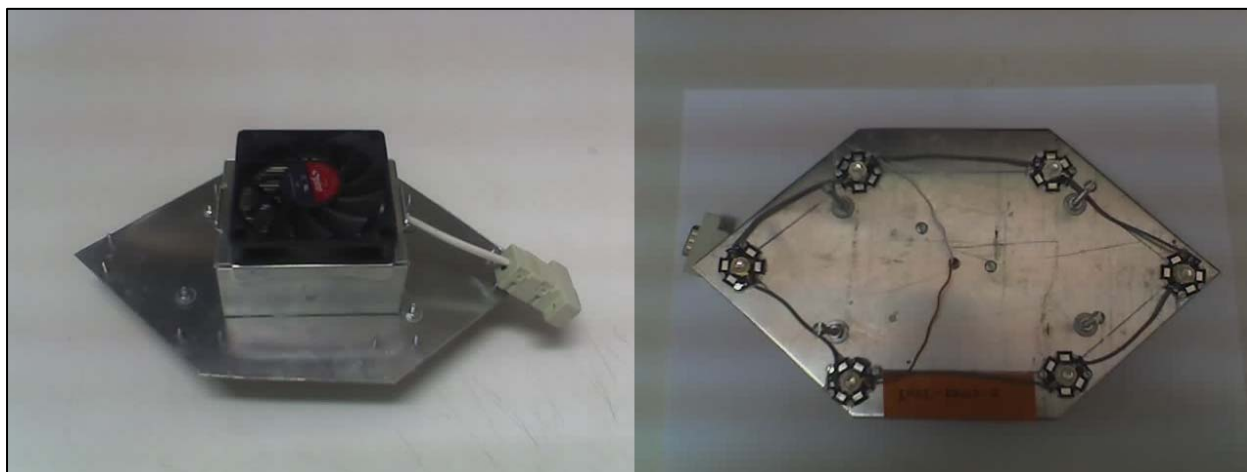


Figura 3. Vista superior (foto esquerda) e vista inferior (foto direita) do equipamento de iluminação confeccionado para iluminação das soluções com rosa bengala.

O sistema de iluminação da clorofila a é composto por lâmpadas fluorescentes de 20W (TLT 20W/75RS, Philips, Brasil) que, segundo o fabricante, tem o espectro similar com o espectro solar.

3.4 Avaliação do efeito da clorofila *a*, rosa bengala e azul de metileno, com exposição à luz, sobre a mortalidade do mosquito *A. Aegypti*

Larvas e pupas do mosquito *Aedes aegypti* foram mantidas em diferentes concentrações de clorofila *a* (0,05 µg/mL e 0,005 µg/mL), e iluminados com energias de 1, 2, 4, 8 e 16J, com irradiância de 5.5mW.cm⁻². A mesma quantidade de larvas e pupas foram mantidas em soluções de rosa bengala (Vetec, Brasil) em concentrações de 0,01mg/mL e 0,001mg/mL, e iluminados com energias de 1, 2, 4, 8 e 16J, com irradiância de 10mW.cm⁻². Para o azul de metileno (Dinâmica, Brasil) foram adotadas as mesmas concentrações, energias e irradiâncias do rosa bengala. Para todos os fotossensibilizadores foram verificadas as taxas de mortalidade até 48 horas após a irradiação. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4 Resultados e Discussões

4.1 Avaliação do efeito da clorofila *a*, rosa bengala e azul de metileno, sem exposição à luz, sob o desenvolvimento do mosquito

Quando as larvas na fase L1 foram colocadas em solução contendo clorofila *a* nas concentrações supracitadas, os resultados de sobrevivência, com os testes realizados em triplicata, foram os seguintes.

Tabela 1. Tabela dos resultados de sobrevivência das larvas após serem colocadas em soluções com diferentes concentrações de clorofila *a*. T1, T2, T3 e C se referem aos testes 1, 2 e 3 e ao controle, respectivamente.

Clorofila <i>a</i> (µg/mL)	Nº de Larvas	Nº sobreviventes				Desvio Padrão
		T1	T2	T3	C	
0,5	15	1	2	1	15	0,6
0,05	15	14	14	13	15	0,6
0,005	15	15	15	14	14	0,6

Com base nos resultados dos testes acima, pode-se concluir que apenas a concentração de 0,5µg/mL apresentou toxicidade às larvas. O teste mostrou-se plausível, pois de acordo com as fotografias tiradas, com as larvas ainda vivas, demonstrava claramente que elas continham clorofila em seu interior, como pode ser confirmado na figura abaixo.

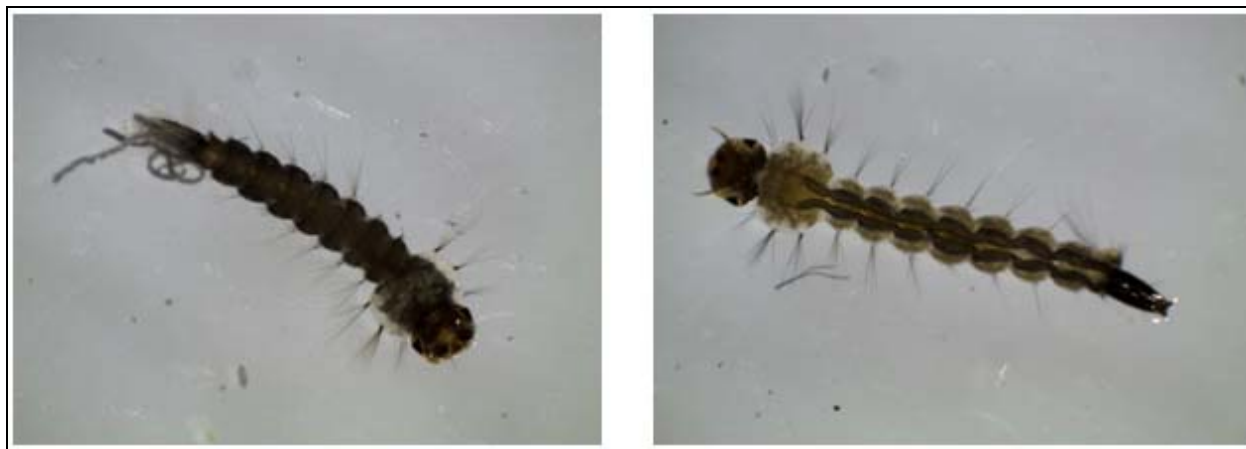


Figura 4. Fotografia da larva controle (esquerda) e da larva colocada em solução com clorofila *a* (direita).

Para a determinação dos efeitos das diferentes concentrações de clorofila *a*, sem iluminação, no desenvolvimento dos ovos do *A. aegypti*, foram colocados 20 ovos, em soluções com as concentrações já citadas do fotossensibilizador. A evolução temporal do processo de

eclosão e desenvolvimento da larva está abaixo caracterizado, em que L1, L2 e L3 correspondem às fases L1, L2 e L3 da larva do mosquito.

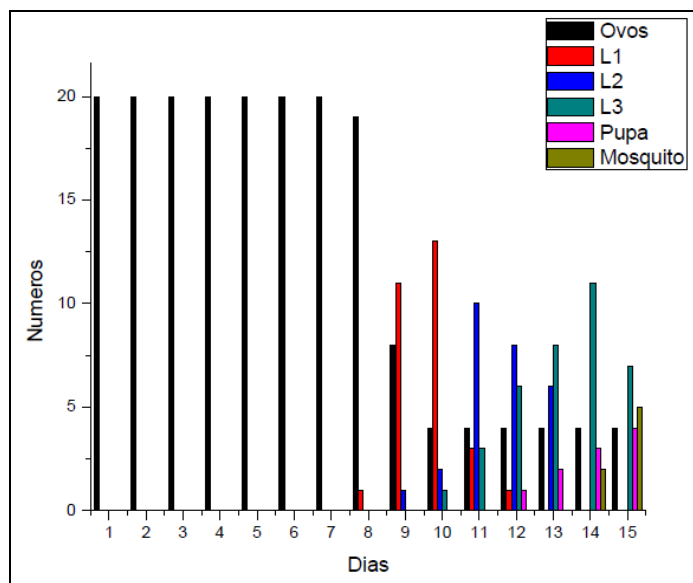


Figura 5. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando colocadas em água mineral (controle).

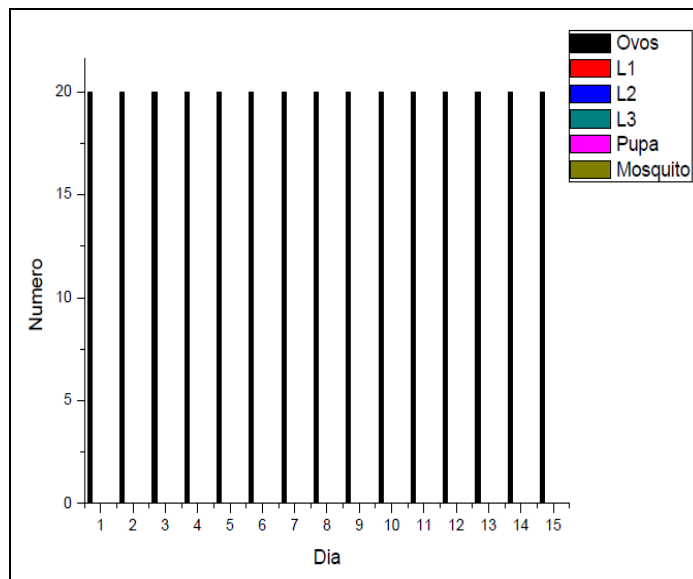


Figura 6. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de clorofila *a* com concentração de 0,5µg/mL.

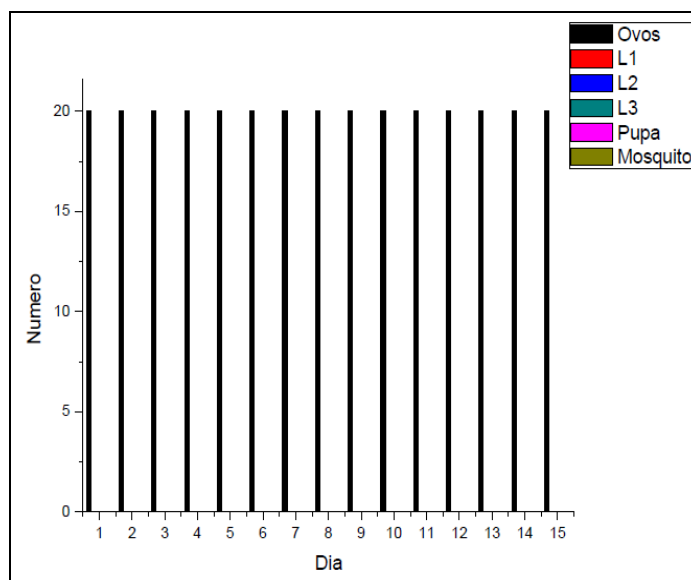


Figura 7. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de clorofila *a* com concentração de 0,05µg/mL.

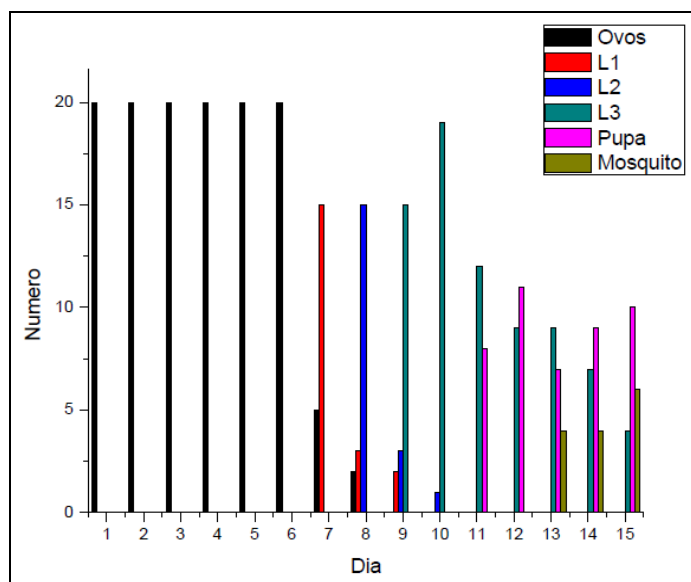


Figura 8. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de clorofila *a* com concentração de 0,005µg/mL.

Pelos gráficos acima expostos quando comparados ao gráfico do controle (figura 5), pode-se aferir que as concentrações de clorofila *a* de 0,5 e 0,05µg/mL são tóxicas para os ovos ou de alguma forma inibem o processo de eclosão dos ovos.

Para o azul de metileno foram realizados os mesmos procedimentos e foram obtidos os seguintes resultados de sobrevivência das larvas.

Tabela 2. Tabela dos resultados de sobrevivência das larvas após serem colocadas em soluções com diferentes concentrações de Azul de Metileno. T1, T2, T3 e C se referem aos testes 1, 2 e 3 e ao controle, respectivamente.

Azul de Metileno (mg/mL)	Nº de Larvas	Nº sobreviventes				Desvio Padrão
		T1	T2	T3	C	
0,1	15	3	5	5	15	1,2
0,01	15	14	15	14	15	0,6
0,001	15	15	14	15	14	0,6

Com base nos resultados da tabela 2, pode-se aferir que apenas a concentração de 0,1mg/mL apresentou toxicidade às larvas. Todas as concentrações de azul de metileno penetraram no mosquito, como pode ser observado pela fotografia abaixo.

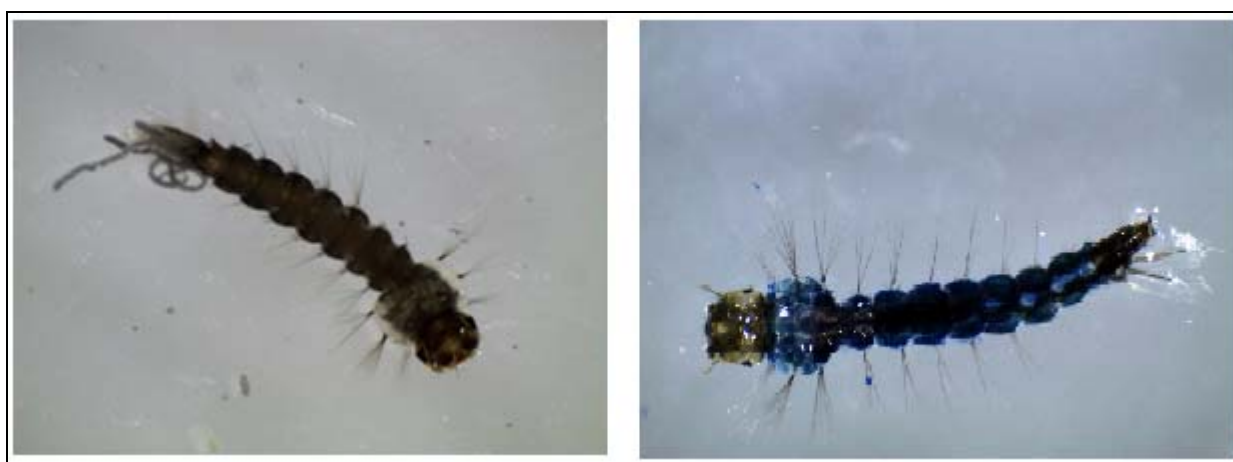


Figura 9. Fotografia da larva controle (esquerda) e da larva colocada em solução com azul de metileno (direita).

Para a determinação dos efeitos das diferentes concentrações de Azul de Metileno, sem iluminação, no desenvolvimento dos ovos do *A. aegypti*, foram colocados 20 ovos, em soluções com as concentrações já citadas do fotossensibilizador. A evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva está abaixo caracterizado, em que L1, L2 e L3 correspondem às fases L1, L2 e L3 da larva do mosquito.

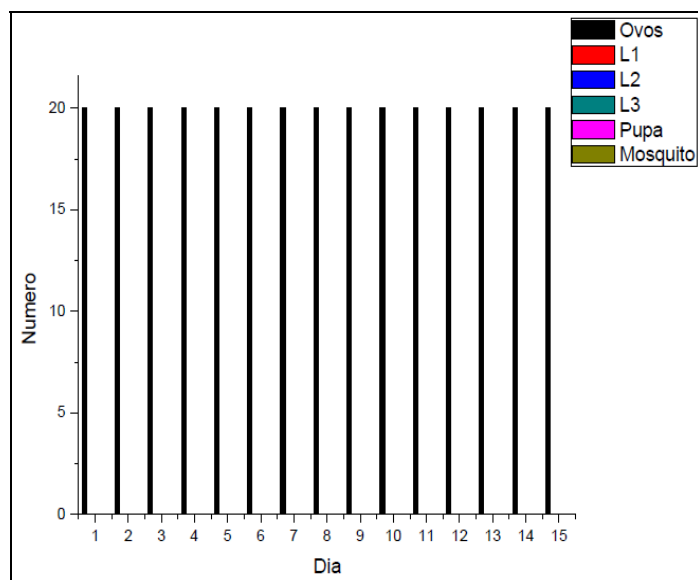


Figura 10. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de azul de metileno com concentração de 0,1mg/mL.

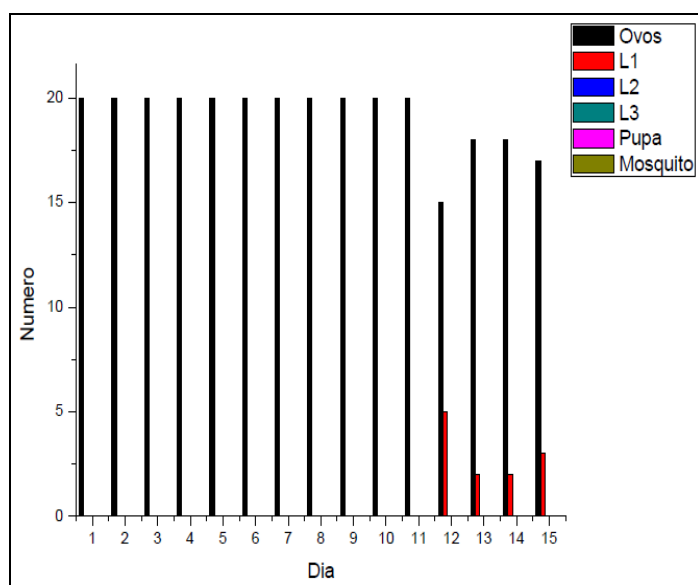


Figura 11. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de azul de metileno com concentração de 0,01mg/mL.

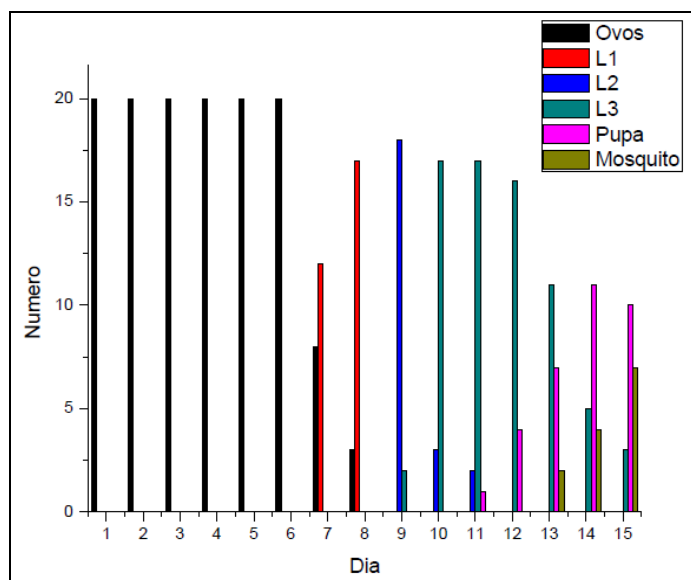


Figura 12. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de azul de metileno com concentração de 0,001mg/mL.

Pela análise dos gráficos e comparando-os com o do controle (figura 5), para o caso do azul de metileno, conclui-se que as concentrações tóxicas ou que inibem a eclosão dos ovos são de 0,1mg/mL e com menor intensidade 0,01mg/mL, mas ainda prejudiciais ao desenvolvimento pleno dos ovos. A concentração de 0,001mg/mL praticamente não inibiu o desenvolvimento.

Quando as larvas na fase L1 foram colocadas em solução contendo rosa bengala nas concentrações supracitadas, os resultados de sobrevivência, com os testes realizados em triplicata, estão na tabela abaixo.

Tabela 3. Tabela dos resultados de sobrevivência das larvas após serem colocadas em soluções com diferentes concentrações de rosa bengala. T1, T2, T3 e C se referem aos testes 1, 2 e 3 e ao controle, respectivamente.

Rosa bengala (mg/mL)	Nº de Larvas	Nº sobreviventes				Desvio Padrão
		T1	T2	T3	C	
0,1	15	5	6	8	15	1,5
0,01	15	13	15	14	15	1,0
0,001	15	15	15	15	14	0,0

De acordo com os dados da tabela 3, pode-se aferir que mesmo a concentração mais alta de rosa bengala utilizada, não é tão tóxica quanto à mesma concentração de azul de metileno e à concentração de 0,5µg/mL de clorofila *a*.

Pode-se comprovar que a larva absorveu o rosa bengala, como está demonstrado na fotografia abaixo.



Figura 13. Fotografia da larva controle (esquerda) e da larva colocada em solução com rosa bengala (direita).

Para a determinação dos efeitos das diferentes concentrações de rosa bengala, sem iluminação, no desenvolvimento dos ovos do *A. aegypti*, foram colocados 20 ovos, em soluções com as concentrações já citadas do fotossensibilizador. A evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva está abaixo caracterizado, em que L1, L2 e L3 correspondem às fases L1, L2 e L3 da larva do mosquito.

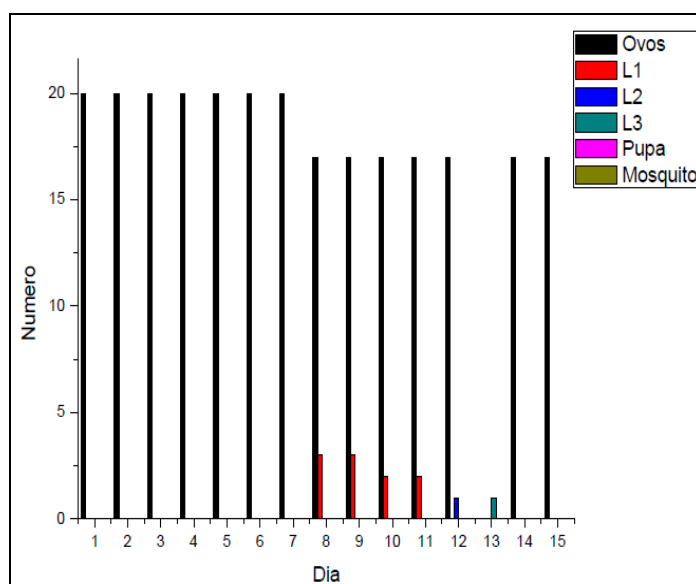


Figura 14. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de rosa bengala com concentração de 0,1mg/mL.

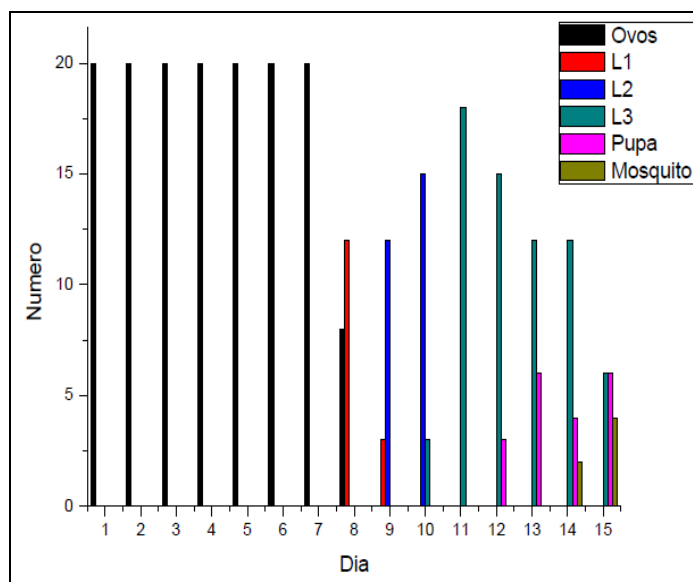


Figura 15. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de rosa bengala com concentração de 0,01mg/mL.

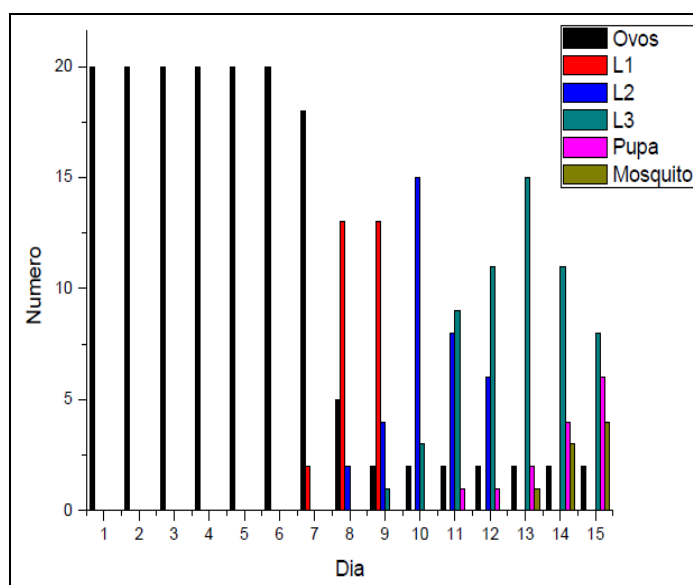


Figura 16. Evolução temporal do processo de eclosão e desenvolvimento da larva, quando em soluções de rosa bengala com concentração de 0,001mg/mL.

Pela análise dos gráficos e comparando-os com o do controle (figura 5), para o caso do rosa bengala, conclui-se que mesmo para as concentrações mais altas, o “bloqueio” da eclosão dos ovos não ocorreu embora tenham sido tóxico no desenvolvimento das larvas do mosquito.

4.2 Avaliação do efeito fotodinâmico da clorofila α , rosa bengala e azul de metileno sobre a mortalidade do mosquito *A. aegypti*

Com base nos testes acima descritos foram separadas 15 larvas, por copo, para realização dos testes do efeito fotodinâmico da clorofila α nas concentrações de 0,05 e 0,005 $\mu\text{g/mL}$ com exposição à energias de 1, 2, 4, 8 e 16J com irradiância de 5.5mW.cm^{-2} . Foram realizados testes controle, com as larvas expostas somente à energia luminosa de 1, 2, 4, 8 e 16 Joules e ao fotossensibilizador (FS). Todos os testes e controles foram feitos em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados nos gráficos abaixo (fig. 17), para as duas concentrações utilizadas.

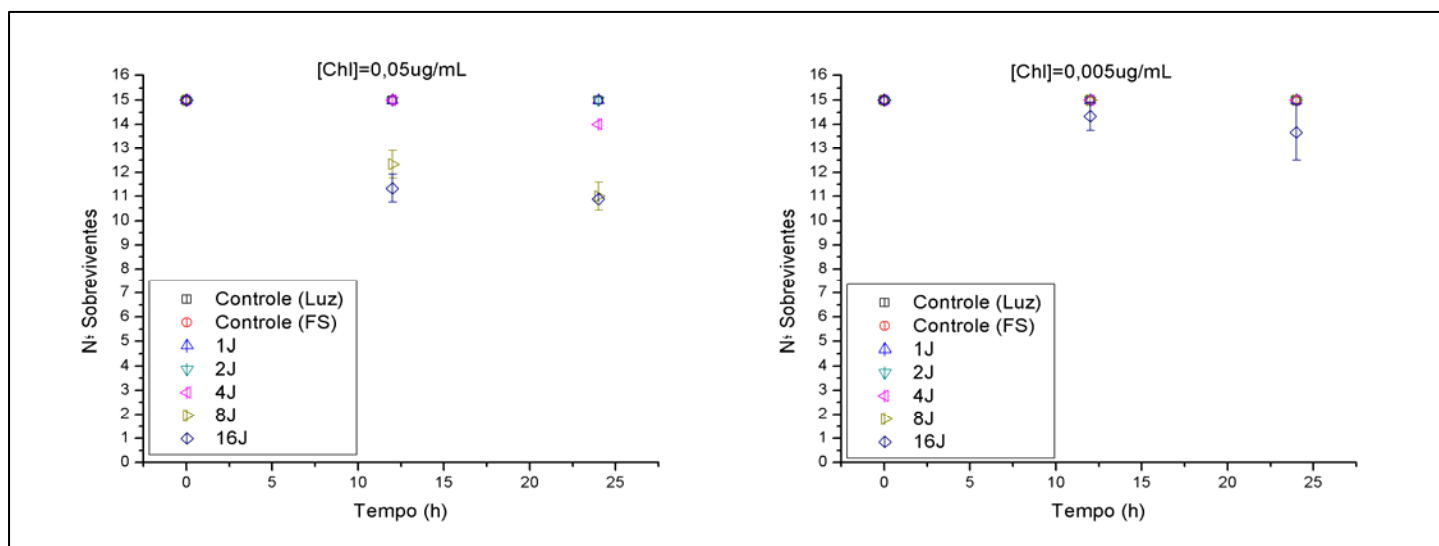


Figura 17. Gráfico da sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* aos testes fotodinâmicos com clorofila α com concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ e 0,005 $\mu\text{g/mL}$.

A análise dos gráficos permite concluir que a concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ é mais efetiva que a 0,005 $\mu\text{g/mL}$, sob as mesmas condições de iluminação e energias.

Para realização dos testes do efeito fotodinâmico do azul de metileno, nas concentrações de 0,01 e 0,001 mg/mL , foram utilizadas 15 larvas com exposição à 1, 2, 4, 8 e 16J e irradiância de 10mW.cm^{-2} . Foram realizados testes controle, com as larvas expostas somente à energia luminosa de 1, 2, 4, 8 e 16 Joules e ao fotossensibilizador (FS). Todos os testes e controles foram feitos em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados nos gráficos abaixo (fig. 18), para as duas concentrações utilizadas.

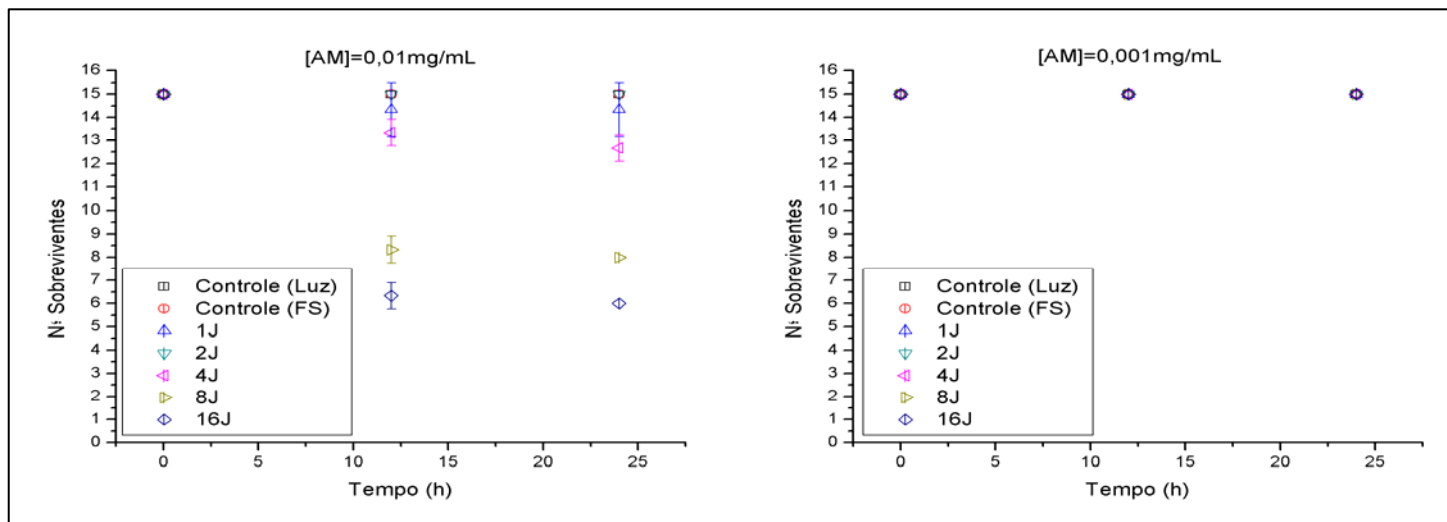


Figura 18. Gráfico da sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* aos testes da ação fotodinâmica com azul de metileno com concentração de 0,01mg/mL e 0,001mg/mL.

A análise dos gráficos permite concluir que a concentração de 0,01mg/mL é mais efetiva quando comparada à 0,001mg/mL, sob as mesmas condições de iluminação e energias.

Para realização dos testes do efeito fotodinâmico do rosa bengala, nas concentrações de 0,01 e 0,001mg/mL, foram utilizadas 15 larvas com exposição à 1, 2, 4, 8 e 16J e irradiância de 10mW.cm^{-2} . Foram realizados testes controle, com as larvas expostas somente à energia luminosa de 1, 2, 4, 8 e 16 Joules e ao fotossensibilizador (FS). Todos os testes e controles foram feitos em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados nos gráficos abaixo (fig. 19), para as duas concentrações utilizadas.

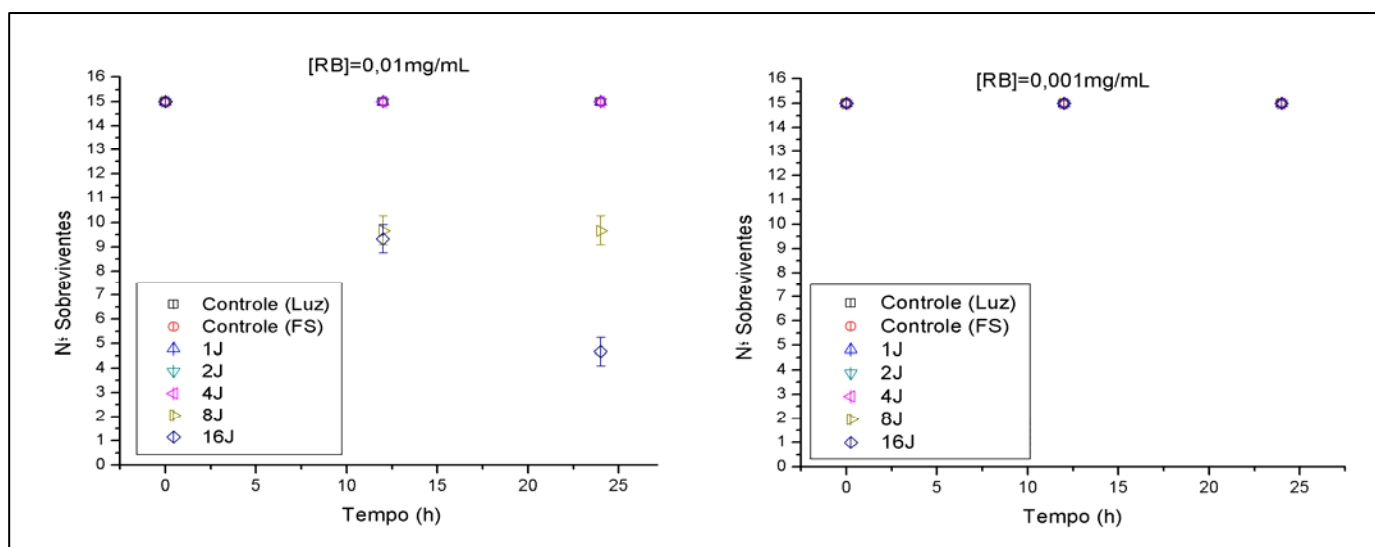


Figura 19. Gráfico da sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* aos testes da ação fotodinâmica do rosa bengala com concentração de 0,01mg/mL e 0,001mg/mL.

A análise dos gráficos permite concluir que a concentração de 0,01mg/mL é mais efetiva quando comparada à 0,001mg/mL, sob as mesmas condições de iluminação e energias.

5 Conclusões

Fazendo-se uma análise comparativa dos 3 fotossensibilizadores utilizados, conclui-se que, para os experimentos realizados, o rosa bengala tem melhor ação fotodinâmica e a clorofila *a* tem a pior.

Creditava-se até o final da experimentação que o mau desempenho fotodinâmico da clorofila *a*, era devido à falta de purificação indicada pelos pesquisadores consultados e devido ao fato de não ter sido utilizada uma lâmpada que reproduzisse perfeitamente o espectro solar, mesmo que o fabricante tenha informado que os espectros eram similares. Após última análise da literatura (Wohllebe et. al, 2009), crê-se que os resultados para a clorofila *a* estão de acordo com pesquisas já realizadas com outras espécies de mosquitos também com fotossensibilizadores derivados da clorofila. Já os resultados obtidos com azul de metileno mostram uma maior mortalidade de larvas quando comparado com os experimentos realizados por outro autor, com o mosquito *Culex quinquefasciatus* (Wohllebe et. al, 2009). Esta diferença pode significar diferença de susceptibilidade entre as espécies de mosquito, ou diferença no sistema de iluminação utilizado.

Não foi realizada a purificação da clorofila *a* devido ao alto custo com reagentes, o que acarretaria na fuga de um dos objetivos do presente estudo, que é a investigação de fotossensibilizadores que possam ser produzidos a baixo custo e em larga escala para possível aplicação em campo.

Foi visualizado também que quando a pupa do *A. aegypti* é colocada em meio contendo o fotossensibilizador, ela não o absorve, o que está de acordo com o esperado, pois nessa fase do desenvolvimento o mosquito não absorve água do meio e não se alimenta. Deste modo, não foi vista nenhuma ação fotodinâmica com nenhum dos corantes utilizados durante a fase de pupa.

Referências

- Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X-H, Childs, C. J., Sibata, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodynam. Ther.**, n.1, p.27-42, 2004.
- Alvarez, M. G., Vittar, N. B. R., Principe, F., et al. Pharmacokinetic and phototherapeutic studies of monocationic methoxyphenylporphyrin derivative. **Photodiagn Photodyn Ther.**, vol.1, n.4, p.335-344, 2004.
- Billingsley, P. F., Foy, B., Rasgon, J. L. Mosquitocidal vaccines: a neglected addition to malaria and dengue control strategies. **Trends Parasitol.**, 24, p. 396-400, 2008.
- Brandis, A., Mazor, O., Neumark, E., Rosenbach-Belkin, V., Salomon, Y., Schertz, A. Novel water-soluble bacteriochlorophyll derivatives for vascular-targeted photodynamic therapy: synthesis, solubility, phototoxicity and the effect of serum proteins. **Photochem. Photobiol.**, n.81, p.983-993, 2005.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagn Photodyn Ther.**, n.1, p.279-293, 2004.
- Chapagain, B. P., Vinod, S., Wiesman, Z. Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. **Bioresour Technol.**, n.99, p.1165-1168, 2008.
- Costa, J. G. M., Rodrigues, F. F. G., Angélico, E. C., Silva, M. R., Mota, M. L., Santos, N. K., A., Cardoso, A. L. H., Lemos, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.
- Detty, M.R., Gibson, S.L., Wagner, S. J. Current clinical and pre-clinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **J. Med. Chem.**, n.47, p.3897-3915, 2004.
- FERRE, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Entomol.**, v.47, p.501-533, 2002.
- GROETES, F.R.; TABACHNICK, B.E. Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. **J. Econ. Entomol.**, v.93, n.6, p.1580-1587, 2000.
- Gu, H. J., Cheng, S. S., Huang, C. G., Chen, W. J. Mosquito larvicidal activities of extractives from black heartwood-type *Cryptomeria japonica*. **Parasitol Res.**, jul. 3, 2009.

- Hamblin, M. R., Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol. Sci.**, n.3, p.436-450, 2004.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Ann. Rev. Entomol.**, v.45, n. p.371-391, 2000.
- Huang, Z. Photodynamic Therapy in China: Over 25 years of unique clinical experience. Part two – Clinical Experience. **Photodiagn Photodyn Ther.**, n.3, p.71-84, 2006.
- Josefsen, L. B., Boyle, R. W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. **Met Based Drugs**, vol.2008. p.276109, 2008.
- Juzeniene, A., Nielsen, K. P., Moan, J. Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, n.25, p.7-28, 2006.
- Koodalingam, A., Mullainadhan, P., Arumugam, M. Antimosquito Activity of aqueous kernel extract of soapnut *Sapindus emarginatus*: impact on various developmental stages of three vector mosquito species and nontarget aquatic insects. **Parasitol Res.**, jul. 15, 2009.
- Kreitner, M., Wagner, K. H., Alth, G., Ebermann, R., Foissy, H., Elmadfa, I. Finding optimal photosensitizers for the decontamination of foods by the photodynamic effect. **Forum Nutr.**, n.56, p.367-369, 2003.
- Li, W.T, Tsao, H. W., Chen, Y. Y., Cheng, S. W, Hsu, Y. C. A study on the photodynamic properties of chlorophyll derivatives using human hepatocellular carcinoma cells. **Photochem. Photobiol. Sci.**, n.6, p.1341-1348, 2007.
- Lucia, A., Licastro, S., Mahug, H. Yield, chemical composition and bioactivity of essential oils from twelve species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* (L.) larvae (Diptera: Culicidae). **Ent Exp Appl.**, n. 129, p. 107-114.
- Maisch, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med. Sci.**, n.22, p.83-91, 2007.
- Maisch, T. A New strategy to Destroy antibiotic Resistant Microorganisms: Antimicrobial Photodynamic Treatment. **Mini-Review in Medical Chemistry**, n. 9, p. 974-983, 2009.
- Nyman, E. S., Hynninen, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B.**, vol.73, n.1-2, p.1-28, 2004.

- Pandey, R. K., Goswami, L. N., Chen, Y., Gryshuk, A., Missert, J. R., Oseroff, A., Dougherty, T. Nature: A Rich Source for Developing Multifunctional Agents. Tumor-Imaging and Photodynamic Therapy. **Lasers Surg Med.**, n.38, p.445-467, 2006.
- Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med Sci.**, n. 24, p. 259-268, 2009.
- Ritchie, R. J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. **Photosynthetica** 46 (1):11-126, 2008.
- Robertson, C. A., Evans, D. H., Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J Photochem Photobiol B.**, n. 96, p. 1-8, 2009.
- Rose, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerg. Infect. Diseases.**, v.7, n.1, p.17-23, 2001.
- Soares, R. R. S. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. 2006.
- Tegos, G. P., Demidova, T. N., Arcila-Lopez, D., Lee, H., Wharton, T., Gali, H., Hamblin, M. R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. **Chem. Biol.**, n.12, p.1127-1135, 2005.
- Thomas, N., Bechet, D., Becuwe, P., Tirand, L., Vanderesse, R., Frochot, C., Guillemin, F., Barberi-Heyob, M. Peptide-conjugated chlorine-type photosensitizer binds neuropilin-1 *in vitro* and *in vivo*. **J Photochem Photobiol B.**, n. 96, p. 101-108, 2009.
- von Tappeiner, H. Über die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab **Muench Med Wochenschr**, n.47, p.5-15.
- William, S. J. Mosquito, man's enemy. In: Defeating the public enemy, the mosquito: a real challenge. Loyola, p. 1-32, 2007.
- Wilson, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem. Photobiol. Sci.**, n.3, p.412-418, 2004.
- Wilson, B. C., Patterson, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys. Med. Biol.**, n.53, p. 61-109, 2008.

- Wohllebe, S., Richter, R., Richter, P., Hader, D.-P. Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbid as photodynamic substances. **Parasitol Res.**, n. 104, p.593-600, 2009.
- Zhu, T. C. & Finlay, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Med. Phys.**, v. 35, n. 7, p.3127-3136, 2008.