

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Avaliação do Efeito Fotodinâmico na Viabilidade de
Promastigotas de Leishmania Major, utilizando Sal de
Curcumina como agente Fotossensibilizador

Grazielle de Araujo Lourenço Rodrigues

Botucatu, maio de 2013

Grazielle de Araujo Lourenço Rodrigues

Avaliação do Efeito Fotodinâmico na Viabilidade de
Promastigotas de *Leishmania Major*, utilizando Sal de
Curcumina como agente Fotossensibilizador

Trabalho de conclusão de curso
apresentado 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

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Rodrigues, Grazielle de Araujo Lourenço.

Avaliação do efeito fotodinâmico na viabilidade de promastigotas de *Leishmania Major*, utilizando sal de Curcumina como agente fotossensibilizador / Grazielle de Araujo Lourenço Rodrigues. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla
Capes: 10502025

1. Fototerapia. 2. Luz – Efeito fisiológico. 3. Leishmaniose – Tratamento.
4. Curcumina – Uso terapêutico.

Palavras-chave: Leishmaniose; Sal de Curcumina; Terapia fotodinâmica.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais Antônio Cesar e Elenice pela dedicação em me educar e pelo amor incondicional.

Aos meus queridos irmãos Cesar e Thiago por me proporcionarem finais de semanas agitados e maravilhosos.

Ao meu namorado João Paulo pelo ombro amigo, conselhos e incentivo.

Ao Vovô Luizinho pelo carinho.

À Lina, Sandra e Layla pela generosidade e por compartilharem de seus conhecimentos e experiências.

A todos os professores.

Ao meu orientador Paulo Ribolla pela oportunidade, paciência e dedicação.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

1. RESUMO	7
2. INTRODUÇÃO	8
3. REVISÃO TEÓRICA.....	11
3.1. Agente Fotossensibilizador	11
3.2. A interação da luz com o tecido.....	12
3.3. Tópicos de espectrofotometria.....	13
3.4. Mecanismo de citotoxicidade mediada pela TFD.....	14
4. MATERIAIS.....	16
5. PROCEDIMENTOS.....	16
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	18
7. CONCLUSÃO	23
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curvas de potencial no estado vibracional.....	14
Figura 2: Apoptose, necrose e autofagia.....	15
Figura 3: Gráfico representativo da resposta ao tratamento utilizando Curcumina na concentração de 0,75 mg/mL.....	19
Figura 4: Gráfico representativo da resposta ao tratamento utilizando Curcumina na concentração de 1,0 mg/mL.....	20
Figura 5: Gráfico representativo da resposta ao tratamento utilizando Curcumina na concentração de 1,25 mg/mL.....	20
Figura 6: Gráfico representativo do grupo controle	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média, variância e desvio-padrão amostrais.....	22
Tabela 2: Teste de Análise de Variância	22

1. RESUMO

A Terapia Fotodinâmica é uma modalidade médica baseada na interação entre luz e fotossensibilizador, na presença do oxigênio, visando causar morte celular. Quando iluminado com comprimento de onda adequado, interage com o oxigênio celular resultando em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células, acometendo sua morte. O controle da biodistribuição do agente fototerapêutico assegura a seletividade da terapia, visto que o processo dinâmico só ocorre na área irradiada.

O tratamento de patologias dermatológicas pela Terapia Fotodinâmica está em desenvolvimento desde o final dos anos 70, porém pouco explorado, possivelmente devido a descobertas de drogas antimicrobianas. Após pouco tempo de uso dessas drogas como agentes terapêuticos, observou-se a resistência de alguns microorganismos, fato que dificulta o tratamento, tornando-se necessário o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos, como por exemplo, a retomada de estudos sobre a terapia fotodinâmica antimicrobiana.

A Leishmaniose cutânea é uma dentre as variantes da doença tegumentar freqüente nas regiões brasileiras, principalmente no norte e nordeste do país. Uma infecção causada pelo protozoário *Leishmania Major* afeta pele e mucosa com o desenvolvimento de úlceras. Seu tratamento consiste basicamente de poucos fármacos como os antimoniais e a pentamidina, que além de apresentarem efeitos colaterais importantes, muitas vezes são ineficazes devido à aquisição de resistência pelo parasito.

Este estudo teve por objetivo avaliar a ação do efeito fotodinâmico na viabilidade de promastigotas de *Leishmania Major*, utilizando Sal de Curcumina como agente fotossensibilizador.

Palavras – chave: Terapia Fotodinâmica; Leishmaniose; Sal de Curcumina.

2. INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um procedimento conhecido no campo da medicina clínica para o tratamento de inúmeras doenças (SCHASTAK et al., 2005), em que sua primeira experimentação relatada tem registro em 1900 quando RAAB verificou o efeito letal da acridina em *Paramecium caudatum* na presença de luz solar e ar. Mais tarde Von Tappeiner, instituiu o termo fotodinâmica após experimento com reação entre a luz e oxigênio (VON TAPPEINER, 1904). Entretanto, as pesquisas em torno dessa modalidade médica ganharam grande força nas últimas décadas.

Como exemplos de moléstias onde a Terapia fotodinâmica obteve êxito no tratamento podem ser citadas a onicomicose (WOLF et al., 1994), situações auto-imunes (LEVY et al., 1995), verrugas (ABRAMSON et al., 1992), degeneração da mácula devido a idade (DMRI), infestação bacteriana, micoses, artrite, reumatóide sistêmica, entre outras (ALEXANDRATOU; YOVA; LOUKAS; 2005; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Uma vertente deste processo surge com o objetivo de combater microorganismos. Trata-se da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (VAN DER MEULEN et al., 1997). A técnica baseia-se na maior afinidade do fotossensibilizante pelos microorganismos.

Após a absorção da luz, o fotossensibilizante na presença de oxigênio desencadeia vários processos fotofísicos, envolvendo espécies reativas oxidativas, estimulando a indução e produção de espécies reativas de oxigênio que atacam sítios específicos dos sistemas celulares (TOMÉ, 2002).

O agente fotossensibilizante, ao ser irradiado com comprimento de onda adequado é excitado para um estado singlete. As moléculas deste estado podem decair retornando ao estado fundamental com emissão de luz fluorescente ou calor, ou ainda transferir energia para o oxigênio através de cruzamento inter-sistemas. Neste estado ocorrem emissão de elétrons que reagem com o oxigênio formando reativo (oxidativo), onde a espécie de oxigênio pode ser gerado a partir de dois processos distintos :

- Processo I: gera radicais livres reativos, peróxidos e superóxidos, via transferência de elétrons ou hidrogênio com água ou uma biomolécula.

- Processo II: o fotossensibilizante no estado tripleto interage com o oxigênio via processo de transferência de energia gerando oxigênio singleto.

O processo de reação química descrito acima ocorre devido ao pico de absorção da luz pelo fotossensibilizante em uma determinada janela da luz visível em seu comprimento de onda adequado. Como por exemplo a curcumina, que apresenta um pico de absorção na região espectral de 430 nm, relativamente baixa e características adequadas à Terapia Fotodinâmica como toxicidade mínima no escuro sendo somente citotóxico na presença de luz. Seu produto de degradação não apresenta fotossensibilidade e é rapidamente excretado pelo corpo promovendo a menor toxicidade sistêmica possível, possuindo uma alta eficiência quântica para o evento fotoquímico (FICKWEILER, S. et al., 1999; ACKROYD et al., 2001; DETTY; GIBSON; WAGNER, 2004; KARMAKOVA et al., 2006), e um alto coeficiente de absorção, onde o comprimento de onda da luz permanece energético o suficiente para produzir oxigênio singleto (OCHSNER, 1997), podendo reagir eficientemente tanto com moléculas vizinhas como com o oxigênio.

Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica surge como uma boa alternativa para a inibição de micro-organismos resistentes às drogas convencionais. Uma das grandes vantagens dessa técnica é que não há relatos de mutações (GOLDSTEN et al., 1985), o que implica na segurança de aplicação dessa modalidade terapêutica, permitindo que esta seja repetida inúmeras vezes sem causar danos aos tecidos saudáveis (JORI et al., 2006). Outro fator extremamente importante é o baixo custo e a pouca invasão da técnica, possibilitando assim sua realização até mesmo em ambulatórios, sem a necessidade de internação.

A leishmaniose é uma doença infectoparasitária que acomete o homem, causada por várias espécies de *Leishmania* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; AMIM; MANISALI, 2000). É uma infecção intracelular causada mais frequentemente pela *L. Major*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. amazonensis* ou mais raramente pelo *L. panamensis* e *L. guianensis*. A transmissão é realizada por um vetor classificado como flebótomo, de gênero *Lutzomyia* (COSTA et al., 2003). Ocorre de forma predominante na África, Ásia, América do Sul, Oriente Médio e região mediterrânea (AMIM; MANISALI, 2000; ANTONOVICH et al., 2004).

Em 2000, 88% dos casos de leishmaniose registrados no Brasil estavam no Nordeste . Em 2008, porém, a região passou a ter 48% do total do país, enquanto no mesmo período os números evoluíram de 17% para 48% nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste. Já quanto ao tipo tegumentar, entre 2000 e 2008 foram notificados 238.749 casos no país. A incidência atual chega a 26.528 novos registros por ano, de acordo com o Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O ciclo da infecção envolve dois estágios: a fase amastigota ocorre na forma de parasitas presentes em hospedeiros, como humanos, cães e roedores. Os parasitas invadem macrófagos e outras células reticuloendoteliais e multiplicam-se na corrente sanguínea. Quando o inseto fêmea (flebótomo) se alimenta do sangue de animais infectados, os parasitas em seu organismo se desenvolvem e passam à fase pró-mastigota. O ciclo é completado quando o inseto inocula outro hospedeiro, desenvolvendo a doença. (AMIM MANISALI, 2000).

Existem três entidades clínicas causadas pela leishmaniose tegumentar: a variante cutânea, cutânea difusa e muco-cutânea (AMIM MANISALI, 2000; ANTONOVICH et al., 2004). A leishmaniose cutânea é definida por lesões exclusivamente na pele, no ponto de inoculação de parasitas pró-mastigotas (GONTIJO, CAVALH, 2003). As lesões se manifestam como pápula eritematosa que progride a nódulo. Pode haver a presença de adenopatia com ou sem associação a linfagite. Podem ocorrer possíveis formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante ou ectimatóide (GONTIJO, CARVALHO, 2003).

Também pode-se desenvolver crostas (AMIM; MANISALI, 2000). A ocorrência de linfadenopatia regional geralmente precede o surgimento das ulcerações entre 1 e 12 semanas. Na maioria dos casos a infecção progride e, após um período de latência clínica de vários meses, surgem lesões cutânea e/ou mucosas consequente, à disseminação hematogênica e/ou linfática (GONTIJO, CARVALHO, 2003).

A leishmaniose muco-cutânea é uma variação clínica, mais prevalente na América do Sul, caracterizada por nódulos sintomáticos mais frequentes em membros inferiores, com posterior ulceração. Ocorre frequentemente linfagite. Estima-se que 40% dos pacientes desenvolvam lesões secundárias no complexo naso-faríngeo com evidente obstrução nasal, perfuração de septo e destruição da cartilagem nasal (AMIM;

MANISALI, 2000; COSTA et al., 2003; VERONESI, FOCACCIA, 1997), sendo que seu período de incubação de duas semanas a vários meses (GONTIJO, CARVALHO, 2003).

De forma sucinta, o diagnóstico é clínico e coadjuvado com outros exames, como o teste de intradesmorreação de Montenegro e a biópsia da lesão em que se procede ao esfregaço direto, sendo possível fazer cultura em hamster ou exame histopatológico propriamente dito, com a visualização do protozoário intracelular (AMIM; MANISALI, 2000; VERA et al., 2001; SAMPAIO et al., 2002; PRATA et al., 2003).

Tendo em vista que a Leishmaniose é uma doença emergente e pouco estudada e seu tratamento atual consiste basicamente de poucos fármacos como os antimoniais e a pentamidina, que além de apresentarem efeitos colaterais importantes, muitas vezes são ineficazes devido à aquisição de resistência pelo parasito, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem a descoberta de novos tratamentos. A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana pode vir a se constituir uma atrativa alternativa de tratamento local dessa infecção, caso seja demonstrada sua eficácia no controle in vitro de promastigotas de *Leishmania Major*.

3. REVISÃO TEÓRICA

3.1. Agente Fotosensibilizador

A curcumina é um dos ativos biológicos ativos presente no açafrão de intensa cor amarela. Como fotossensibilizante apresenta um pico de absorção na região espectral de 430 nm. Seu produto de degradação não apresenta fotossensibilidade e é rapidamente excretado pelo organismo e possui um alto coeficiente de absorção, onde o comprimento de onda da luz permanece energético em tempo suficiente para produzir oxigênio singleto (OCHSNER, 1997), podendo reagir eficientemente tanto com moléculas vizinhas como com o oxigênio.

3.2. A interação da luz com o tecido

A absorção da radiação pelo tecido equivale à energia transportada pelo fóton. Este processo é descrito pelo modelo matemático ETR (*equação de transporte da radiação*, Wilson e Patterson 2008), onde a quantidade fundamental da ETR é a radiância de energia, $L(r, \Omega)$, definida como a potência radiante transportada em r na direção de Ω por unidade de ângulo sólido por unidade de área perpendicular para essa direção. A unidade SI é $W m^{-2} sr^{-1}$. A ativação do fotossensibilizador pode ocorrer por fóton eminentes de qualquer direção, de modo que a radiância para o ângulo sólido (4π) controla a taxa de ativação fotoquímica, tal quantidade é chamada de taxa da fluência de energia, $E_0(r)$ e sua unidade é dada por Wm^{-2} . Embora as unidades de taxa da fluência de energia tenha a mesma unidade da irradiância, no entanto essa última refere-se a superfície particular, a vista que a taxa de fluência de energia pode ser definida e medido no espaço livre ou fora do tecido. O coeficiente de absorção linear é dado por μ_a , e o coeficiente de espalhamento por $\mu_s (\Omega' \rightarrow \Omega)$, onde Ω' e Ω são a propagação das direções antes e depois do espalhamento. Todos os coeficientes de interação põem ser função de posição, de modo que ETR depende do tempo final (**Equação 1**) e c é a velocidade a luz no tecido.

$$-\frac{\partial}{\partial t}L(r, \Omega, t) + c \cdot \nabla L(r, \Omega, t) + [\mu_a(r) + \mu_s(r)]L(r, \Omega, t) = \int_{4\pi} L(r, \Omega', t) \mu_s(r, \Omega' \rightarrow \Omega) d\Omega' + S(r, \Omega, t) \quad \text{(Equação 1)}$$

Para simplificação dos cálculos é assumido a condição monocromática da luz, em condições de amplo espectro é ignorado o espalhamento inelástico e a fluorescência e o termo $S(r, \Omega, t)$ representa a origem que pode ser tanto fontes de luz externa

como implantados de fibras óptica, quanto distribuição de dispersão de primeiros eventos de um fonte externa, como feixe de laser e de LED (Wilson e Petterson, 2008).

3.3. Tópicos de espectrofotometria

A regra de seleção para as transições vibrônica (entre níveis de diferentes curvas de energia) equivale ao princípio de Franck-Condon, e a probabilidade entre essa transição induzido por um campo elétrico pulsado é dado pela quadrado da integral espacial e de spin do produto das partes vibracionais das funções de onda dos estados vibrônicos terminais, o que se aproximam das funções de onda do oscilador harmônico. No entanto, algumas particularidades devem ser consideradas segundo Adalberto B. M. S. Bassi, 2001:

- *As separações nucleares mais prováveis ocorrem próximo à compressão e à distensão máxima da ligação, exceto para nível vibrônico fundamental (áreas sombreadas laterais são maiores que as centrais, (Figura 1).*
- *A velocidade eletrônica é maior em mil vezes a nuclear, consequência da aproximação de Born-Oppenheimer, ou seja, “momento ao longo do movimento roto-vibracional, a distribuição eletrônica espacial instantaneamente se ajusta às correspondentes posições nucleares, de modo a manter sempre mínima a energia molecular”.*

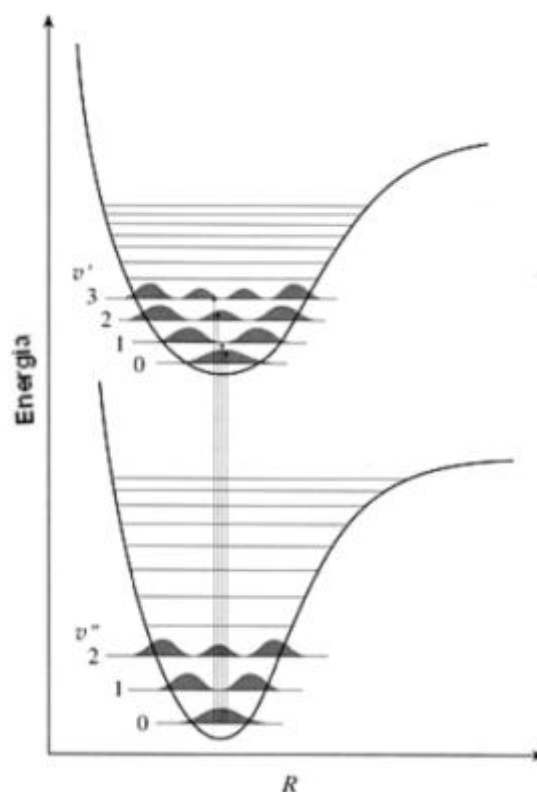


Figura 1: Duas curvas de potencial mostrando os estados vibracionais a cada estado eletrônico. As áreas sombreadas correspondem às densidades de probabilidade. As linhas verticais representam as transições vibrônicas.

3.4. Mecanismos de citotoxicidade mediada pela TFD

A morte celular (Figura 1) causada pela TFD pode ocorrer de três modos: apoptose (mais comum), necrose e autofagia. Após a ação fotodinâmica, a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria é controlada pela Bcl-2 e também pelo p-53, por isso a fotodegradação da membrana ligada ao Bcl-2, devido à ativação do FS associado à mitocôndria pode ser um sinal de permissão para a permeabilidade da membrana mitocondrial externa e liberação dos ativadores tais, como citocromo c e Smac / DIABLO ou outras moléculas *pró-apoptóticas*, incluindo o fator AIF.

A ruptura da membrana lisossomial e a liberação de lisossomos (catepsinas) induzem à clivagem e à permeabilização da membrana externa.

Normalmente, a inibição ou deficiência genética de caspases somente atrasa a fototoxicidade ou induz à morte celular por necrose. No entanto, estudos recentes apontam que certas formas de necrose podem ser propagadas através de vias de transdução de sinal.

Os danos causados pela luz podem também induzir ao estresse oxidativo devido ao acúmulo de EROS no citoplasma, que por sua vez estimulam a autofagia. Esse processo ocorre no lisossomo e é responsável pela reciclagem de proteínas intracelulares e organelas, além de preservar a viabilidade celular (AGOSTINIS,P.,BERG,K.,CENGEL.K.A.,et al.,2001).

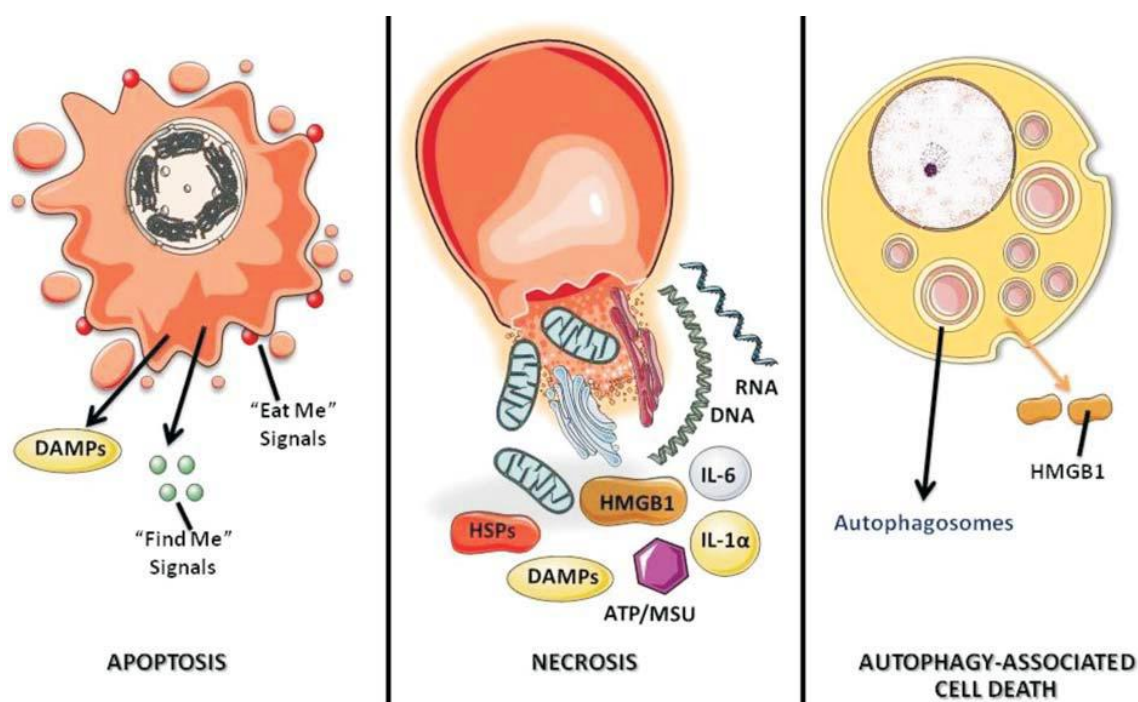


Figura 2. Apoptose, necrose e autofagia. A apoptose é morfologicamente caracterizada pela condensação da cromatina, clivagem de DNA cromossômico em fragmentos internucleossômicos. Normalmente, as células apoptóticas liberam sinais necessários para a eliminação de corpos celulares fagocitados. Por sua vez, a necrose é caracterizada morfologicamente pela vascularização do citoplasma, inchaço e ruptura da membrana do plasma, resultando em uma reação inflamatória devido à liberação do conteúdo celular e de moléculas pró-inflamatórias. Classicamente, é desencadeada devido à presença de eventos patológicos, que por sua vez são incompatíveis com a sobrevivência da célula. A bioquímica da necrose é caracterizada principalmente em termos negativos pela ausência da ativação da caspase, liberação de citocromo c e fragmentação de DNA oligonucleossomal. Autofagia é

caracterizada por uma massiva vascularização do citoplasma. A degradação autofágica citoplasmática requer a formação de uma dupla membrana de estrutura chamada autofagossomo, que sequestra os componentes citoplasmáticos, bem como organelas e transporta-os para os lisossomos. Autofagossomo é a fusão dos resultados na degradação dos componentes citoplasmáticos pelas hidrolases lisossomiais. Em organismos adultos, a função autofágica como uma via de auto-digestão promove a sobrevivência das células num meio adverso e como um mecanismo de controle de qualidade, removendo organelas danificadas, metabólitos tóxicos, ou patógenos intracelulares. DAMPs indica danos moleculares; HSPs, proteínas em choque térmico; HMGB1, de alta mobilidade do grupo de proteínas B1; IL, interleucina; ATP / MSU, a adenosina trifosfato / urato monossódico (AGOSTINIS,P.,BERG,K.,CENGEL.K.A.,et al.,2001).

4. MATERIAIS

Parasita: L. Major IOC – 581 e IOC – 2821, ambas doadas pela Fundação Oswaldo Cruz e cedidas gentilmente pela Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp de Botucatu.

Os parasitas foram cultivados em meio LIT, armazenados a temperatura entre 22°C.

Fotossensibilizante: Curcumina em concentração de $0,75 \frac{\mu L}{mL}$; $1 \frac{\mu L}{mL}$ e $1,25 \frac{\mu L}{mL}$.

Fonte luminosa: Bio Table - comprimento de onda de 430 nm em potência de $35 J/cm^2$.

Câmara Neubauer.

Phosphate Buffered Saline (PBS).

Meios de cultura: LIT (Liver infusion triptose), NNN (Novy-McNeal- Nicolle), Caldo BHI (Brain heart infusion) teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Microscópio.

5. PROCEDIMENTOS

Para a avaliação da Terapia Fotodinâmica sobre *Leishmania Major*, foram utilizadas suspensões de promastigotas em uma concentração de 10^6 /mL, da cepa IOC-2821.

A curcumina foi preparada utilizando dimetilsulfóxido 10%, em uma solução estoque de 300 mg/ mL, a partir da qual foram feitas diluições para a obtenção das concentrações finais de 0,75 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,25 mg/mL (soluções de tratamento).

Para a irradiação das amostras foi utilizado um sistema de iluminação composto por LED's azuis em um arranjo de uma mesa difusora, cujo comprimento de onda de 430 nm, a uma potência de 35 Mw/cm^2 , que em função do tempo de iluminação de 24 minutos e 20 segundos, fornece uma energia de 50 J/cm^2 pela qual as amostras foram irradiadas.

Titulada de "BioTable", a fonte luminosa foi desenvolvida no Instituto de Física da Universidade de São Paulo – campus de São Carlos e cedida gentilmente para a realização do experimento.

Para a avaliação do efeito fotodinâmico, a cepa foi cultivada em meio LIT e NNN, centrifugada em 2500 rpm e posteriormente diluída em PBS para a padronização da solução.

Da suspensão padronizada foram transferidos $900\mu\text{L}$ para cada poço, num total de 24 poços por placa (modelo de placa para o qual o equipamento de LED's foi desenvolvido), e acrescentado mais $100\mu\text{L}$ da solução de tratamento a cada poço, compondo uma solução de 1mL por poço. As placas foram encubadas no escuro por 20 minutos e posteriormente submetidas à irradiação.

A suspensão obtida foi analisada sob o critério de dois parâmetros: motilidade e quantidade, via técnica de contagem utilizando câmara Neubauer, a fim de registrar a concentração de promastigotas para a comparação das amostras antes e após serem submetidas à ação fotodinâmica.

Para o grupo controle foram transferidos $900\mu L$ para cada poço e acrescentado mais $100\mu L$ de água miliq. As 6 amostras desse grupo foram encubadas no escuro e após 20 minutos foram contadas. Transcorridos 24 minutos e 20 segundos, equivalente ao tempo de irradiação, as 6 amostras foram contadas novamente, sob as mesmas condições.

Assim foram testadas 3 condições experimentais com 6 repetições para cada uma e mais o grupo controle, também composto por 6 repetições, o qual não foi fotossensibilizado pela curcumina nem iluminado com LED.

Todos os procedimentos foram realizados nas dependências do departamento de Parasitologia.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análise Estatística - Sob a ação do fotossensibilizador

As análises estatísticas objetivaram primeiramente verificar a eficácia da ação fotodinâmica para a erradicação das promastigotas, frente às diferentes concentrações do agente fotossensibilizante com o grupo controle que não recebeu o tratamento.

Ressaltamos que as análises estatísticas minuciosas referentes à diferença de concentração de promastigotas antes e depois da irradiação são dispensadas, uma vez

que os resultados obtidos são superiores a 95% nos três tratamentos e os desvios-padrões são mínimos, confluindo flutuações insignificantes nos dados, como podemos comparar nos gráficos abaixo e posteriormente na tabela 1. No entanto, para uma afirmação concreta quanto à diferença dos tratamentos empregados, foi feito o teste de análise de variância, baseando-se nos dados das proporções antes e após os tratamentos (conforme tabela 2).

Para melhor visualização adotaremos T1 ao tratamento com Curcumina a 0,75 mg/mL, T2 ao tratamento com Curcumina a 1 mg/mL e T3 ao tratamento com Curcumina a 1,25 mg/mL.

Tratamento utilizando concentração de Curcumina a 0,75 mg/mL

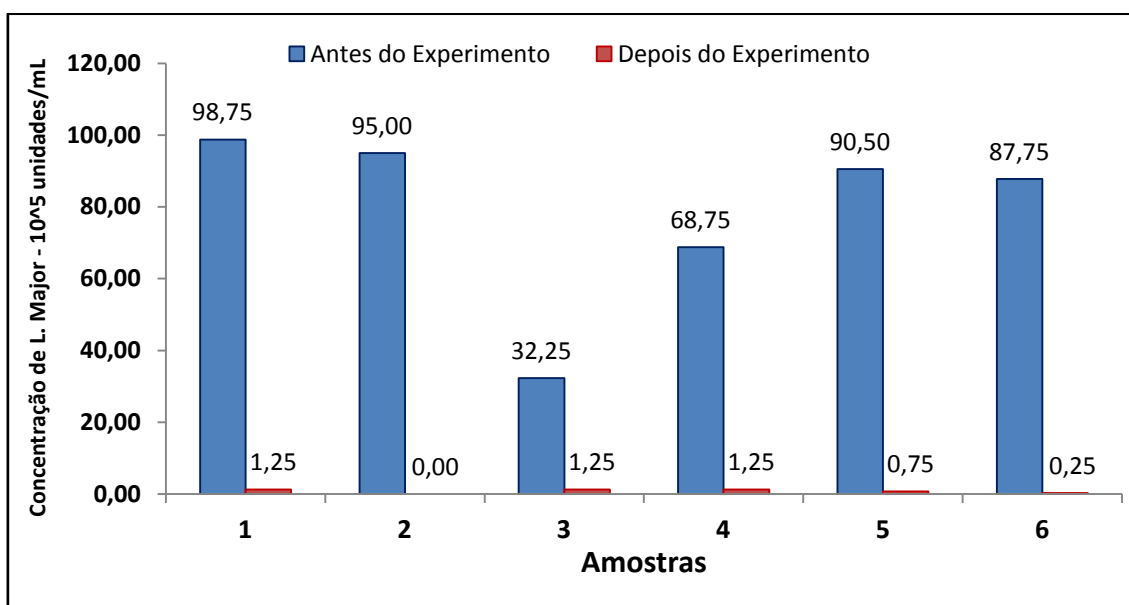


Figura 3: Gráfico representativo da resposta ao tratamento utilizando Curcumina na concentração de 0,75 mg/mL

Pela análise do gráfico, verificamos que houve uma redução de 98.73%, 100%, 96.12%, 98.18%, 99.17% e 99.72%, nas amostras de 1 a 6, respectivamente.

Tratamento utilizando concentração de Curcumina a 1,0 mg/mL

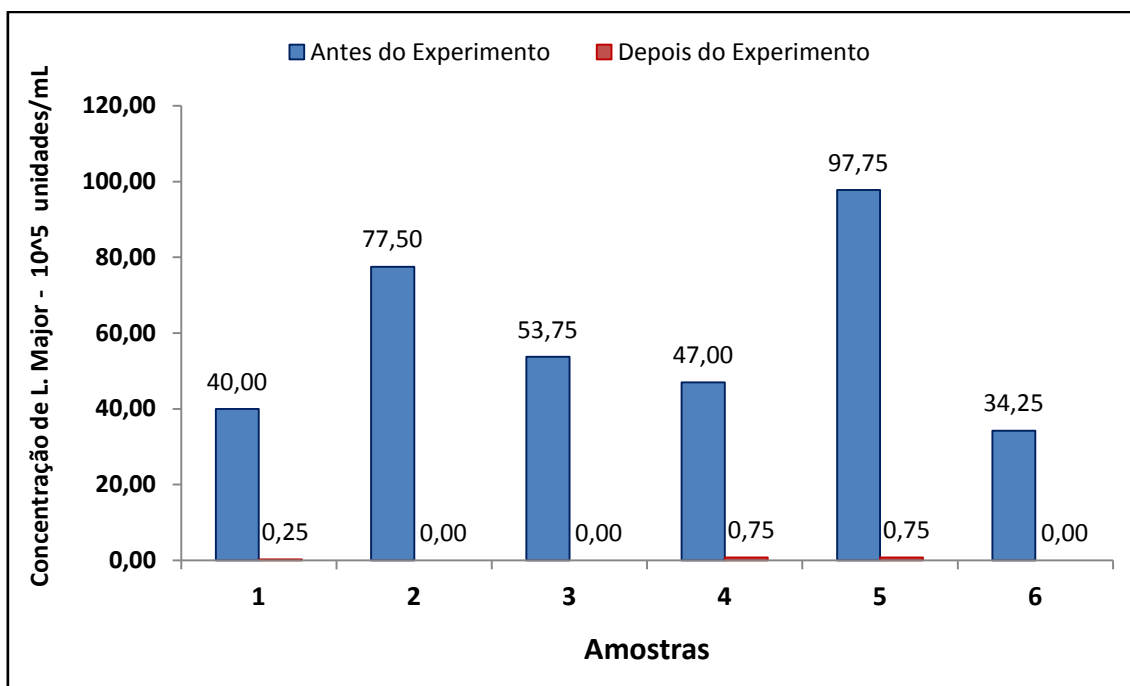


Figura 4: Gráfico representativo da resposta ao tratamento utilizando Curcumina na concentração de 1 mg/mL.

Pela análise do gráfico, verificamos que houve uma redução de 99,38%, 100%, 100%, 98,40%, 99,23% e 100%, nas amostras de 1 a 6, respectivamente.

Tratamento utilizando concentração de Curcumina a 1,25 mg/mL

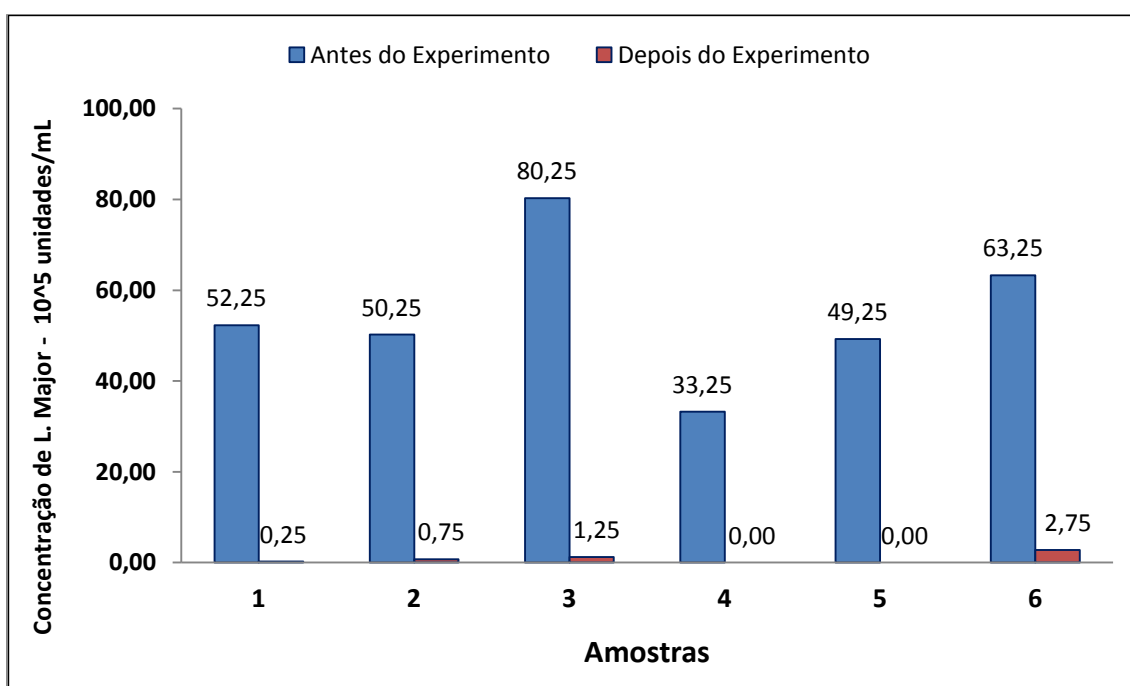


Figura 5: Gráfico representativo da resposta ao tratamento utilizando Curcumina na concentração de 1,25 mg/mL.

Pela análise do gráfico, verificamos que houve uma redução de 99.52%, 98.51%, 98.44%, 100%, 100% e 95.65%, nas amostras de 1 a 6, respectivamente.

Análise Estatística do Grupo Controle

Como o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito fotodinâmico, que compreende a associação do fotossensibilizante e luz, as amostras do grupo controle foram diluídas em água miliq e não foram iluminadas pelo LED.

Os dados obtidos foram plotados e ilustrados abaixo.

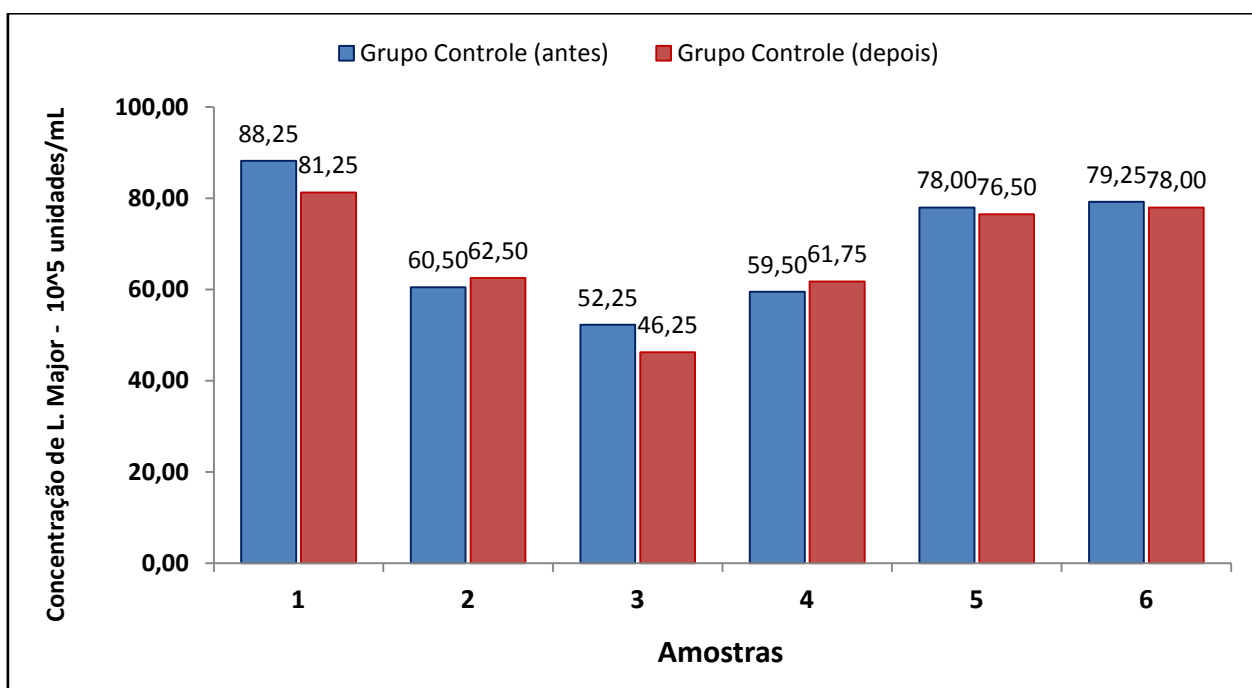


Figura 6: Gráfico representativo do grupo controle.

Pela análise do gráfico, verificamos que nas amostras 1, 3, 5 e 6 houve redução de 7.93%, 11.48%, 1.92% e 1.58%, respectivamente. Já nas amostras 2 e 4 houve aumento de 3.31% e 3.78%, respectivamente.

Tabela 1 - Média, variância e desvio-padrão amostrais

	[C] = 0,75 mg/mL	[C] = 1,0 mg/mL	[C] = 1,25 mg/mL	Grupo controle
média aritmética	98,65439947	99,50199865	98,68725588	2,638055197
variância amostral	1,96706876	0,407537436	2,68932556	36,88800352
desvio-padrão amostral	1,402522285	0,638386588	1,639916327	6,0735495

Verificamos que a mortalidade das culturas submetidas aos tratamentos T1,T2 e T3 são expressivamente maiores se comparados com o grupo controle, em uma diferença aproximada de 96%.

Tabela 2 - Teste de Análise de Variância

Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F
Entre grupos	0,000277	2	0,000138	0,8195
Dentro de grupos	0,002532	15	0,000169	
Total	0,002809	17		

Mediante os valores encontrados, constatamos que uma razão F a um nível de 5%, não excede o valor de F tabelado: 3,68.

Com o resultado do teste de análise de variância, não rejeitamos a hipótese de igualdade entre as médias dos três tratamentos empregados, ou seja, não há evidências suficientes para apontarmos um tratamento como mais eficiente que os demais.

Quanto ao grupo controle o decaimento na concentração não possui uma conclusão cardinal. A causa da morte pode ser agregada a diversos fatores ou à associação desses, como por exemplo, a diminuição da concentração do meio de cultura necessário à nutrição das promastigotas, ou o mais provável, a variação da concentração das promastigotas por amostra. Isso porque a concentração colhida de amostra ($10\mu\text{L}$) para contagem dificilmente terá a quantidade exata de promastigotas das amostras subseqüentes extraídas do mesmo poço, mas se comparada com a variação de concentração dos grupos que receberam o tratamento o último fator descrito nesse tópico é considerado desprezível estatisticamente, devido a diferença acentuada da concentração, superável ao máximo encontrado no grupo controle.

Observações após a irradiação:

- Maior concentração dos parasitas onde encontra-se a Curcumina.
- Rosetas desfeitas.

8. CONCLUSÃO

Conforme observamos nesse estudo o efeito fotodinâmico associado ao Sal de Curcumina e ao LED resultou na inviabilidade significativa do microorganismo, quando comparado ao grupo controle, comprovando seu potencial antimicrobiano. Isto nos mostra que os resultados são promissores e que também há possibilidade deste tratamento ser eficiente *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, A.L.; SHIKOWITZ, M.J.; MULLOOLY, V.M.; STEINBERG, B.M.; AMELLA, C.A.; ROTHSTEIN, H.R. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.118, p.25, 1992.

ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**. v.74, n.5, p.656-669, 2001.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K.A., et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. **CA: A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS.**, v.61, p.250-281, 2011.

ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; LOUKAS, S.A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. **Free Radical Biology e Medicine**. v.39, p.1119-1127, 2005.

AMIM; MANIASALE. Cutaneous leishmaniasis affecting the face: Report of case. **J Oral Maxillofac Surg**. v.58, p.1066-1069, 2000.

ANTONOCICH, D. et al., Cutaneous Leishmaniasis: A diagnostic challenge. **J Am Acad Dermatol**. p. 103, 2004.

BASSI, A.B.M.S. Conceitos Fundamentais em Espectroscopia. **Chemkeys**, 2001.

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.

COSTA JR. J. W., Mucocutaneous leishmaniasis in a US Citizen. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v.96, p.573-577. 2000.

FICKWEILER, S. et al. Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17, tetrakis-(beta- methoxyethyl)- porphycene) in vitro: mechanism of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: BIOLOGY**. V.48, p.27-35; 1999.

GOLDSTEN, J.L., BROWN, M.S., ANDERSON, R.G., RUSSELL, D.W., SCHNEIDER, W.J. Receptor-mediated endocytosis: Concepts Emerging from the LDL Receptor System, **Rev. Cell. Biol.**,1985.

GOMES, A.C.A. et al. Leishmaniose Muco-Cutânea: Relatado de caso clínico. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Facial**, v. 4, p. 223-228, 2004.

GONTIJO, C.M.F. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.7, p.338 - 349, 2004.

HIROYUKI, H. et al. Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Randomized, Multicenter, Double – Blind, Placebo – Controlled Trial. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v.4, p.1502-1506, 2006.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; ANTETTI, L.; KATO, H. History of photodynamic therapy – Past, present future. **Gan Kagaku Ryoho**, v. 23, n.1, p.8-15, 1996.

LEVY, J.G., Trends in Biotechnol., v.13, p.14, 1995.

MACHADO, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Nova Química**, v.23, p.237- 243, 2000.

RAAB, O.Ueber die wirkung fluoreszierenderstoffe auf infusorien. **Zeitschrift fur Biologie**.v.39, p.524-546, 1990.

SCHASTAK, S. et al. Improved pharmacokinetics, biodistribution and necrosis in vivo using a new near infra-red photosensitizer; tetrahydroporphyrin tetratosylat. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: BIOLOGY**. v.78, p.203-213, 2005.

SNOEK, D.V.E. et al. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v.22, p.918 - 922, 2008.

TOMÉ, F.M. **Síntese e análise espectrofotométrica de naftalocianinas com aplicação na Terapia Fotodinâmica**. 2002.88f. Dissertação(Mestrado Ciências Biológicas) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2002.

OCHSNER, M., J. Photochem. **Photobiol.**, 1997.

VAN DER MEULEN, F. W. et al. J. Photochem. **Photobial**, p. 204,1997.

VERA L. A., et al., Avaliação da influência da Infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra Branca, Bahia.**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**,Tropical. 34(3): 233-237. Mai-jun, 2000.

VERONESI R., FOCACCIA R. Tratado de Infectologia. **Atheneu**. v.2, São Paulo, 1997.

VON TAPPEINER H. Zur kenntis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) stoffe.**Dtsch Med Wochen.**, v.1, p.579–80, 1904.

WILSON,B.C., PETERSON, M.S.,The Physics, Biophysics and Technology OF Photodynamic Therapy. **IOP Publishing, Phys. Med. Biol.**, v.53,R61-R109, 2008.

WOLF, P., FINK-PUCHES, R., CERRONI L. ; KERL, H. Development of malignant melanoma topical photodynamic with 5- aminolevulinic acid at the exposed site. **J. Am. Acad. Derm.**, v.194, p.53-54, 1997.