



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

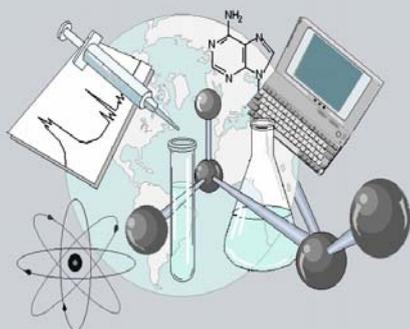
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDOS DA APLICAÇÃO DO CORANTE AZUL DE
METILENO EM TERAPIA FOTODINÂMICA”**

Dissertação apresentada por
Lílian Somenci Peloi ao Programa
de Pós-Graduação em Química do
Departamento de Química do Centro
de Ciências Exatas da Universidade
Estadual de Maringá como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Química

CEE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, OUTUBRO/2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“ Estudos da aplicação do corante azul de metileno
em terapia fotodinâmica”

LILIAN SOMENCI PELOI

Orientador: Prof. Dr. Noboru Hioka

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

MARINGÁ, OUTUBRO/2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P392e Peloi, Lillian Somenci
Estudos da aplicação do corante azul de metileno em terapia fotodinâmica. / Lillian Somenci Peloi. - Maringá, PR : [s.n.], 2007.
67 f. : il. color.

Orientador : Prof. Dr. Noboru Hioka.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Química, 2007.

1. Azul de metileno - Terapia fotodinâmica - Microrganismos. 2. Azul de metileno - Terapia fotodinâmica - Leishmaniose Tegumentar Americana. 3. Azul de metileno - Terapia fotodinâmica - Substituição do laser por LED. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Química. II. Título.

CDD 21.ed.541.35

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus**, pois sem sua vontade nada disso seria possível

Aos meus pais, **Luiz e Cirlei**, e minha irmã, **Vivian**, pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida

Ao **Matheus** por tornar minha mais feliz

Ao prof^o. **Noboru Hioka**, pela orientação e confiança

A Prof^a. **Thaís Gomes Verzignassi Silveira**, pela orientação e paciência com os experimentos de *Leishmania*

A Prof^a. **Elza Kimura**, pelo carinho, atenção e paciência, nos trabalhos desenvolvidos com os microrganismos

A Prof^a. **Maria Valdrinez Campana Lonardoní**, pela ajuda nos experimentos

A Prof^a. **Selma Lucy Franco**, pela preparação da loção de azul de metileno

A Prof^a. **Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**, por ter concedido a cepa de *C.albicans*

A Prof^a. **Regina Coeli Cunha Dórea**, pelo doação dos animais

A Prof^a. **Silvana Marques de Araújo**, pelo espaço concedido no biotério

A **Paula Honda e Myriam Emiko Takahashi** pelo grande auxílio na execução dos experimentos com *Leishmania*

Aos amigos, **Carlos Eduardo Guerino Biondo, Adriana Passarella e Amanda Santana** pelo auxílio do desenvolvimento do trabalho e a todos os colegas do laboratório

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Terapia Fotodinâmica.....	1
I.1.1. Breve histórico e princípios.....	1
I.1.2. Mecanismos fotofísicos e fotoquímicos da TFD.....	4
I.1.3. Fármaco Fotossensível - Azul de Metileno.....	7
I.1.4. Fontes de iluminação usadas em TFD.....	10
I.1.5. Dificuldades da TFD.....	11
I.2. Aplicações - Doenças.....	12
I.2.1. Leishmaniose.....	12
I.2.1.1 A TFD no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	14
I.2.2. Microrganismos patogênicos.....	16
I.2.2.1. Os microrganismos em estudo.....	18
II. OBJETIVOS.....	20
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
III.1. Materiais e soluções.....	21
III.2. Equipamentos.....	22

III.3. Metodologias.....	23
III.3.1. Sistema de iluminação.....	23
III.3.2. Reações de Foto-branqueamento.....	23
III.3.3. Teste do Ácido Úrico.....	24
III.3.4. Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	25
III.3.5. Ensaio <i>in vitro</i> em culturas de microrganismos.....	26
III.3.6. Ensaio <i>in vitro</i> com a espécie <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	27
III.3.6.1. Sobre a forma promastigota.....	27
III.3.6.2. Sobre a forma amastigota.....	28
III.3.6.3 Determinação do óxido nítrico.....	30
III.3.7. Ensaio <i>in vivo</i> em hamsters infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	30
III.3.7.1 Quantificação de <i>Leishmania</i> no baço e no linfonodo.....	32
III.3.8. Aspectos éticos.....	33
III.3.9. Análise estatística.....	33
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
IV.1. Espectro do azul de metileno.....	34
IV.2. Sistema de iluminação (LED).....	35
IV.3. Estudo de Foto-decomposição (Foto-branqueamento).....	36
IV.4. Formação de oxigênio singlete.....	39
IV.5. Ensaio fotodinâmico com <i>Artemia salina</i>	43
IV.6. Ação fotodinâmica <i>in vitro</i> sobre culturas de microrganismos.....	44
IV.7. Ensaio <i>in vitro</i> com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	50
IV.7.1. Sobre a forma promastigota.....	50
IV.7.2. Sobre formas amastigotas.....	51

IV.7.3. Óxido nítrico.....	53
IV.8. Aplicação da Terapia Fotodinâmica em hamsters infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	54
V. CONCLUSÕES.....	61
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Jablonski.....	4
Figura 2: Estrutura do Azul de Metileno.....	7
Figura 3: Superposição de um cromóforo fenotiazino em um par guanina-citosina.....	8
Figura 4: Esquema da fotoquímica do azul de metileno.....	9
Figura 5: Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-positiva (+), Gram-negativa (-) e fungo.....	17
Figura 6: Hamsters anestesiados recebendo tratamento com AM/LED.....	31
Figura 7: Espectro de absorção do azul de metileno (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) em água.....	34
Figura 8: Espectro de emissão da fonte de iluminação (LED).....	35
Figura 9: Fonte de luz constituído de 6 unidades de LED.....	36
Figura 10: Sobreposição de espectros do azul de metileno (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) em água e etanol em situações de aeração normal, obtidos em intervalos de 5 min em amostra iluminada.....	37
Figura 11: Variação da absorção do azul de metileno (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) em função do tempo de exposição ao LED.....	38
Figura 12: Potência luminosa absorvida por unidade de comprimento de onda do azul de metileno 5×10^{-6} mol.L ⁻¹ calculado para o LED utilizado.....	41
Figura 13: Variação espectral da solução de azul de metileno 1×10^{-6} mol.L ⁻¹ na presença de AU (10^{-4} mol.L ⁻¹) em etanol, com a irradiação de luz de LED.....	42
Figura 14: Morte percentual de <i>Artemia salina</i> em diferentes concentrações de azul de metileno em água.....	44
Figura 15: Curva de inibição de crescimento em culturas de microrganismos em diversas concentrações de azul de metileno com e sem luz.....	45

- Figura 16:** Decréscimo do número de colônias em função das condições aplicadas. Os grupos C1 e C2, controles, são culturas do microrganismo com e sem exposição ao LED por 30 minutos, respectivamente (sem AM). Nas amostras onde constam tempos (de iluminação) correspondem a culturas com AM (35,2 μM) submetidas à luz. As taxas de morte (k) são derivadas da curva, considerando o tempo 0 a 30 minutos de exposição e o valor-D é calculado pela redução de 1 ciclo-logarítmico da mesma curva.....48
- Figura 17:** Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em meio 199, a 26°C, tratadas ou não com azul de metileno, com ou sem luz.....50
- Figura 18:** Infectividade de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* para macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Promastigotas foram cultivados sobre monocamadas de macrófagos na proporção 10 parasitos:1 macrófago. As culturas foram tratadas ou não com AM e luz. Os resultados representam os índices fagocíticos após 24 e 48 horas. Os valores referem-se a média do experimento realizado em quadruplicata \pm erro padrão da média. A: macrófago infectado (controle); B: macrófago infectado e tratado com 0,53 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AM; C: macrófago infectado e tratado com 0,066 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AM.....51
- Figura 19:** **A** - Macrófago e *Leishmania*; **B** - Macrófago, AM (0,53 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e Luz; **C** - Macrófago, *Leishmania*, AM (0,066 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e Luz; **D** - Macrófago, *Leishmania*, AM (0,53 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e Luz.....53
- Figura 20:** Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L.(V.) braziliensis* e tratados com AM e Luz. A: Macrófago e *Leishmania*; B: Macrófago, *Leishmania* e AM 0,53 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; C: Macrófago e AM 0,066 $\mu\text{mol.L}^{-1}$54

Figura 21: Evolução da infecção avaliada pela espessura da lesão (média ± desvio padrão) medida pela diferença entre a pata infectada e a pata contralateral não infectada. Os animais foram inoculados na pata com 5×10^6 formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e acompanhados semanalmente. O grupo controle (n=8), o grupo A (n=14) e o grupo B (n=15).....	55
Figura 22: Evolução da infecção avaliada pela espessura da lesão (média ± desvio padrão). Os animais foram inoculados na pata com 5×10^6 formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e após o desenvolvimento da lesão, foram tratados e acompanhados semanalmente. O grupo controle (n=8) não recebeu tratamento, o grupo A (n=14) foi tratado com AM em loção e o grupo B (n=15) foi tratado com AM em água.....	56
Figura 23: Lesão na pata de hamster inoculada com 5×10^6 promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> . Animal tratado com AM 0,5% em água. A - antes do tratamento; B - 6 semanas com TFD; C - 12 semanas de tratamento; 1 tratado com AM em água e 2 tratado com AM em loção.....	58
Figura 24: Efeito do tratamento com a TFD sobre o número de parasitos nos linfonodos poplíteos.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio molecular no estado singlete excitado ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$)..6	
Tabela 2: Valores de AFQ para o azul de metileno, determinados pelo teste do ácido úrico.....42	42
Tabela 3: Porcentagem de inibição do crescimento de microrganismos.....47	47
Tabela 4: Inibição da infectividade (%) das promastigotas de <i>L(V) braziliensis</i> para macrófagos peritoneais de camundongos.....52	52
Tabela 5: Características das lesões dos animais infectados experimentalmente com <i>L. (L.) amazonensis</i> , tratados ou não com AM e luz.....57	57

LISTA DE ABREVIATURAS

TFD	Terapia Fotodinâmica
PBS	Tampão Fosfato Salino
LED	Diodo Emissor de Luz
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
CMH	Caldo Muller Hinton
UFC	Unidade Formadora de Colônia
AM	Azul de metileno
NO	Óxido Nítrico
IF	Índice Fagocítico
AF	Atividade Fotodinâmica
AU	Ácido úrico

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade médica que utiliza a combinação de luz visível, composto fotossensível e oxigênio. A maior aplicação da TFD é no tratamento de câncer, entretanto, a técnica está sendo difundida no tratamento de outras doenças incluindo-se infestações microbianas.

Apesar da larga aplicabilidade da TFD, dois fatores dificultam a disseminação do tratamento: o alto custo dos medicamentos e da fonte de luz. A opção de corantes como agentes fotodinâmicos é interessante devido ao custo reduzido e aplicabilidade, sendo um exemplo o azul de metileno (AM). Este corante absorve na região de luz vermelha e produz oxigênio singlete. Além disso, já é bastante utilizado na área médica, por exemplo, para o tratamento de metahemoglobinemia, e tem sido considerado um fármaco para TFD. No caso dos equipamentos, a substituição do LASER por dispositivos de LED deve ser investigada.

Assim estudou-se algumas propriedades do AM como fotossensibilizador bem como o uso de LED como uma alternativa para TFD. Investigou-se a ação fotodinâmica em culturas de microrganismos e *Artemia salina* e no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.

O azul de metileno tem um máximo de absorção na região de 660 nm (na janela fototerapêutica para TFD); sofre pouca reação de fotobranqueamento e exibiu um bom valor de atividade fotodinâmica. Este último parâmetro foi calculado levando-se em consideração o fato do LED ser uma fonte de luz policromática, levando nos a modificar a equação tradicionalmente empregada para sistemas LASER nos cálculos de atividade fotodinâmica. O sistema de LED desenvolvido foi altamente conveniente para as aplicações propostas com o corante AM.

O efeito fotodinâmico foi testado sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Artemia salina*. As cepas estudadas sofreram efeito inibitório no crescimento e mortandade na presença de azul de metileno (no escuro), sendo este intensificado com aplicação da luz LED. A resposta AM/LED foi similar para todos os microrganismos. Igualmente com *Artemia salina* o percentual de morte foi superior nas amostras irradiadas.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das doenças parasitárias de maior incidência no mundo, cujo tratamento convencional emprega medicamentos caros e com sérios efeitos colaterais. A investigação para LTA através de LED em associação com AM, foi realizada *in vitro*, em ensaios sobre as formas promastigotas e amastigotas com *Leishmania (Viannia) braziliensis* e, *in vivo* com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em hamsters infectados. Os resultados dos experimentos *in vitro* mostram que o tratamento com AM e luz inibiu o crescimento de formas promastigotas em cultura e reduziu a capacidade de infecção das promastigotas em macrófagos. Os resultados *in vivo* mostram que o sistema AM/LED reduziu a lesão das patas infectadas e a carga parasitária nos hamsters.

Assim os bons resultados do tratamento aplicado contra microrganismos e leishmaniose, *in vitro* e *in vivo* com AM/LED, confirma que a TFD é altamente promissora podendo vir a ser uma alternativa no tratamento clínico de pacientes.

ABSTRACT

The Photodynamic Therapy (PDT) is a medical modality that utilizes a combination of a photosensitizer compound, visible light and oxygen. Its largest application is in the treatment of cancer, however, this technical is being diffused far handling other illnesses including microbial infections. Despite of the wide applicability of the TFD, two factors difficult its dissemination: the high cost of the medicines and the light source. The option of dyes as the photodynamic agents is interesting due to the lower cost and possibilities, of application being an example the Methylene Blue (MB). This dye absorbs in the red region of the visible absorption spectra and produces high level of singlet oxygen. Beyond that, it is already utilized in the medical area, for example, to treat methemoglobinemia, and has been considered a medication for PDT. In the case of equipment, the replacement of the LASER by LED units as light source should be investigated.

In that way the MB was investigated in association with LED light as an alternative for PDT. It was investigated the photoactivity of MB in cultures of microorganisms and *Artemia salina* and in the handling of the American Tegumentar Leishmaniosis. The Methylene Blue has a maximum absorption in 663 nm (inside the phototherapeutic windows for PDT); suffers almost no photobleaching reaction and exhibits a good value of photodynamic activity (PA). This last parameter was calculated considering the fact of the LED be a non-monochromatic light source, leading us to modify the equation traditionally employed for LASER systems in the calculations of PA. The apparatus of LED system developed was highly convenient for the proposed application with the MB dye.

The photoactivity of MB/LED was investigated using the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and the fungus *Candida albicans*. A

tiny microcrustaceous *Artemia salina* was also tested. All the microorganisms studied mesented inhibitory growth activity and killing effect in presence of MB (in the dark), being this action intensified with the LED light irradiation. The intensity of effect using MB/LED was similar for all of the microorganisms. Equally with *Artemia salina* the percentage of death was higher in the irradiated samples.

To American Tegumentar Leishmaniosis (LTA) is one of the parasitic disease of largest incidence in the world and in the conventional treatment employ some costly medicines which show severe colateral effects. The investigation for LTA through LED in association with MB, was carried out *in vitro*, in attempt promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and, *in vivo* with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infected in hamsters. The results *in vitro* show that the combination of MB and light inhibited the growth of forms promastigotes in culture and reduced the capacity of infection of the promastigotes in macrophages. The results *in vivo* show that the system MB/LED reduced the lesion of the infected paw and the parasitic load in the hamsters.

The good results showed in the treatment applied against microorganisms and leishmaniosis, *in vitro* and *in vivo* with the MB/LED, pointed out that this therapy is very interesting and can be a future alternative in the clinical handling of patients.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Terapia Fotodinâmica

I.1.1. Breve histórico e princípios

O uso de luz e compostos fotossensíveis em humanos é antigo, pois há mais de 4000 anos atrás os egípcios tratavam vitiligo através da ingestão de plantas (psoralenos) e exposição à luz do sol. Entretanto, a técnica de Terapia Fotodinâmica (TFD) começou a ser empregada com sistemática científica somente bem recentemente.

Em 1900, Oscar Raab descreveu a ação do corante acridina sobre o microrganismo *Paramecio*, demonstrando que no escuro não havia efeito enquanto que na presença de luz solar observava-se a morte deste protozoário. Trappeiner, em 1903, empregou uma solução de eosina e exposição à luz para o tratamento de câncer de pele. Em 1913 Meyer-Bertz injetou em si mesmo 200mg de hematoporfirina (Hp) e não sentiu nenhum efeito, porém ao se expor à luz teve fotossensibilidade na pele por vários meses. Policard, em 1925, estudou porfirinas objetivando a produção de efeitos fototóxicos em tecidos, principalmente em tumores malignos (Sternberg e col., 1998).

A história da chamada primeira geração de fármacos para TFD, a base de derivados hematoporfirínicos, começa com Schwartz no início da década de 50. Ele mostrou que nos experimentos de Meyer-Bertz, o princípio ativo não era a hematoporfirina, mas uma mistura de diversas substâncias oligoméricas. Schwartz enriqueceu a mistura de oligômeros (chamou de HpD) e Lipson, sob orientação de Schwartz na década de 60, investigou o acúmulo deles em tumores implantados em camundongos e observou que a incidência de luz proporcionava

regressão da doença. No final da década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher que possuía câncer de mama usando o HpD e irradiação seletiva do tumor, marcando assim, o início da TFD como terapia clínica para câncer (Machado, 2000; Simplicio e col., 2002).

Na realidade a TFD é uma modalidade médica que utiliza a combinação de luz visível e composto fotossensível na presença de oxigênio. Sua maior aplicação é no tratamento de câncer, entretanto, a técnica está sendo difundida no tratamento de outras doenças tais como degeneração macular da retina, miopia patológica, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, arteriosclerose, AIDS, infestações bacterianas, etc (Levy, 1995; Machado, 2000; Sternberg e Dolphin, 1996; Sternberg e col., 1998). Adicionalmente o uso da TFD na área dermatológica tem-se desenvolvido bastante, particularmente no tratamento de acne e rejuvenescimento cutâneo (www.sbcd.org.br).

O tratamento através da TFD inicia-se com a administração do fotossensibilizador de forma sistêmica ou tópica. A seguir é aguardado algumas horas/minutos para que o fármaco se acumule preferencialmente no tecido doente que será posteriormente irradiado. O composto fotossensível, excitado pela luz, transfere energia e/ou elétrons para o oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que são citotóxicas. Tais espécies geram um estresse oxidativo local ocasionando a morte do tecido doente.

Para que o medicamento (fotossensibilizador) seja comercialmente viável e eficaz em sua ação terapêutica, é necessário que este atenda a um conjunto de propriedades favoráveis como: (i) características fotofísicas favoráveis; (ii) alta afinidade e seletividade ao tecido doente, baixa toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada, simplicidade na formulação, reprodutibilidade, alta estabilidade, farmacocinética favorável e facilidade de obtenção do fármaco (Simplicio e col., 2002). Dentre as propriedades fotofísicas importantes cita-se que os compostos utilizados em TFD, além de cromóforos absorventes em

regiões no vermelho, não devem sofrer reações de foto-branqueamento (foto-degradação), pois daí o cromóforo estaria sofrendo modificações químicas fazendo com que o processo de absorção de luz fosse alterado e, possivelmente, diminuindo a efetividade dos processos fotoquímicos subseqüentes. Neste caso compromete-se a geração de EROs através da diminuição de rendimentos ou fazendo com que doses elevadas do fotossensibilizador sejam necessariamente administradas para compensar esta perda. Adicionalmente os compostos normalmente devem possuir longo tempo de vida no estado triplete e levar a alto rendimento quântico de oxigênio singlete uma vez que esta é a espécie foto-ativa considerada principal para a TFD (mecanismo tipo II).

Uma outra característica importante dos compostos que estão sendo aplicados/investigados para TFD é a alta hidrofobicidade, propriedade que confere a estes maior facilidade de interação com alvos biológicos, dentre outros, com membranas celulares (Sternberg e col., 1998). Todavia essa característica confere às moléculas uma alta tendência à auto-agregação em solução aquosa, veículo usualmente empregado em injeção intravenosa e componente majoritário de fluídos corpóreos. Subseqüente ao processo de agregação, estes aglomerados podem levar a formação de precipitados, o que inviabiliza seu uso clínico devido à dor no momento da injeção, perda de materiais no recipiente/frasco e mesmo morte do paciente por obstrução de artérias. Mesmo para o uso tópico a preferência é água uma vez que a maioria dos solventes orgânicos são tóxicos. Além dos inconvenientes citados, o fármaco no estado agregado reduz a produção de oxigênio singlete (devido a rápida desativação de energia de estados excitados pelo fenômeno de auto supressão) e assim compromete-se a eficiência do tratamento (Sternberg e col., 1998; Machado, 2000).

I.1.2. Mecanismos Fotofísicos e Fotoquímicos da Terapia

Fotodinâmica

No diagrama de Jablonski (figura 1) estão representados os processos fotofísicos que um fármaco fotossensível pode sofrer após a absorção de radiação.

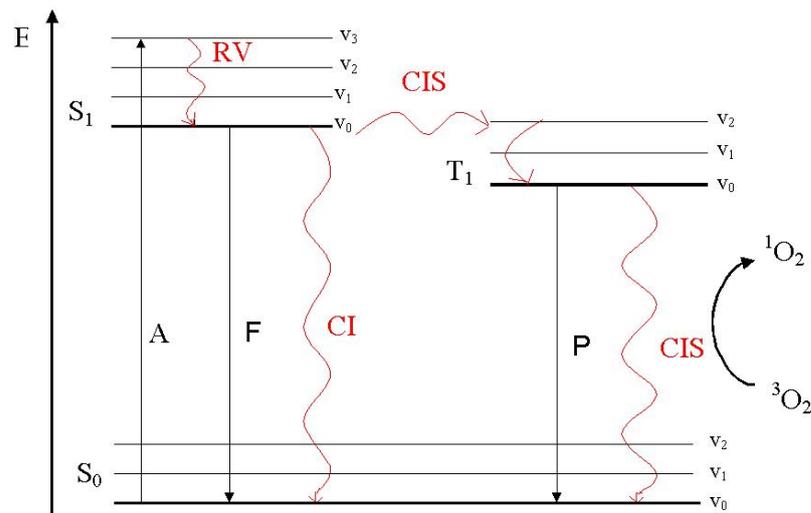
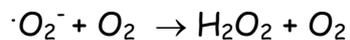
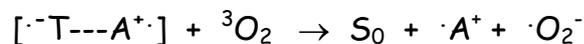


Figura 1: Diagrama de Jablonski

Após a iluminação do fármaco no estado fundamental (S₀) é excitado para o seu estado singlete excitado (S₁). Este estado excitado tem um tempo de vida curto para interagir efetivamente com as moléculas vizinhas (na ordem de nanosegundos), normalmente perdendo energia rapidamente através de processos radiativos (emissão de fluorescência, F), e/ou não radiativos (conversão interna, CI ou cruzamento intersistemas, CIS). Para a TFD, o mais importante destes processos é o cruzamento intersistemas, caracterizado por uma inversão de spin eletrônico, levando o fármaco ao seu estado triplete excitado (T₁). A partir do estado triplete, o fármaco pode retornar para o estado fundamental pelo processo de conversão interna ou pelo processo de emissão de fosforescência (P). Deste estado excitado (T₁) os processos fotoquímicos que o fármaco pode sofrer são extremamente importantes.

O estado triplete excitado tem um tempo de vida da ordem de microsegundos (μs), que é longo o suficiente para permitir a interação do fármaco no estado excitado com moléculas vizinhas. Neste estado excitado, pode por transferência de elétrons com substratos orgânicos (A) produzir um substrato oxidado ($A^{\cdot\cdot}$) e o fármaco reduzido (${}_1T^{\cdot\cdot}$) que reage com o oxigênio molecular (3O_2) gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são capazes de induzir irreparáveis danos oxidativos às células (Machado, 2000). Este mecanismo de fotossensibilização é conhecido como TFD tipo I.

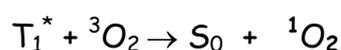
TFD Tipo I: Reações de formação de radicais livres



Adicionalmente, o fármaco em seu estado triplete excitado pode transferir o seu excesso de energia para o oxigênio molecular (no seu estado fundamental, $3\Sigma_g^-, {}^3O_2$) com formação de oxigênio singlete (1O_2); ou seja, o oxigênio no estado fundamental, tem a configuração eletrônica de dois orbitais π^* degenerados (orbitais com a mesma energia) ocupados por 1 elétron cada, sendo estes de spin paralelos (Ronsein e col., 2006). Este oxigênio triplete, ao receber energia de um fármaco fotossensível no estado triplete excitado, passa para um estado excitado com inversão de um dos seus spins, caracterizando o

estado singlete. Esta reação de transferência de energia caracteriza o mecanismo do Tipo II de TFD.

TFD Tipo II: Reações de formação de oxigênio singlete



Adicionalmente o 1O_2 pode existir em duas formas distintas conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio molecular no estado singlete excitado (${}^1\Sigma_g^+$, ${}^1\Delta_g$) e no estado fundamental (${}^3\Sigma_g^-$).

Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal/mol)
${}^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \quad \downarrow$	37,5
${}^1\Delta_g$	$\uparrow \downarrow$	22,5
${}^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \quad \uparrow$	

O estado ${}^1\Sigma_g^+$ rapidamente decai para a forma menos energética (${}^1\Delta_g$) pois este tem um tempo de vida muito curto, da ordem de picosegundos. O oxigênio no estado excitado de configuração ${}^1\Delta_g$ é a espécie normalmente ativa (TFD tipo II), sendo esta responsável pelo dano celular foto-induzido. O oxigênio singlete possui um tempo de vida "relativamente" longo (2 a 4 μ s em H_2O) e por isto é um importante agente oxidante. Em sistemas biológicos, o tempo de vida do 1O_2 é muito menor, inferior a 0,04 μ s, devido à presença de inúmeras biomoléculas com as quais o oxigênio singlete reage (Machado, 2000). A reação, rápida e

indiscriminada, ocorre com os mais variados materiais biológicos ricos em elétrons como lipídios insaturados (colesterol), aminoácidos (como triptofano, histidina, metionina), proteínas e ácidos nucleicos, levando danos à membrana celular, mitocôndrias e lisossomos, comprometendo assim a integridade celular (Machado, 2000; Ronsein e col., 2006).

I.1.3. Fármaco fotossensível - Azul de metileno

O azul de metileno (AM), figura 2, é uma molécula que tem desempenhado importante papel em microbiologia e farmacologia. É muito conhecido como corante histológico e usado há muitos anos. Pertence a classe dos compostos benzofenotiazínicos, é amplamente usado clinicamente em organismos vivos para o tratamento da metahemoglobinemia. Dentre as pesquisas sobre o seu uso inclui-se a malária e a esquizofrenia, sendo que já em 1891 Ehrlich empregou o AM com sucesso no tratamento da malária (Wainwright, 2005).

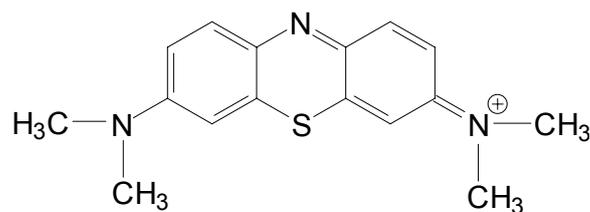


Figura 2: Estrutura do azul de metileno

A síntese do AM ocorreu em 1876, no período em expansão industrial, especialmente de tinturas para tecidos. É bem estabelecido que o cátion AM intercala na estrutura do ácido nucleico (DNA) devido à carga positiva e à geometria planar do fotossensibilizador em questão, especialmente em regiões ricas em guanina-citosina (Wainwright, 2000; Wainwright, 2002), figura 3. Adicionalmente, o AM acumula-se preferencialmente na mitocôndria das células,

pois estas contêm uma variedade de proteínas na sua membrana. A seletividade deste corante na mitocôndria pode ser determinada pela lipofílicidade e pela carga, que se for positiva é atraída devido ao ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial (Baptista e col., 2004).

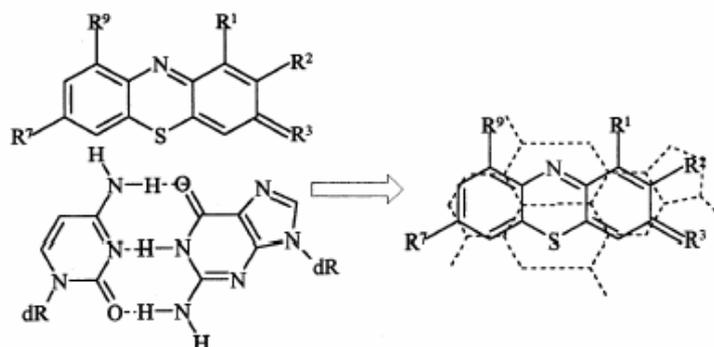


Figura 3: Superposição de um cromóforo fenotiazino em um par guanina-citosina (G-C) (Wainwright, 2000)

O AM em solução aquosa está presente na forma de monômeros (soluções diluídas), dímeros e agregados maiores (soluções bastante concentradas), sendo estes distinguíveis pelas suas bandas de absorção, máximos em 664nm, 600nm e na região de 550 nm, respectivamente (Tardivo e col., 2005). Assim esta classe de corantes exibe intensa absorção em comprimentos de onda de 600 a 660 nm, região do espectro vermelho, radiação esta favorável a TFD por estar dentro da "janela foto-terapêutica" devido a sua eficiência quanto à penetração da luz em tecidos biológicos (Sternberg e col., 1998; Sternberg e Dolphin, 1996).

O AM, além de barato e absorver na região de luz vermelha, produz espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido e oxigênio singlete. O valor de rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) do AM em água e álcoois é em torno de $0,52 \pm 0,02$ (Zhang e Tang, 2004; Fernandez e col., 1997).

Atualmente o AM é empregado em várias agências europeias para desinfecção de plasma sanguíneo, pois é eficaz na inativação de vírus, incluindo HIV, hepatite B e C (Floyd e col., 2004; Wainwright, 2000). O vírus da dengue

também pode ser erradicado por AM e TFD (Huang e col., 2004). Há pouco tempo começou a ser considerado como um fármaco para a TFD (Tardivo e col, 2005; Itri, 2002) pois tem mostrado atividade *in vivo* contra vários tipos de tumor quando injetado localmente e iluminado com laser emitindo no vermelho. Azul de metileno tem sido usado clinicamente no tratamento de câncer de bexiga e recentemente contra tumores de esôfago inoperáveis, virulências da pele, psoríase e adenocarcinomas (Perussi, 2007).

Os princípios fotoquímicos do AM encontram-se na figura 4. O AM é ativado ao estado singlete excitado ($^1AM^*$) pela luz. Neste estado, com igual probabilidade, ele pode retornar ao estado singlete ou ir para o estado triplete. No estado triplete o AM pode reagir com o O_2 e formar o oxigênio singlete (1O_2) e voltar ao seu estado normal, ou em um processo muito mais lento formar superóxido. Alternativamente o $^3AM^*$ pode reagir com substratos gerando espécies reativas de oxigênio (Floyd e col., 2004).

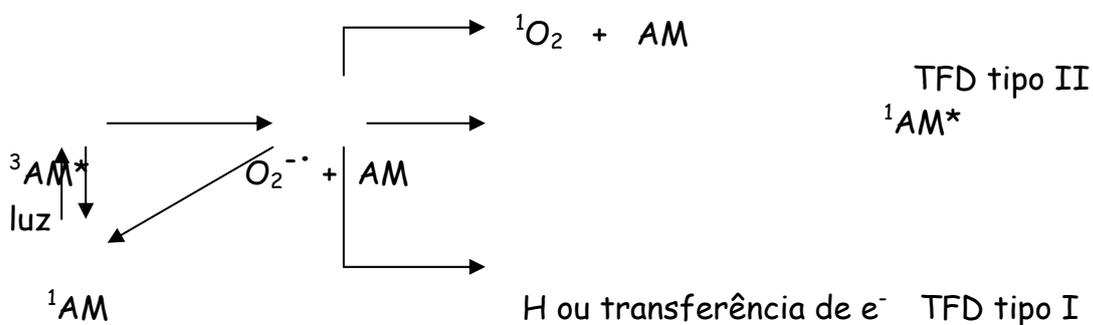


Figura 4: Esquema da fotoquímica do azul de metileno

Devido ao fato do AM ser gerador de espécies ativas de oxigênio, incluindo o oxigênio singlete e o superóxido, a própria espécie reativa gerada pode atacar o corante sensibilizador, ou seja, produção de reações fotoquímicas (foto-branqueamento), ex. foto-oxidação do AM. Quanto aos produtos dessas reações, é proposto inicialmente a desmetilação no grupo amino conduzindo a formação do

Azure e depois a Tionina e, por fim, ocorre a quebra da molécula se decompondo em espécies benzênicas (Wainwright e Giddens, 2003).

I.1.4. Fontes de Iluminação usadas em TFD

No tratamento de doenças, diversas fontes de luz podem ser usadas para provocar a excitação das moléculas fotossensibilizadoras, como por exemplo, luz pulsada, luzes incoerentes (projektor de slides), lâmpada de xenônio, entre outras, todas com filtros específicos que permitem selecionar o comprimento de onda de maior penetração nos tecidos e de absorção máxima do fármaco. No tratamento que envolve a TFD, a radiação utilizada geralmente é fornecida por um sistema LASER que é dirigida ao local do tratamento através de fibras óticas. Os raios LASERs são preferencialmente empregados por apresentarem três características que os diferem da luz comum. A luz é monocromática (um só comprimento de onda), coerente (unifásica) e unidirecional (raio colimado), sendo que adicionalmente os sistemas LASER podem ser potentes. A intensidade da radiação em TFD é dada em J/cm^2 . Uma variedade de LASERs podem ser utilizados dependendo da característica e da fase em que se encontra a lesão, sendo usualmente três tipos os usados na TFD: Nd YAG (neodymium yttrium-aluminiumgarnet), argônio e os lasers de diodo. Os lasers de diodo são menos caros, fornecem luz de potência considerável com precisão sobre o tecido a ser irradiado; em 2000 foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA/EUA) o uso deste laser para a ativação do Photofrin® visando aplicação em lesões malignas no esôfago e pulmão (Mang, 2004; Machado, 2000).

Uma alternativa adicional razoável é a utilização de LED (diodo emissor de luz), disponíveis no mercado em várias regiões espectrais, incluindo-se a do vermelho (630, 670 e 690 nm) (Mang, 2004).

I.1.5. Dificuldades da TFD

Apesar do vasto campo de aplicação da TFD e do grande apelo clínico e comercial da técnica, dois fatores dificultam a disseminação do tratamento: o custo dos medicamentos e equipamentos, além da falta de conhecimento da técnica pela classe médica. Os fármacos utilizados para a TFD, cujos princípios ativos são sintéticos, são economicamente inacessíveis à maioria da população devido as dificuldades na produção e alto investimento no desenvolvimento destes.

No caso de equipamentos, atenção especial é dada ao LASER, que possui elevado preço e inviabiliza a maior difusão da técnica. O desenvolvimento do laser de diodo fez com que o custo de aparelhagem fosse diminuído, mas ainda assim é alto para a realidade brasileira. Uma alternativa possível é o uso do LED, *diodo emissor de luz* (Mang, 2004), dispositivo de luz policromática. As fontes à base de LED, apesar de apresentarem potência muito inferior aos LASERs, são muito mais baratas.

Um outro aspecto de interesse neste trabalho é a diversidade de enfermidades que pode ser tratada com a TFD, doenças muitas vezes negligenciadas pelas grandes corporações farmacêuticas pelo baixo retorno financeiro.

I.2. Aplicações / Doenças

I.2.1. Leishmaniose

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, cujo ciclo tem a participação de hospedeiros vertebrados e invertebrados (Rey, 2001).

Durante seu ciclo biológico, este protozoário apresenta duas formas evolutivas: amastigota e promastigota. A forma amastigota parasita o fagossoma das células do sistema monocítico macrófago dos hospedeiros vertebrados (homem, animais silvestres e animais domésticos) e é caracterizada pela ausência de flagelo. A forma promastigota habita o aparelho digestivo do vetor, insetos (mosquito) da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* - no Novo Mundo, e *Phlebotomus* - no Velho Mundo e caracteriza-se por possuir flagelo (Neves, 2000).

Durante a picada de um mosquito flebotomíneo contaminado, formas promastigotas do parasito são inoculadas no hospedeiro vertebrado, as quais são fagocitadas por macrófagos. No interior destas células as formas promastigotas transformam-se em amastigotas e dão início ao processo de multiplicação até o rompimento da membrana da célula hospedeira, promovendo a liberação de milhares de parasitos amastigotas que irão infectar novas células (Rey, 2001).

A leishmaniose pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro: (i) a leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade infecciosa, generalizada, crônica, caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, emagrecimento, estado de debilidade progressivo levando à caquexia e até óbito se o paciente não for submetido a tratamento; (ii) a leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode apresentar-se na forma cutânea

localizada caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas; (iii) a forma cutâneomucosa é caracterizada por lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas; a forma disseminada apresenta múltiplas úlceras cutâneas por disseminação hematogênica ou linfática e, finalmente, a forma difusa apresenta lesões nodulares não ulceradas (Neves, 2000).

A leishmaniose é uma das doenças infecto-parasitárias de maior incidência no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007), mais de 12 milhões de pessoas em 88 países estão infectadas e cerca de 350 milhões correm o risco de contrair a infecção. A incidência anual é estimada em 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos da forma visceral (WHO, 2007).

Do total de casos de leishmaniose tegumentar já registrados no mundo, 90% ocorreram em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão no Velho Mundo, Brasil e Peru na América do Sul. A LTA ocorre nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende quase todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (WHO, 2007).

A LTA é problema de Saúde Pública não só no Brasil, mas também em outros países do Novo Mundo. Sua importância se deve não somente a sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem levar a lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Gontijo e Carvalho, 2003). No Brasil a LTA tem sido registrada em todos os Estados sendo que as regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná são endêmicas para a doença (Silveira e col., 1996; Silveira e col., 1999; Lima e col., 2002), devido à intensa destruição de matas nativas e também pela presença do vetor em regiões peridomiciliares (Teodoro e col., 2001; Castro e col, 2002).

O tratamento de escolha para LTA, recomendado pelo Ministério da Saúde, é o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®), na dose de 15mg Sb^V/Kg/dia, durante 20 dias e se não houver cicatrização completa após 3 meses do término do tratamento, o esquema deve ser repetido, agora com duração de 30 dias. Este medicamento tem provocado sérios efeitos colaterais (artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos entre outros, inchaço e dor no local da aplicação) (Ministério da Saúde, 2000) além de desconforto para os pacientes, o que leva ao abandono do tratamento e possibilita a seleção de parasitos resistentes aos fármacos. Essas preparações de antimônio são empregadas nos últimos 90 anos. Sua introdução foi baseada em conceitos terapêuticos do século XIX, onde era significativa a participação terapêutica de sais de metais, como arsênio e outros. A indústria pouco tem contribuído no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose e, no Brasil, o medicamento de eleição continua sendo o antimoniato de metilglucamina. A estrutura e composição deste fármaco ainda não foram totalmente esclarecidas, e o mecanismo de ação ainda é pouco conhecido. Existem fortes evidências que o antimônio pentavalente seja reduzido *in vivo* à sua forma trivalente, o que vem a explicar a toxicidade deste composto, bem como seu efeito terapêutico. Ainda, o medicamento disponível no Brasil tem apresentado problemas quanto à sua qualidade (Rath e col., 2003). Por isso, novos tratamentos alternativos devem ser investigados.

I.2.1.1. A TFD no tratamento da leishmaniose tegumentar americana

Entre os poucos trabalhos envolvendo *Leishmania* e TFD têm-se um estudo que mostra a suscetibilidade *in vitro* com as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* com cloreto de ftalocianina de alumínio e luz de baixa

energia (Dutta e col., 2005). Em outro estudo *in vitro* (Akilov, e col., 2006) investigou-se o impacto da carga molecular e estrutura do fotossensibilizador na resposta fototóxica do parasito. A atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores com carga positiva (benzofenotiazínicos - derivados do azul de metileno) foi maior do que os com carga negativa (porfirinas aniônicas). Segundo os autores este fato é devido a carga negativa da superfície da membrana do parasito, ou seja, os fármacos catiônicos, devido a forte interação, seriam mais eficientes do que os aniônicos. Esta carga negativa é devido a um componente da membrana, o lipofosfoliglicano (LPG).

Alguns poucos estudos mostram a eficiência da terapia fotodinâmica no tratamento clínico da leishmaniose cutânea. Gardlo e col., (2003) trataram cinco lesões de leishmaniose tegumentar com TFD utilizando o fármaco fotossensível Metvix (Metilaminolevulinato, derivado do ALA) (Photocure, Oslo, Norway), e 75 J.cm⁻² de luz vermelha, duas vezes por semana, durante 12 semanas, seguida de 1 vez por semana por mais 4 semanas. Todas as 5 lesões tratadas com esta terapia ficaram clinicamente e histologicamente livres de *Leishmania*. Não houve recorrência da lesão no período observado (10 meses) e o resultado estético foi excelente.

Outro estudo, envolvendo 20 pacientes num total de 31 lesões, foi realizado com o ácido aminolevulínico (ALA), 100 J.cm⁻² por sessão, duração de 4 semanas e aplicação 1 vez na semana. Os resultados foram muito promissores sendo que 29 lesões tiveram 100% de cura e as outras 2 tiveram cura parcial (Asilian e Davami, 2006).

I.2.2. Microrganismos patogênicos

O número de microrganismos (bactérias e fungos) resistentes a antibióticos cresce no mundo todo. Este fato é preocupante exigindo o desenvolvimento de novas técnicas antimicrobianas de forma que estas não sejam capazes de desenvolver resistência. A TFD tem sido apontada como uma terapia antibacteriana alternativa, podendo ser usada como uma terapia para infecções localizadas, uma vez que, a morte das células é causada pelo oxigênio singlete e radicais livres, sendo improvável que adquiram resistência a TFD (O' Riordan e col., 2005; Perussi, 2007).

Em relação à inativação de bactéria, diversos trabalhos tem mostrado que bactérias Gram-positivas (+) são geralmente mais sensíveis à TFD do que as espécies Gram-negativas (-) que são mais resistentes. Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças estruturais na parede celular. As bactérias Gram (-) tem uma membrana externa à camada de peptídeoglicano, funcionando como uma barreira física e funcional entre a célula e seu ambiente, o que dificulta a incorporação de fármacos. As células Gram (+) têm somente uma membrana. Assim, antibióticos que são eficientes contra bactérias Gram (+) não são eficientes contra Gram (-) (Phoenix e col., 2003). Já os fungos são ainda mais resistentes a TFD devido à presença de uma membrana nuclear que pode representar uma barreira adicional à penetração do fármaco (Perussi, 2007), figura 5.

Com o crescente número de patógenos fúngicos principalmente em pacientes imunocomprometidos, causando infecções e micoses (Teichert e col., 2002; Perussi, 2007), tem aumentado a busca por tratamento fungicidas mais eficientes. Sabe-se que fármacos seguros e específicos são poucos e caros e a maioria deles tem ação somente fungistática, ou seja, apenas inibem a multiplicação, não provocando a morte. Além disso, o uso rotineiro de antibióticos

tem levado ao aparecimento de linhagens resistentes, exigindo doses maiores. Com isso tem havido um interesse crescente no uso da TFD em tratamentos contra fungos (O' Riordan e col., 2005)

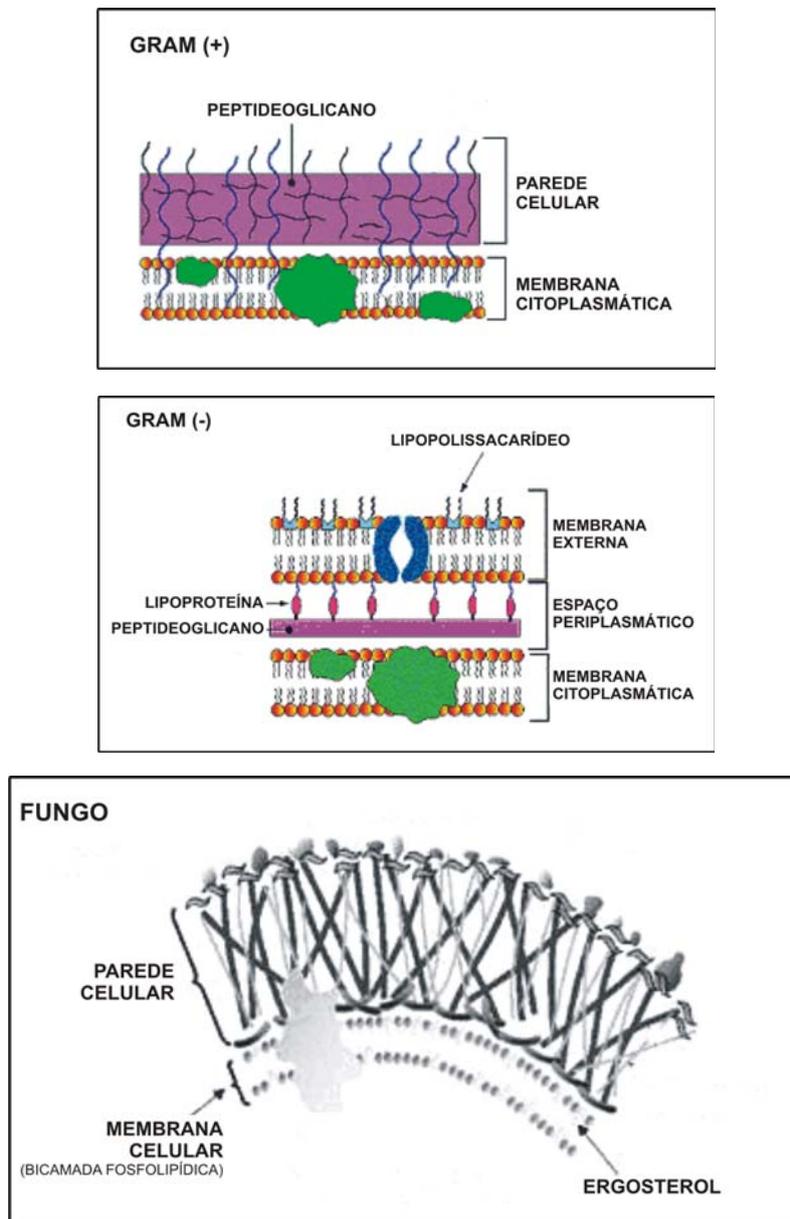


Figura 5: Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-positiva (+), Gram-negativa (-) e fungo.

I.2.2.1. Os microrganismos em estudo

Os microrganismos escolhidos para os ensaios fotodinâmicos foram *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo), *Escherichia coli* (Gram-negativo) e *Candida albicans* (fungo).

S. aureus é o microrganismo mais comum como patógeno oportunista humano. É uma bactéria muito presente em infecções hospitalares é uma das maiores causas de morte. Pode causar infecções em diferentes partes do corpo. Infecções por esta bactéria são frequentemente agudas e piogênicas. Algumas das infecções mais comuns envolvem a pele e incluem furúnculos, impetigo e feridas pós cirúrgicas. Algumas das infecções mais sérias causadas pelo *S. aureus* são bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardites agudas, miocardites, meningites, síndrome da pele escaldada, abscessos em músculos e trato geniturinário. Além disso, sua presença em determinados alimentos causa intoxicação devido à sua capacidade de produzir toxinas(Livermore, 2000).

A *E. coli*, igualmente uma bactéria, é uma das principais causas de doenças infecciosas em seres humanos e é o agente etiológico mais freqüente das infecções do trato urinário, acometendo principalmente mulheres e crianças. Habitante normal do trato-intestinal em animais de sangue quente, no homem é responsável por metabolizar uma considerável quantidade de vitaminas e exerce o importante papel de reprimir a multiplicação de outras bactérias prejudiciais à saúde. Mas a *E.coli* compreende, na verdade, um grande grupo de microorganismos, que se subdividem em mais de 160 sorotipos diferentes. Alguns deles, chamados de *E. coli* enteropatogênicos (EEC), são capazes de provocar infecções intestinais, algumas de certa gravidade.

Já a *C. albicans* é uma levedura encontrada em regiões mucocutâneas, trato digestivo e genital de mamíferos e aves, sendo um patógeno oportunista e

produzindo com maior frequência estomatite e vaginite, mas podendo causar infecções localizadas na pele, unhas, trato respiratório e levar à septicemia, dependendo do grau de imunossupressão do indivíduo. *C. albicans* pode afetar a superfície mucosa da boca, vagina, esôfago e árvore brônquica, e doenças que se disseminam e acometem múltiplos sistemas orgânicos. O quadro clínico varia, dependendo do local de infecção. A membrana mucosa da boca, língua e trato genital são mais comumente envolvidos que a unha e pele.

II. OBJETIVOS

O azul de metileno e a possibilidade de usar como fonte de luz dispositivos de LED, faz do sistema AM/LED interessante para a TFD devido a redução significativa de custos podendo ser aplicados às populações de baixa renda no tratamento de diversas doenças. Essa possibilidade nos motivou a desenvolver um trabalho interdisciplinar no intuito de investigar a atividade fotodinâmica do AM/LED e efetuar aplicações em algumas áreas da saúde.

Buscando a meta acima, citam-se os objetivos específicos, como: investigar algumas propriedades fotofísicas do azul de metileno em meios aquosos, visando sua aplicabilidade. Desenvolver um sistema de iluminação (fonte de luz), para uso nos estudos biológicos, afim de verificar a ação fotodinâmica do corante. Investigar a ação fotodinâmica *in vivo* frente ao micro-crustáceo *Artemia salina* e em culturas de microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Avaliar o potencial da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) *in vivo* em hamsters infectados com a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e também *in vitro* da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Materiais e soluções

O corante fotossensível investigado como possível fármaco, azul de metileno, fórmula molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ e massa molar $373,90 \text{ g.mol}^{-1}$, é proveniente da Vetec. Os solventes e demais reagentes utilizados foram de alto grau de pureza (qualidade PA). A água utilizada foi bidestilada.

Para os ensaios biológicos envolvendo microrganismos, trabalhou-se com as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 26923), *Escherichia coli* (ATCC 26922) e *Candida albicans* (ATCC 90028). Ágar nutriente, caldo nutriente (Difco), caldo Muller Hinton (CMH) e solução fisiológica (NaCl 0,9%, m/v) peptonada (0,1%, m/v) foram os materiais utilizados para a preparação e padronização das amostras biológicas. Os ovos de *Artemia salina* foram adquiridos em loja de animais de estimação (lojas PetShop).

A esterilização dos meios de cultura e soluções utilizadas no cultivo e manutenção das culturas de microrganismos, bem como todo o material necessário para a realização dos experimentos, foi realizada em autoclave horizontal. As soluções foram autoclavadas por 20 minutos a $120 \text{ }^\circ\text{C}$. O descarte dos meios e do material contendo microrganismos foi sempre precedido por esterilização utilizando-se a autoclave.

Os parasitos de *Leishmania* utilizados foram promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa MHOM/BR/1987/M11272 e de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa MHOM/BR/73/M2269.

Os meios de cultura utilizados nos ensaios com *Leishmania* foram: (i) Meio 199 completo (Gibco, Invitrogen Corporation) contendo: 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina, 1% de urina humana estéril, antibióticos (penicilina G

100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL) e pó para meio (10,7 g para 1000 mL); (ii) Meio RPMI 1640 completo, contém: 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina, antibióticos (penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL) e pó para meio (10,4 g para 1000 mL). Esses meios foram esterilizados por filtração com filtro Milipore (0,22µm) e conservados em geladeira a 4°C.

Nos ensaios com *Leishmania* as soluções de AM foram preparadas em meio de cultura 199 e RPMI e filtradas em filtro Milipore, em câmara de fluxo laminar, para não contaminar.

Reagente de Griess: 1% de sulfonilamida, 0,1% de dihidrocloreto de naftilenodiamina (N-(1-naftil-etil) enodiamina), 2,5% de ácido ortofosfórico em água milli Q.

III.2. Equipamentos

- ❖ Espectrofluorômetro - SPEX Fluorolog2, modelo 1680
- ❖ Microscópio óptico - Olympus
- ❖ Mesa agitadora - Tecnal, TE - 424
- ❖ Capela de fluxo laminar
- ❖ Estufa de incubação Bacteriológica - Fanem, modelo Orion 502
- ❖ BOD - Logen Scientific - Thermostatic Cabinets
- ❖ Estufa de CO₂ - Nuair, modelo NU-5500G
- ❖ Espectrofotômetro UV-Vis da Varian, modelo Cary 50
- ❖ Auto clave
- ❖ Espectrofotômetro para tubos - Spectronic 20 Bausch, para leitura em tubos de ensaio 13x100 mm
- ❖ Centrífuga
- ❖ Handheld Laser Power Meter - Edmund Optics Inc
- ❖ Medidor de espessura - Mitutoyo

III.3. Metodologias

III.3.1. Sistema de iluminação

O sistema de iluminação foi construído para os ensaios fotoquímicos (verificação de reações de foto-branqueamento e a determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete por métodos químicos) e para os ensaios biológicos. Cada conjunto de fonte é constituído por 6 dispositivos de LED (EverLight co) de cor vermelha. O espectro de emissão foi obtido em um espectrofluorômetro SPEX Fluorolog2 modelo 1680 e a potência individual de cada LED foi obtida através de um Handheld Laser Power Meter, no comprimento de onda de máxima emissão da mesma, 663 nm.

III.3.2. Reações de Foto-branqueamento (Foto-decomposição)

Para verificar a existência de reações de foto-branqueamento do azul de metileno, os estudos foram realizados em meio aquoso e etanólico de soluções aeradas e desaeradas. Iluminaram-se as soluções por um grande intervalo de tempo (5 horas), utilizando-se a fonte de luz (LED), a temperatura ambiente. Registraram-se espectros de absorção UV-Vis a cada 5 minutos de irradiação. A reação de foto-branqueamento é comprovada por mudanças no espectro decorrente de reações fotoquímicas.

As soluções desaeradas foram preparadas borbulhando-se gás N₂ (99,99% de pureza) através da solução por cerca de 30 minutos, previamente a exposição à luz. Adicionalmente, para garantir a ausência de oxigênio dissolvido, aplicou-se adicionalmente o método de congelamento (nitrogênio líquido, -196 °C) - vácuo (bomba de vácuo por cerca de 5 minutos para retirada de gases acima do

congelado) - descongelamento (temperatura ambiente, com agitação), seguida de novo ciclo, com 3 repetições sequenciais.

III.3.3. Teste do Ácido Úrico - Reações de captação de oxigênio singlete

A fim de estimar a atividade fotodinâmica do azul de metileno pela sua habilidade de formação de oxigênio singlete, realizou-se o teste do ácido úrico (conhecido reativo para oxigênio singlete), com metodologia adaptada da literatura (Fisher e col., 1998). Uma mistura de 3,0 mL de ácido úrico (10^{-4} mol.L⁻¹) e do AM (10^{-6} mol.L⁻¹) em etanol (ou água), foi colocada em uma cubeta de quartzo. A solução foi agitada e mantida à temperatura ambiente durante as medidas. Iluminou-se a solução com a fonte de LED, registrando-se espectros de absorção (250-800nm) a cada três minutos de irradiação durante 2 horas (36 J.cm⁻²) aproximadamente.

A equação utilizada para o cálculo do índice de atividade fotodinâmica (AF) foi adaptada daquela utilizada para luz monocromática (LASER) para luz policromática (LED), Equação 1, levando-se em conta o termo de potência absorvida.

$$AFQ = \frac{\Delta AU \times 10^5}{t \times P_{abs}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, ΔAU : variação da absorbância em 293 nm da solução após o tempo total de irradiação; P_{abs} : representa a intensidade de luz absorvida pelo corante em relação a luz emitida pelo LED; e t: tempo de irradiação.

Considerou-se neste trabalho a potência absorvida (P_{abs}), ou seja, a quantidade de luz absorvida pelo corante pela excitação com aquele LED. Com esta finalidade utilizou-se o espectro de transmitância do composto e o espectro de emissão do LED, determinando-se a quantidade de fótons absorvida pelo corante em escala de potência (watts). Detalhes dos cálculos são mostrados no capítulo Resultados e Discussões.

III.3.4. Ensaio de toxicidade com *Artemia salina* (Meyer, 1982)

Os ovos de *Artemia salina* foram eclodidos em salina ($\text{NaCl } 3,8 \text{ g.L}^{-1}$), no interior de um recipiente retangular, construído com uma divisão interna (com orifícios) constituindo dois compartimentos. Os ovos foram adicionados no compartimento menor, protegido da luz. O compartimento maior foi externamente iluminado com lâmpada de 60 watts, de modo a atrair os crustáceos recém eclodidos. Após 48 horas, em temperatura ambiente, foram transferidos cerca de 20 crustáceos para cada tubo de ensaio, utilizando uma pipeta Pasteur. Adicionou-se 1,5 mL de solução aquosa de azul de metileno no tubo e o volume foi completado até 3 mL com salina. Na seqüência constituíram-se dois grupos de amostras: as submetidas à iluminação com luz vermelha (1 hora, LED) e as sem iluminação, incluindo-se os controles para evitar resultados falso-positivos. Realizou-se a contagem dos animais vivos e mortos de cada tubo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

III.3.5. Ensaio *in vitro* em culturas de microrganismos

As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e o fungo *Candida Albicans* foram mantidas no ágar nutriente (Caseína Tryptic e Dextrose Sabouraud) e conservadas em um refrigerador a -4 °C. Diante dos experimentos, os microrganismos foram crescidos em caldo Muller Hinton (CMH) a 37°C por aproximadamente 15 horas, em estufa para cultura bacteriológica. A suspensão de microrganismo foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos; o sobrenadante foi descartado e o concentrado de inóculo foi ressuspensão e lavado com soro fisiológico peptonado, repetindo-se o procedimento por mais duas vezes. O inóculo foi ressuspensão com solução fisiológica e calibrado em espectrofotômetro (para leitura em tubos) a 580 nm em transmitância de 25-30%. Desta suspensão foram realizadas diluições (1:10 para *S.aureus*; 1:20 para *E.coli*; 1:5 para *C.albicans*) em solução fisiológica obtendo-se uma suspensão de células calibradas na concentração média de $(1-2) \cdot 10^8$ UFC. mL⁻¹ (unidades formadoras de colônia por volume).

Todas as experiências foram realizadas com dois grupos: um grupo exposto à luz e outro mantido no escuro. Os grupos controle foram realizados como: um misturando 400µL do inóculo e 100µL de salina estéril (controle positivo), e outro 100µL AM + 400µL de CMH, sem microrganismo (controle negativo). Os grupos testes foram preparados adicionando 100µL do AM, em diferentes concentrações, com 400µL do inóculo calibrado em 4 poços (15 mm diâmetro) de placas de poliestireno estéril, obtendo concentrações finais de 7 a 140,8 µmol.L⁻¹ de AM.

A iluminação foi realizada diretamente sobre as placas com as amostras, utilizando os LEDs como fonte, em mesa agitadora a 80 rpm e 25 °C, durante 30 minutos. Após o tempo de iluminação, transferiu-se o conteúdo das placas para tubos de ensaio, completou-se o volume até 4,0 mL com CMH. As amostras foram

incubadas em estufa a 37 °C. A taxa de crescimento foi quantificada por espectrofotômetro e a porcentagem de transmitância (%T) em 580 nm foi medido em 0, 2, 4 e 6 horas até que o crescimento do grupo controle não variasse mais. Os resultados foram expressos em %T dada pela turbidez do crescimento das células.

Para calcular a taxa de morte e o valor-D (definido como o tempo em minutos necessário para reduzir 1 ciclo logaritmico), utilizou-se a concentração de 35,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ abaixo da DB_{50} , e o tempo de iluminação foi variado em 10, 20 e 30 minutos. Imediatamente depois da exposição, as células foram colhidas e lavadas em água salina e diluídas 10, 100 e 1000 vezes, e 100 μL foi colocado em placas (Petri) de cultura com agar Caseína Tryptic, incubada por 24 horas a 37°C e o número de UFC contados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

III.3.6. Ensaio *in vitro* com a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*

III.3.6.1 Sobre a forma promastigota

Formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram isoladas a partir de hamsters experimentalmente infectados, em meio de cultura 199 a 26°C.

Tubos contendo 2×10^6 promastigotas em 1,0 mL de meio 199 completo contendo diferentes concentrações de azul de metileno foram irradiados ou não, com LED por 30 minutos (9 J.cm^{-2}). Posteriormente as culturas foram mantidas a 26°C. Tubos contendo apenas parasito em meio de cultura, tratados ou não com luz, também foram acompanhados como controles.

A avaliação do crescimento dos parasitos foi feita a cada 2 dias durante 10 dias, por contagem em câmara de Neubauer em microscópio. Experimentos foram realizados em triplicata.

III.3.6.2 Sobre formas amastigotas

Camundongos BALB/c foram inoculados intraperitonealmente com 1 mL de caldo tioglicolato. Após quatro dias os animais foram anestesiados com uma combinação de xilazina (10 mg/kg - Rompum[®]) e cloridrato de quetamina (50 mg/kg - Ketamina[®]), via intraperitoneal, sacrificados por aprofundamento da anestesia e desinfetados com álcool. A cavidade peritoneal foi lavada com 8,0 mL de tampão fosfato salino (PBS) estéril gelado para obtenção dos macrófagos elicitados. A suspensão celular obtida foi centrifugada por 8 minutos a 1200 rpm e o sedimento ressuspense em meio de cultura RPMI. A quantidade de macrófagos foi estimada pela determinação do número total e diferencial de células presentes no lavado peritoneal, onde à um volume de 90 µL do lavado foram adicionados 10 µL de cristal violeta (0,5% em ácido acético 30%, v/v) (Vieira e col, 1994).

Lamínulas de vidro estéreis de 13 mm de diâmetro foram colocadas em poços de placas de cultura de células de 24 poços. A cada um destes poços foram acrescentadas suspensões de células peritoneais ajustadas para conter 5×10^5 macrófagos em 150 µL de meio de cultura RPMI.

As placas foram incubadas durante 1 hora a 25 °C, para que os macrófagos pudessem aderir à lamínula. Em seguida, as células não aderentes foram removidas por lavagem (3 vezes com PBS estéril e 2 vezes com meio de cultura RPMI).

Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que foram adicionadas às culturas na proporção de 10 parasitos para cada macrófago e mantidos durante 4 horas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂. Na seqüência as lamínulas foram lavadas com RPMI para a remoção dos parasitos não aderidos.

A cada cavidade foram adicionados 300 µL de meio RPMI com diferentes concentrações de AM e foram tratados ou não com LED por 30 minutos. Foram realizados controles de toxicidade da LED e do AM sobre os macrófagos. As placas foram incubadas durante 24 e 48 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após, foi retirado 200 µL do sobrenadante, para determinação de óxido nítrico (NO) e as lamínulas foram retiradas, lavadas em PBS e coradas utilizando-se os reagentes HEMA 3[®]. Depois de secas, as lamínulas de vidro foram montadas sobre lâminas de vidro (24x76mm) utilizando-se para isso o Entellan[®].

Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Para a determinação do Índice Fagocítico (IF), ou seja, a infectividade dos macrófagos, as lamínulas coradas foram observadas ao microscópio óptico comum sob aumento de 1000 vezes. Foram examinadas 200 células em cada lamínula, contando-se o número de macrófagos infectados para obtenção da percentagem de macrófagos infectados. Adicionalmente foi determinado o número médio de parasitos nos macrófagos infectados. O cálculo do Índice Fagocítico em cada lamínula foi realizado pela equação abaixo:

$$\text{IF} = \frac{\text{Percentagem de macrófagos infectados}}{\text{número médio de parasitos por macrófago infectado}}$$

III.3.6.3 Determinação do óxido nítrico

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados *Leishmania (Viannia) braziliensis*, tratados ou não com AM e luz foi avaliada através da determinação da concentração de nitritos presentes nos sobrenadantes das culturas, conforme ensaio descrito por Ding e col, (1988). Para isso, 50 µL do sobrenadante das culturas foram incubados com igual volume do reagente de Griess, durante 10 minutos à temperatura ambiente.

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com filtro em 550 nm, contra branco constituído por meio de cultura e reagente de Griess. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de NO_2^- , com base numa curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2) dissolvido em meio de cultura. Experimento realizado em quadruplicata.

III.3.7. Ensaio *in vivo* em hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Primeiramente os hamsters foram experimentalmente infectados com 5×10^6 formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em 100 µL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9% m/v) na pata posterior direita. Na pata posterior esquerda foram inoculados 100 µL do diluente, a qual foi utilizada como controle. Trabalhou-se com 38 animais.

A evolução da infecção foi avaliada semanalmente mediante a determinação da espessura da pata infectada e da não infectada, utilizando-se um medidor de espessura. Os 38 hamsters infectados foram divididos em 3 grupos: 2 grupos de 15 animais (grupos A e B) e 1 grupo de 8 animais (grupo controle).

Após o desenvolvimento da lesão (aproximadamente 90 dias após a infecção), os animais dos grupos A e B foram tratados com a terapia fotodinâmica utilizando o corante azul de metileno (AM) e LED como fonte de luz. Para receber o tratamento os animais eram sedados com uma combinação de xilazina (10 mg/kg - Rompum[®]) e quetamina (50 mg/kg - Ketamina[®]). Para os animais do grupo A foi usado AM (0,5%, m/v) em loção (cera autoemulsionável, óleo mineral, tensoativo, preparada pelo Departamento de Farmácia e Farmacologia - UEM, prof. Selma Lucy Franco) e para os do grupo B utilizou-se AM (0,5%, m/v) em água. O tratamento foi aplicado 3 vezes por semana e o tempo de exposição à luz foi de 1 hora (18 J.cm^{-2}) com duração de 12 semanas (3 meses), figura 6. O grupo controle não recebeu tratamento com a terapia fotodinâmica, apenas aplicou-se o azul de metileno, nas duas formulações.

A avaliação do tamanho da lesão foi feita semanalmente, onde a pata infectada e a não infectada eram medidas com um medidor de espessura; também foram realizados registros fotográficos das mesmas. A espessura da lesão foi determinada pela diferença da pata infectada e não infectada de cada animal.

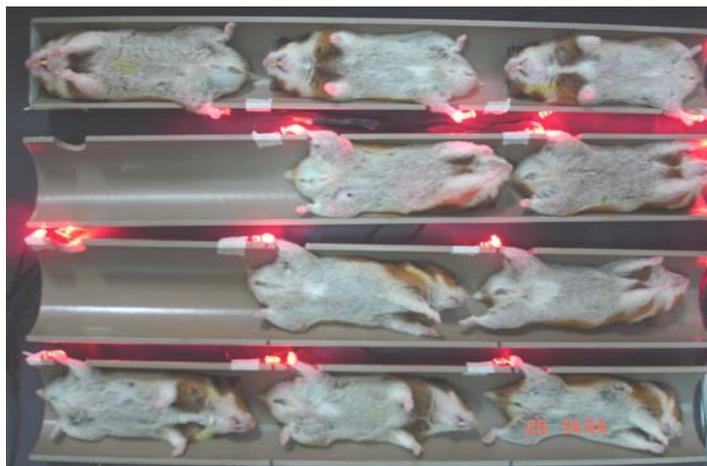


Figura 6: Hamsters anestesiados recebendo tratamento com AM/LED

III.3.7.1 Quantificação de *Leishmania* no baço e no linfonodo

A quantificação de *Leishmania* no baço e no linfonodo dos hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (utilizados no estudo anterior) foi realizada segundo a metodologia descrita por Buffet e col (1995), com algumas modificações.

Após o término do tratamento com a TFD, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia e desinfectados em álcool. Em seguida de cada um dos animais foi assepticamente retirado o linfonodo poplíteo regional à lesão e o baço, seguidos de pesagem. Cada órgão foi colocado em meio de cultura 199 e macerado em placa de Petri estéril com um embolo de seringa; a seguir esta amostra foi passada por seringa/agulha de insulina por diversas vezes (aproximadamente 30 vezes) para rompimento total das células. As suspensões foram seriadamente diluídas, a partir de $\frac{1}{4}$, na razão 4, em placas de cultura de células de 96 poços. Para isso, foram distribuídos 225 μL de meio de cultura 199 em todos os poços e 300 μL da suspensão obtida inicialmente no primeiro poço, realizando-se a seguir as diluições. Experimento realizado em duplicata. As placas foram vedadas com papel Parafilm[®] e incubadas a 26 °C durante trinta (30) dias, quando foram observadas no microscópio de luz invertida. Cada poço foi examinado microscopicamente à procura de formas promastigotas e foi considerado positivo quando pelo menos um parasito foi encontrado. As placas foram mantidas por mais quinze (15) dias em cultivo, quando foram novamente examinadas. Para a obtenção da carga parasitária em cada órgão foi realizado o seguinte cálculo:

Carga parasitária: Média geométrica da recíproca dos títulos positivos x 16,7

Massa do órgão (g)

Nesta fórmula, 16,7 representa a fração da suspensão de cada órgão inoculada no primeiro poço da placa de cultura.

III.3.8. Aspectos éticos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação (CEAE) da Universidade Estadual de Maringá para a sua realização e aprovado pelo parecer 028/2006 de 11/07/2006.

III.3.9. Análise estatística

Em todos os ensaios biológicos, realizou-se o teste de normalidade (Shapiro Wilk'S). Sendo normal os valores aplicou-se o teste T de Student. Utilizando o programa StatSoft®. Foi considerado significativo quando os resultados apresentavam $P < 0,05$, ou seja, quando P é acima de 0,05 as diferenças nos valores são consideradas irrelevantes e assim os resultados são tomados como estatisticamente iguais.

Os ensaios com microrganismos foram realizados no Departamento de Farmácia e Farmacologia (DFF/UEM), orientados pela prof^a Dr^a **Elza Kimura**. Os experimentos com *Leishmania* foram realizados no Laboratório de Parasitologia Clínica, do Departamento de Análises Clínica (DAC/UEM) orientados pela prof^a Dr^a **Thais Gomes Versignassi Silveira**.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Espectro do azul de metileno

O azul de metileno apresenta alta absorção de luz na região do vermelho, figura 7, característica necessária a compostos eficientes na terapia fotodinâmica devido a maior penetração dessa radiação através de tecidos biológicos (janela fototerapêutica).

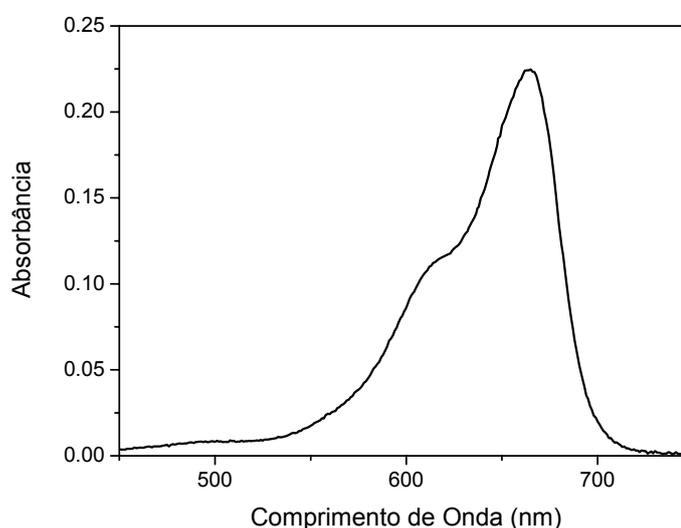


Figura 7: Espectro de absorção do azul de metileno (5×10^{-6} mol L⁻¹) em água

O espectro obtido (figura 7) é igual ao de AM em soluções de solventes orgânicos mostrando que nesta situação o composto está presente no estado monomérico. É conhecido que em concentrações altas de AM em água formam-se auto-agregados do corante, com a formação de bandas adicionais na região de 600 nm (dímeros) e 550 nm (agregados maiores) (Baptista 2005). O estado monomérico do corante é a forma desejável do fotossensibilizador uma vez que este no estado agregado pode ter sua energia de excitação mais facilmente suprimida por auto-supressão levando a decaimento não radiativo (CI) para o estado fundamental; dessa forma diminui-se as possibilidades de conversão

inter-sistema (CIS) ao estado triplete e, conseqüente, reduz o rendimento quântico de oxigênio singlete (a espécie ativa para a TFD tipo 2).

IV.2. Sistema de iluminação (LED)

Para a realização dos experimentos envolvendo luz investigou-se dispositivos de LED de cor vermelha (como previamente mencionada em função da maior penetração da luz em tecidos biológicos). Como conseqüência, encontrou-se um LED cujo espectro de emissão está apresentado na figura 8.

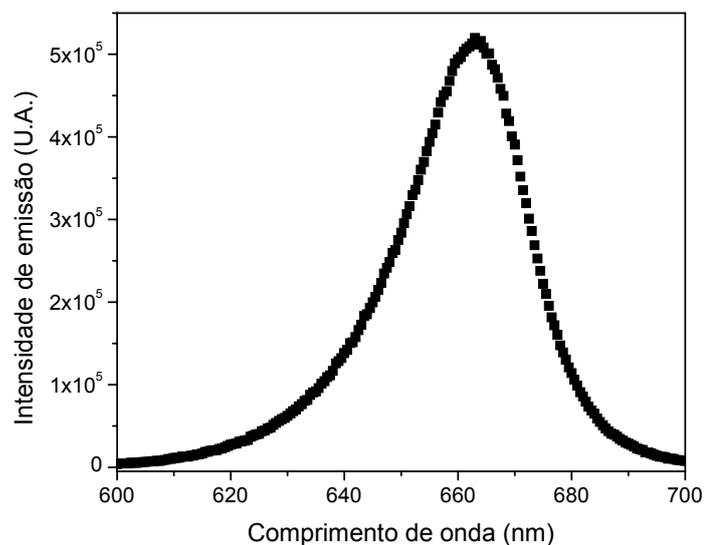


Figura 8: Espectro de emissão da fonte de iluminação (LED)

Dos espectros verifica-se que a janela de emissão da fonte (entre 640 a 680 nm) coincide com a região mais intensa de absorção de luz do azul de metileno (figura 7: absorção e figura 8: emissão). Observa-se que o máximo de emissão ocorre em 663 nm, mesma região de máximo de absorção do corante no estado monomérico. O tratamento clássico em TFD utiliza fontes de LASER, luz monocromática de alta intensidade; no entanto, além de caros, estes

equipamentos possuem luz muito focalizada o que dificulta seu uso clínico em lesões de diâmetros maiores. O baixo custo de um sistema a base de LED, aproximadamente R\$ 1,00 / unidade de LED, permite efetuar vários experimentos simultâneos; no caso presente o conjunto é constituído de seis (6) unidades LED, ou seja, no caso 6 ensaios por sistema - fonte. O conjunto com as seis (6) unidades de LEDs está apresentado na figura 9. A irradiância de cada unidade LED é de 5 mwatts.cm^{-2} .



Figura 9: Fonte de luz constituído de 6 unidades de LED

IV.3. Estudo de Foto-decomposição (Foto-branqueamento)

No escuro, as soluções aquosas de azul de metileno mantêm-se inalteradas, fato constatado pela espectrofotometria de absorção; entretanto ao serem irradiadas com a luz de LED verifica-se perda da coloração devido ao processo de fotodegradação do corante. Na figura 10 estão apresentados os espectros de absorção em soluções com aeração normal.

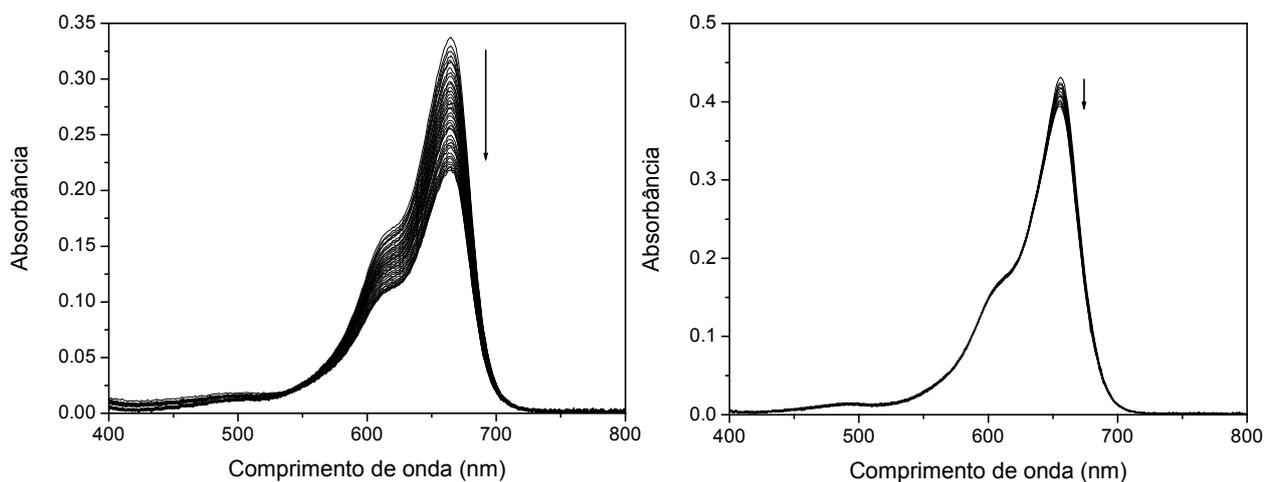


Figura 10: Sobreposição de espectros do azul de metileno (5×10^{-6} mol L⁻¹) em água (A) e etanol (B) em situações de aeração normal, obtidos em intervalos de 5 min em amostra iluminada. As setas indicam a diminuição das bandas com a exposição à luz.

Apesar da existência de reações de branqueamento, observou-se que em alguns casos a mesma não é intensa. Estes resultados de fotobranqueamento podem ser mais facilmente visualizados através das curvas de intensidade de absorção em função do tempo de iluminação, onde inclui-se o estudo em meio desaerado (sem oxigênio), ilustrados na figura 11. Tratamentos matemáticos dos dados segundo leis cinéticas de ordem de reação tradicionais não levaram a ajustes aos pontos experimentais. Tentativas de análise quantitativa através de tempos de meia-vida foram realizadas uma vez que estes independem da ordem da reação; entretanto não levaram a resultados coerentes devido a variações de velocidade e magnitudes de fotodegradação.

Em soluções com aeração normal, tomando a absorbância inicial como referência, calcula-se que em solução aquosa cerca de 14,2% da intensidade de absorção decai em 60 minutos; nas mesmas condições em etanol o decréscimo é de apenas 8,6% em 60 minutos. Adicionalmente nestas condições de aeração normal, a fotodegradação em meio etanólico aparentemente é limitada, restringindo-se à 80 minutos de iluminação, com decréscimo de intensidade de apenas ~13%, enquanto que em água, esse efeito ocorre até aproximadamente 3 horas, com decréscimo de 40%. As velocidades de fotodegradação, visualizadas

pela inclinação da curva de intensidade contra tempo (figura 11), apontam que em meio aquoso a reação é ligeiramente mais rápida, principalmente nas fases iniciais da reação. Desse modo verifica-se que em meios com aeração normal o fotobranqueamento do AM/água é mais intenso e um pouco mais rápido que o do AM/etanol.

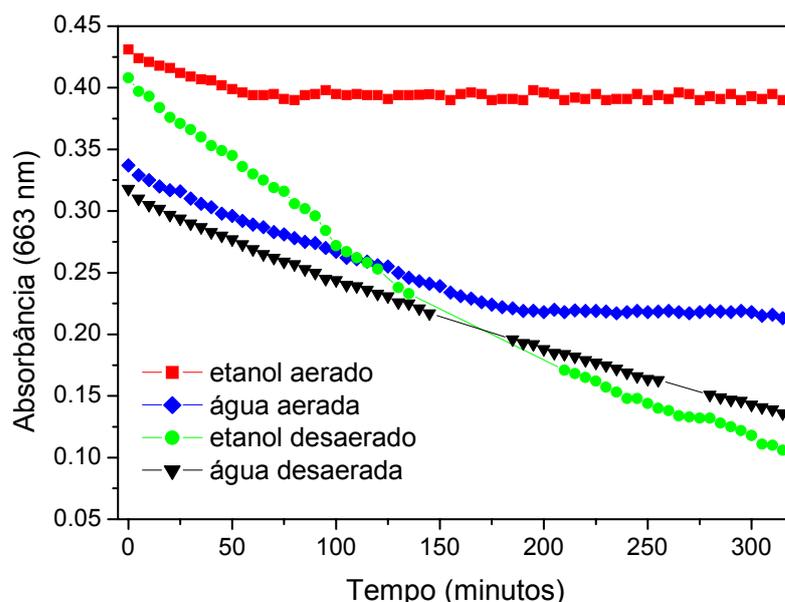


Figura 11: Variação da absorção do azul de metileno ($5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo de exposição ao LED.

Quanto à questão do nível de oxigênio presente nos meios, observa-se maior foto-estabilidade do AM em soluções aeradas nos dois solventes estudados. Na literatura cita-se que o mecanismo de fotobranqueamento do AM em meios aerados ocorre predominantemente via oxigênio singlete (Zhang e Tang, 2004), no entanto, o AM no estado triplete também pode ter sua energia suprimida por colisões com o O_2 normal presente no meio (neste caso sem levar necessariamente a 1O_2) (Valeur, 2001), mecanismo que diminui o fotobranqueamento. A reatividade do oxigênio é dependente da difusão, ou seja, a viscosidade do solvente (água 0,8; etanol 1,04 à 25°C) é importante, e essa supressão de energia do fotossensibilizador pode ocorrer por estes dois caminhos

(Arik e col., 2005): (i) por processo não radiativo ou; (ii) pela geração de oxigênio singlete. Dessa forma a fotodegradação do AM em condições aeradas deve ocorrer via oxigênio singlete, porém ao mesmo tempo, as intensidades de fotobranqueamento menores na presença de oxigênio (estado fundamental, triplete) podem ser justificadas pela supressão de energia realizada pelo próprio oxigênio - choques colisionais (decaimento não radiativo). Adicionalmente, além de na presença de oxigênio o fotobranqueamento ser mais lento, a intensidade deste processo foi menor, principalmente em meio etanólico. As reações em meios de aeração normal foram mais favoráveis em meio aquoso, neste o complexo ativado que leva aos produtos deve ser melhor estabilizado, além do que a viscosidade da água é menor, logo facilita a permeabilidade do oxigênio no meio, conseqüentemente a reação é mais rápida.

Já no experimento de fotobranqueamento sem a presença do oxigênio, o estado excitado do corante não é desativado eficientemente, acarretando em reações fotoquímicas. No caso outros foto-processos podem ocorrer, por exemplo fotopolimerização, formando compostos oligoméricos que não absorvem na região do vermelho.

IV.4. Formação de oxigênio singlete

O ácido úrico (AU), um eficiente captador de oxigênio singlete, apresenta uma banda com máximo de absorção em 293 nm e não absorve na região do visível. Este tem sido usado como um reagente para a determinação quantitativa da ação fotodinâmica de compostos fotossensibilizadores em TFD por via química, nos casos em que a produção de oxigênio singlete está associada ao processo (Fisher e col., 1998). A reação de foto-oxidação do ácido úrico via $^1\text{O}_2$ pode levar à formação de produtos como a triuréia, a alantoxidina, o íon oxanato e CO_2

(Canellakis e Cohen, 1955). O ácido úrico é seletivo e reage com oxigênio singlete e radicais hidroxilas; não reage com peróxido ou ânion superóxido.

Para o cálculo da atividade fotodinâmica química, usou-se como referência a metodologia de Maestrin (2004) com algumas modificações, uma vez que neste trabalho utilizou-se como fonte de luz LEDs, luz policromática, devendo ser considerados os fótons absorvidos pelo corante em todos os comprimentos de onda. Assim estabeleceu-se um parâmetro diretamente relacionado à quantidade de fótons absorvidos pelos FS, através da relação entre luz emitida (LED) e absorvida (FS), denominado de "potência absorvida" (P_{abs}). Essa relação é obtida a partir da combinação do espectro de transmitância do corante (que fornece a luz não absorvida pelo cromóforo em termos percentuais) e o espectro de emissão do LED (em termos de área que corresponde a potência total de luz emitida pela fonte), através dos quais calcula-se a intensidade de luz realmente absorvida pelo corante com este LED. Na figura 12 apresentam-se as intensidades de luz absorvidas pelo azul de metileno para os diferentes sistemas na forma gráfica. A área de cada sistema é proporcional à quantidade de fótons absorvidos pelo FS, permitindo efetuar comparações de forma quantitativa com outros pares FS/LED.

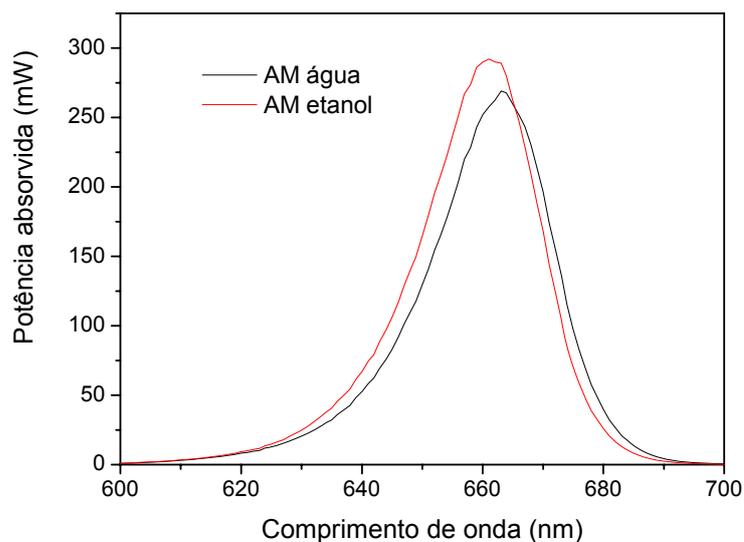


Figura 12: Potência luminosa absorvida por unidade de comprimento de onda do azul de metileno $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ calculado para o LED utilizado.

A área calculada do espectro de emissão do LED (figura 8) esta relacionada a potência total medida (5 mwatts, PowerMeter) enquanto a área do gráfico de potência absorvida (figura 12) é correlacionada a luz realmente absorvida (P_{abs}). Para etanol e água, solventes utilizados nas medidas de atividade, o P_{abs} foi de 2,53 e 2,36 mwatts, respectivamente. Dessa forma a AFQ foi calculada através da equação 1.

A amostra de azul de metileno irradiada na presença de ácido úrico com a fonte vermelha de LED, teve seus espectros de absorção obtidos a tempos de iluminação determinados (figura 13).

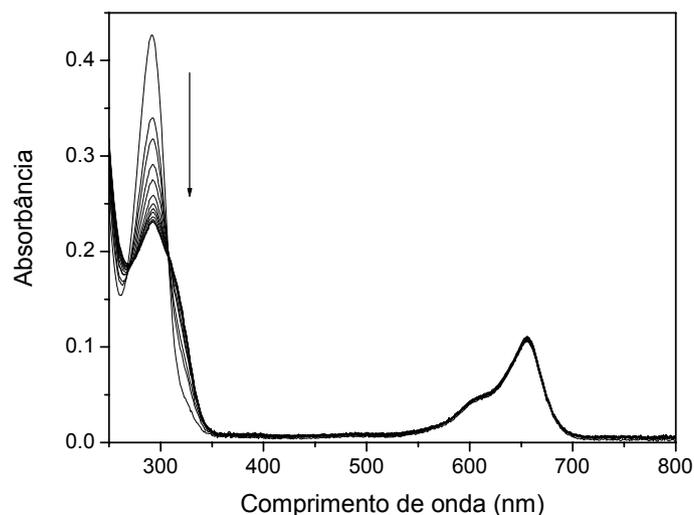


Figura 13: Variação espectral da solução de azul de metileno $1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ na presença de AU ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em etanol, com a irradiação de luz de LED (espectros a cada 3 min). A seta indica a diminuição da banda do ácido úrico

Observa-se na figura 13 o decaimento da banda característica do ácido úrico, em 293 nm, indicando que ocorre a reação de decomposição deste ácido pelo $^1\text{O}_2$ (formado pelo azul de metileno excitado). A queda inicial é mais forte devido à presença de maiores quantidades de oxigênio molecular solubilizado no meio que, por conseguinte, leva a grandes quantidades de oxigênio singlete nesta etapa.

Na tabela 2 apresentam-se os resultados de AF do AM em água e etanol e os dados necessários aos cálculos. Para comparação acrescentou-se os valores de rendimento quântico de oxigênio singlete obtidos da literatura (Zhang e Tang, 2004).

Tabela 2: Valores de AF para o azul de metileno, determinados pela equação 1, teste do ácido úrico (9 J.cm^{-2})

	ΔA_{AU}	t (min)	P_{abs} (mw)	AF	$\phi \text{ } ^1\text{O}_2$
Água	0,694	30	2,36	16,3	0,52
Etanol	0,194	30	2,53	4,3	0,52

ΔA_{AU} : variação da absorbância em 293 nm da solução após o tempo total de irradiação; t: tempo de irradiação; P_{abs} : valor de potência luminosa absorvida pelo FS.

Conforme verificado na tabela 2, a AFQ resultante em água ou etanol tiveram valores iguais e estão coerentes com os valores (também iguais) de rendimentos de oxigênio singlete nesses meios.

Adicionalmente, o resultado da figura 13 (etanol) sugere que no tópico anterior de fotodegradação do AM (realizado na ausência de AU), o processo em meios aerados deve realmente ser causado por oxidação via oxigênio singlete (mecanismo principal). Esta afirmação deve-se ao fato do oxigênio singlete, que reage com o AU, apresentar na figura 13 o AM foto-estável (pico inalterado), enquanto que na ausência de AU ocorre a fotodecomposição do AM. Em água e aeração normal, onde a fotodegradação é mais acentuada que em etanol, a presença de ácido úrico também inibe a decomposição do AM, confirmando os resultados em etanol.

IV.5. Ensaio fotodinâmico com *Artemia salina*

Neste trabalho a adaptação realizada de ensaio com *Artemia Salina* (Meyer, 1982) para investigar a ação fotodinâmica do AM mostrou-se boa. O teste padrão, empregado na determinação da qualidade de águas e na avaliação de atividade tóxica de substâncias, consiste na contagem dos microcrustáceos vivos em tubo após 24 horas de contato com o meio. No caso com AM no escuro - controle, verificou-se a morte total dos animais nesse tempo, assim restringiu-se o contato do AM com os microcrustáceos a duas horas, sendo 1 hora (18 J.cm^{-2}) de irradiação (LED) e a contagem após mais 1 hora. Na figura 14 apresentam-se os resultados obtidos.

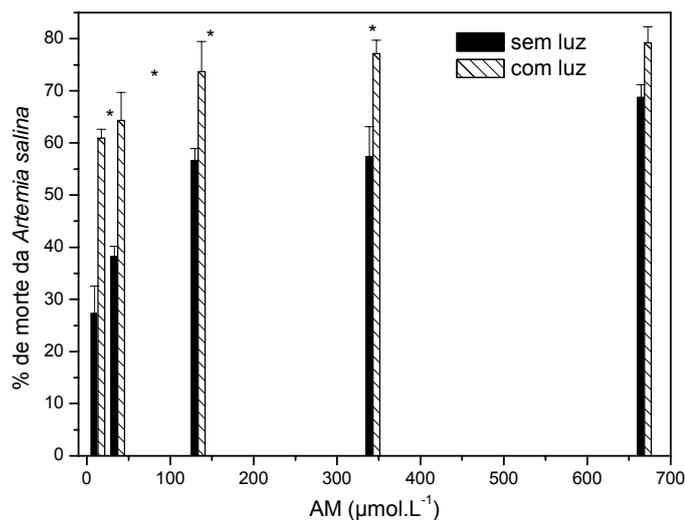


Figura 14: Morte percentual de *Artemia salina* em diferentes concentrações de azul de metileno em água

* significativa em relação ao AM sem iluminação ($P < 0,05$) - teste T de Student

Conforme mencionado anteriormente, na figura 14, mostra-se que o azul de metileno por si só tem ação tóxica para a *Artemia salina* (no escuro), entretanto, a percentagem de morte foi potencializada pela iluminação demonstrando a ação fotodinâmica. Para as amostras com concentração de $13,35 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com o AM a percentagem de morte foi de 27,3% e com o LED aumentou para 61%. Contudo em altas concentrações ($668,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) este efeito foi bem menor, com AM apenas foi de 68,5% a percentagem e morte e com LED 79,3%.

IV.6 Ação fotodinâmica *in vitro* sobre culturas de microrganismos

Os resultados obtidos com os microrganismos *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -) e *Candida albicans* (Fungo), em diversas concentrações do azul de metileno, encontram-se na figura 15.

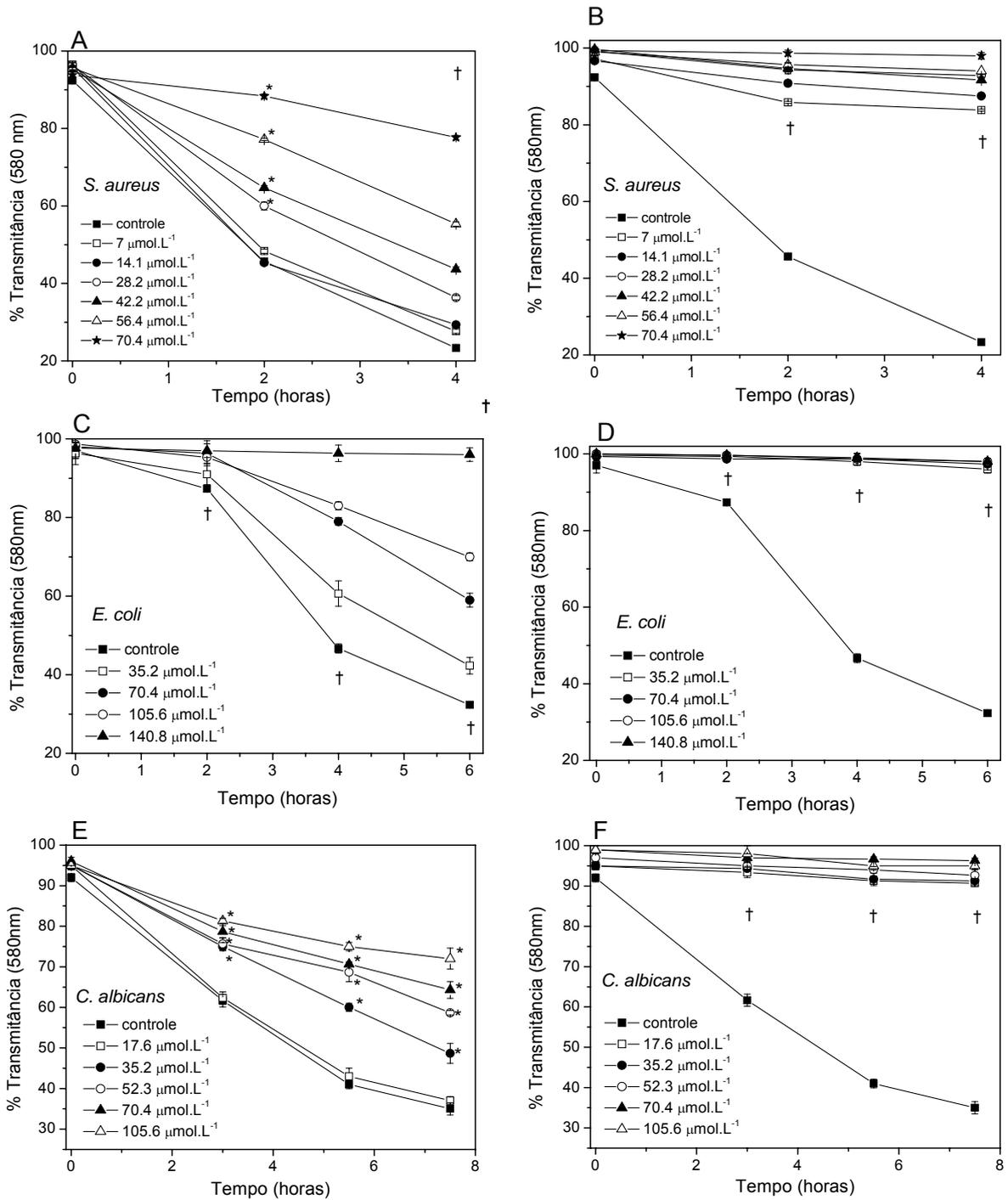


Figura 15: Curva de inibição de crescimento em culturas de microrganismos em diversas concentrações de AM. A, C e E não receberam luz; B, D e F receberam luz por 30 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio das medidas em triplicata.

(*) Significante $p < 0,05$ em relação ao controle

(†) Significante $p < 0,05$ em relação ao controle em todas as concentrações

No caso da figura 15, à medida que a porcentagem de transmitância diminui, implica em aumento de taxa de reprodução do microrganismo (ocorre aumento de espalhamento de luz pela formação de colônias); ou seja, quando a transmitância aumenta, a taxa de inibição do crescimento aumenta.

Para todos os microrganismos não foi observado inibição de crescimento com a exposição a luz LED sozinha. No entanto a presença de AM, mesmo sozinho, inibiu o crescimento das células, sendo este proporcional às concentrações utilizadas de corante; quanto maior a concentração do AM, maior o grau de inibição. Inclusive a concentração necessária para inibição de 50 % dos microrganismos (DB_{50}), obtidos da figura 15 e da tabela 3, foi de $43.35 \pm 6.75 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para *S. aureus*, $56.40 \pm 11.48 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para *E. coli* e $63.20 \pm 11.30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para *C. albicans*. Assim a DB_{50} seguiu aumento na seguinte ordem: *S. aureus* < *E. coli* < *C. albicans*, confirmando, de certa forma, a ordem de suscetibilidade dos três diferentes tipos de células, baseado nas diferenças estruturais da parede celular: as bactérias gram (+), caso da *S. aureus*, tem somente material capsular e a camada peptidoglicanos (parede celular) externamente à membrana citoplasmática (ver figura 5), permitindo o AM de cruzá-lo facilmente (Zeina e col., 2001). Já as bactérias gram (-), tal como a *E. coli*, apesar de apresentarem uma barreira extra (de lipopolissacarídeos - membrana externa, figura 5) comparada as gram (+), o AM também não apresenta dificuldades de interação devido a sua carga positiva, AM^+ , de interagir com as cargas negativas desta membrana lipopolissacarídica (Livermore, 1990). Por último, a penetração solitária de AM em células de *C. albicans* (fungo) parece ser mais difícil, pois estudos realizados com porfirinas catiônicas mostraram que estes podem chegar ao citoplasma somente após danos das membranas que as revestem (no caso induzidos por luz, Lambrechts e col., 2005). Essa ação bacteriostática e fungistática do AM (na ausência de luz) é conhecida (Wainwright e col., 2002; Calzavara-Pinto e col., 2005).

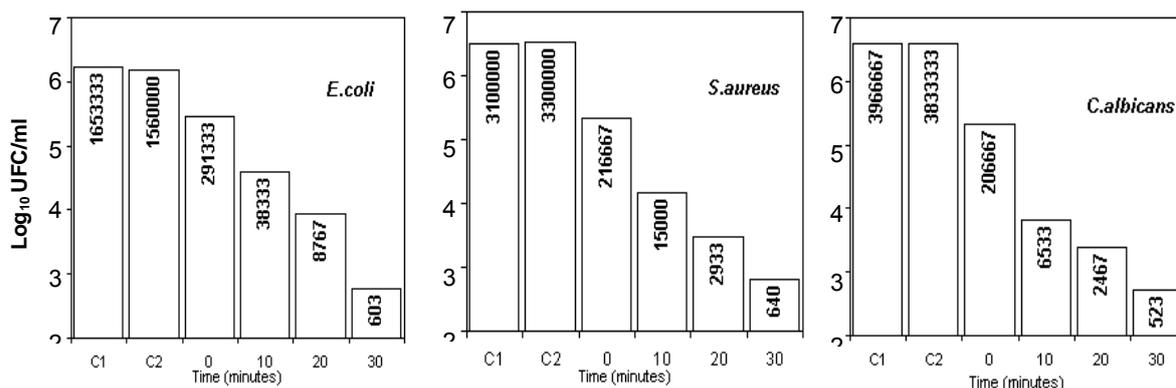
Tabela 3: Porcentagem de inibição do crescimento de microrganismos

<i>Microrganismo</i>		(% inibição)				
<i>S. aureus</i>	[AM]($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	14,1	28,2	42,2	56,4	70,4
	Escuro	7,6	16,5	26,5	41,5	71,2
	LED	83,5	90,8	89,1	92,2	100
<i>E. coli</i>	[AM]($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	-	35,2	70,4	105,6	140,8
	Escuro	-	14,8	39,4	56,6	93,1
	LED	-	94,1	95,6	100	100
<i>C. albicans</i>	[AM]($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	17,6	35,2	52,3	70,4	105,6
	Escuro	7,6	24,3	36,2	46,5	57,8
	LED	78,9	90,2	90,3	95,2	100

Os microrganismos foram irradiados com LED por 30 minutos. A porcentagem de inibição de crescimento foi calculada pela diferença da %T do grupo controle (sem AM) e a %T das diferentes concentrações de AM depois de 4-6 horas de incubação.

De modo geral, o tratamento AM/LED apresenta eficiências bastante altas, mas similares nos três microrganismos, não exibindo diferenças em sua habilidade de inibir bactérias (gram (+ e -)) e fungo. Observe-se que, apesar da menor interação do AM sozinho com *C. albicans*, a luz em conjunto com o AM deve ter induzido danos às membranas externas deste fungo, colaborando com a proposição de Lambrechts e col., 2005.

Adicionalmente foi avaliado o tempo de exposição à luz (dose de energia), submetendo-se as amostras de culturas a tempos de 10, 20 e 30 minutos (2, 4, 6 J.cm^{-2}) de iluminação, calculando a constante de morte (k) e o valor-D. Neste ensaio verifica-se o efeito bactericida e fungicida, ou seja, a morte dos microrganismos. Este resultado é apresentado na figura 16.



	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
r^2	0.9872	0.9800	0.9287
k (h^{-1})	0.2001	0.1911	0.1891
valor-D (minutos)	11.51	12.05	12.18

Figura 16: Decréscimo do número de colônias em função das condições aplicadas. Os grupos C1 e C2, controles, são culturas do microrganismo com e sem exposição ao LED por 30 minutos, respectivamente (sem AM). Nas amostras onde constam tempos (de iluminação) correspondem a culturas com AM ($35,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) submetidas à luz. As taxas de morte (k) são derivadas da curva, considerando do tempo 0 a 30 minutos de exposição e o valor-D é calculado pela redução de 1 ciclo-logarítmico da mesma curva. Cada ponto representa a média das medidas em triplicata.

A figura 16 mostra que os efeitos na morte dos microrganismos seguiram tendência similar a dos efeitos de inibição no crescimento: pela comparação entre C1 e C2, tem-se que a luz LED sozinha não afeta a morte dos microrganismos; o AM sozinha provoca mortandade ($t=0$ min); a exposição do AM à luz provoca aumento da mortandade sendo esta proporcional ao tempo de irradiação; para todos os microrganismos a concentração utilizada $35,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, não foi suficiente para provocar a morte total dentro do tempo máximo utilizado (30 minutos), apesar da mortandade bastante elevada e a resposta AM/LED, representada pela constante de morte e pelo valor-D, é similar para todos os microrganismos.

A investigação do tempo da exposição ao LED indica que o balanço entre a concentração do AM e o tempo da iluminação pode controlar a eficiência da TFD. Para tecidos onde a acumulação do azul de metileno é pobre, o tempo de irradiação deve ser prolongado para permitir eficiência terapêutica similar.

Os resultados com LED em *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* foram tão eficazes quanto os usando LASER (Usacheva e col., 2001; Wilson e Mia 1993) ou a Exal light box (Wainwright e col., 1997). Concentrações de AM de $42\mu\text{mol.L}^{-1}$ irradiadas com LASER de diodo (665nm) com potência de 15 J.cm^{-2} (Usacheva e col., 2001) e AM $0,90\mu\text{mol.L}^{-1}$ exposto a Exal light box com potência de $6,3\text{ J.cm}^{-2}$ levaram a morte de *S. aureus* (Wainwright e col., 1997), entretanto neste experimento, AM nas concentrações de 7 e $14\mu\text{mol.L}^{-1}$ exposto ao LED (potencia de 6 J.cm^{-2}) por 30 minutos obteve 79 e 84% de inibição, respectivamente, para *S. aureus*. Para *E. coli*, AM a $180\mu\text{mol.L}^{-1}$ exposto ao LASER de diodo (665nm) com potencia de 40 J.cm^{-2} (Usacheva e col., 2001) e AM a $90\mu\text{mol.L}^{-1}$ exposto a Exal light box, ($6,3\text{ J.cm}^{-2}$) (Wainwright e col., 1997), levaram a morte total das células. No estudo presente, $35,2\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AM exposto ao LED com intensidade de 2 e 4 J.cm^{-2} levaram a 88,8 e 93,7% de inibição respectivamente, e AM a $70,4\mu\text{mol.L}^{-1}$ com 6 J cm^{-2} induziu 96% de inibição. Experimentos com *C. albicans* a $130\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AM com: (i) LASER light (685 nm) e 28 J.cm^{-2} induziu 88,6% de inibição (Souza e col., 2006) e (ii) LASER light (660 nm) e $2,04\text{ J.cm}^{-2}$ induziu 42 % de inibição (Wilson e Mia 1993). Neste estudo, o LED (6 J.cm^{-2}) com $70,4\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AM induziu 95,14% de inibição.

IV.7 Ensaio *in vitro* sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*

IV.7.1 Sobre a forma promastigota

O efeito da terapia fotodinâmica sobre o crescimento das formas promastigotas (culturas), contendo ou não azul de metileno, tratadas ou não com luz, foi acompanhado durante 10 dias (figura 17).

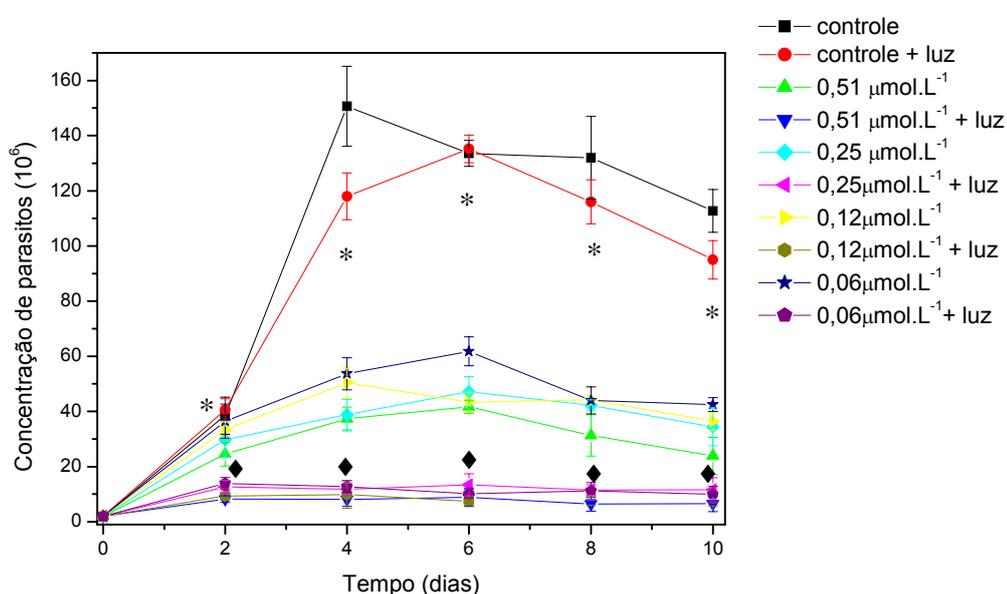


Figura 17: Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em meio 199, a 26°C, tratadas ou não com azul de metileno, com ou sem luz

(*) Não significativa $p > 0,05$ em relação ao controle

(◆) Significante $p < 0,05$ em relação ao controle e as amostra não iluminadas em todas as concentrações

Pela análise estatística (teste T de Student) a luz não influenciou de forma significativa no crescimento do parasito, pois não existe diferença em nenhum dos dias de crescimento analisados ($P > 0,05$). Todas as concentrações de azul de metileno, sem luz, influenciaram o crescimento em todos os dias analisados ($P < 0,05$), exceto no segundo dia nas concentrações mais baixas (0,12 e 0,06 μmol.L⁻¹) e, de modo geral, este efeito é dependente da concentração.

Comparando as amostras tratadas com AM que foram iluminadas com as não iluminadas, em todas as concentrações e em todos os dias, os crescimentos foram significativamente inferiores nas iluminadas ($P < 0,05$). A redução do crescimento do parasito ocorre mesmo nas menores concentrações de AM utilizadas ($0,06\mu\text{mol.L}^{-1}$).

IV.7.2 Sobre formas amastigotas

O efeito do tratamento com AM e luz sobre a infectividade de formas promastigotas para macrófagos peritoneais foi avaliado em 24 e 48 horas, efeito este calculado pelo índice fagocítico (contagem de formas amastigotas na célula - realizadas por microscopia). Os resultados estão apresentados na figura 18.

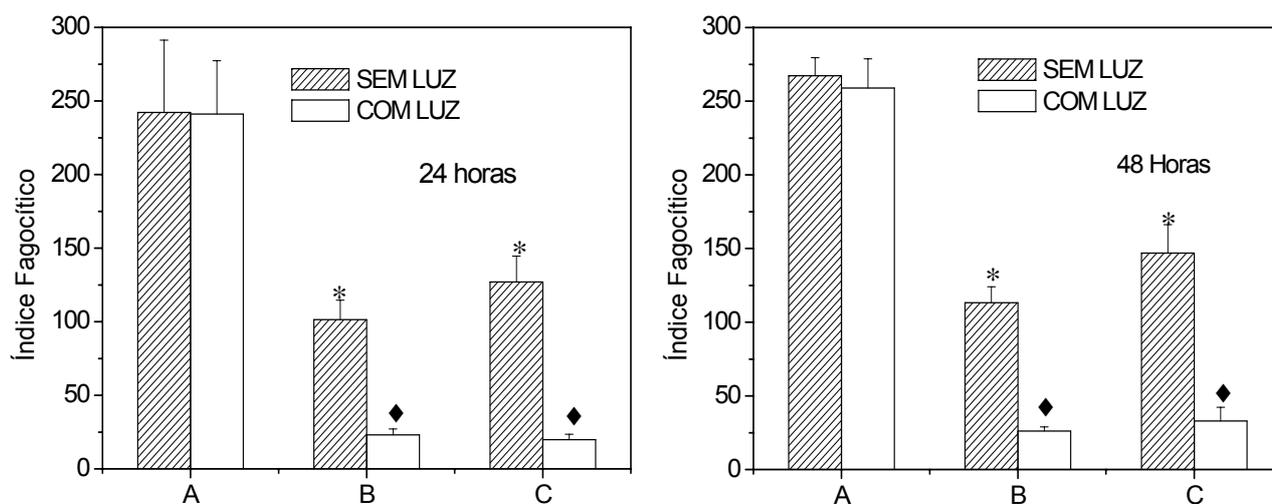


Figura 18: Infectividade de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* para macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Promastigotas foram cultivados sobre monocamadas de macrófagos na proporção 10 parasitos:1 macrófago. As culturas foram tratadas ou não com AM e luz. Os resultados representam os índices fagocíticos após 24 e 48 horas. Os valores referem-se a média do experimento realizado em quadruplicata \pm desvio padrão da média. A: macrófago infectado (controle); B: macrófago infectado e tratado com $0,53\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AM; C: macrófago infectado e tratado com $0,066\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AM. Teste T de Student

(*) Significante $p < 0,05$ em relação ao controle

(♦) Significante $p < 0,05$ em relação ao controle e as amostra não iluminadas

Pode-se observar que a luz por si só não inibiu o índice fagocítico em 24 (P=0,4596) ou em 48 horas (P=0,6088). O azul de metileno sozinho inibe significativamente a infectividade das promastigotas em cultura de macrófago em relação ao controle, nas duas concentrações estudadas (0,53 e 0,066 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), em 24 horas (P=0,0174 e P=0,0233, respectivamente) e em 48 horas (P=0,0009 e P=0,0027, respectivamente). Os percentuais das inibições de infectividade para 0,53 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (sem luz) chegam a 58%, conforme mostrado na tabela 4.

O azul de metileno associado à luz inibiu significativamente a infectividade das promastigotas em cultura de macrófago em relação ao controle, nas duas concentrações de AM estudadas (0,53 e 0,066 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), em 24 horas (P=0,0044 e P=0,0000945, respectivamente) e em 48 horas (P=0,0035 e P=0,00028, respectivamente). Com a luz este efeito na capacidade de inibição da infecção das células é ainda mais acentuado, sendo os percentuais de inibição de 90% em relação ao controle.

Tabela 4: Inibição da infectividade (%) das promastigotas de *L(V) braziliensis* para macrófagos peritoneais de camundongos

Controle versus	24 horas	48 horas
M + L + AM 0,53 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	58,2	57,7
M + L + AM 0,53 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + Luz	90,5	90,3
M + L + AM 0,066 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	47,6	45,1
M + L + AM 0,066 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + Luz	91,8	87,7

M: macrófago; L: *Leishmania*

Desse modo, mostrou-se que a ação fotodinâmica diminuiu a capacidade dos parasitos de infectarem macrófagos, ou seja, em uma futura aplicação da TFD em lesões de leishmania este efeito seria benéfico ao paciente. No intuito de verificar se os macrófagos (infectados ou não com o parasito) permanecem

íntegros com a aplicação de AM e AM/LED, efetuaram-se registros fotográficos de microscopia (figura 19).

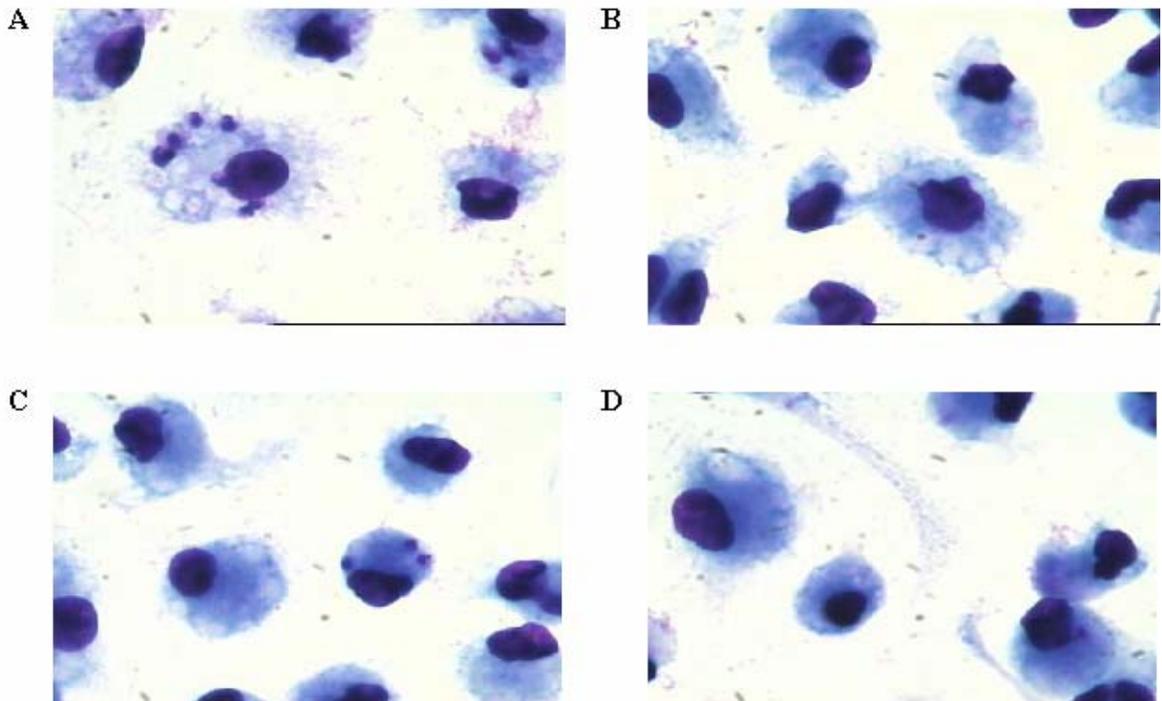


Figura 19: **A** - Macrófago e *Leishmania*; **B** - Macrófago, AM ($0,53 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e Luz; **C** - Macrófago, *Leishmania*, AM ($0,066 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e Luz; **D** - Macrófago, *Leishmania*, AM ($0,53 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e Luz.

Na figura 19A mostra-se a célula (macrófago) podendo-se observar o núcleo (mancha de diâmetro maior), infectada com as amastigotas (manchas de diâmetro menor localizadas próximas à membrana na imagem central). Na Figura 19B (ausência de parasito), 19C e 19D (parasito/AM/LED) mostra-se que o tratamento aparentemente não causou danos às células, ou seja, mantém-se a integridade da membrana sem perda de material celular.

IV.7.3 Óxido nítrico

A proteção do organismo contra uma variedade de agentes envolve, além de outros mecanismos, a produção de óxido nítrico (NO) por diversos tipos

celulares, incluindo os macrófagos ativados (Ignácio et al, 2001). Sendo assim, foi avaliado se o AM e o LED aumentavam em macrófagos elecitados a produção de NO (figura 20).

A figura 20 demonstra que o AM sozinho não aumentou a produção de NO e nas duas concentrações de AM estudadas na presença de luz também não se observou nenhuma diferença significativa.

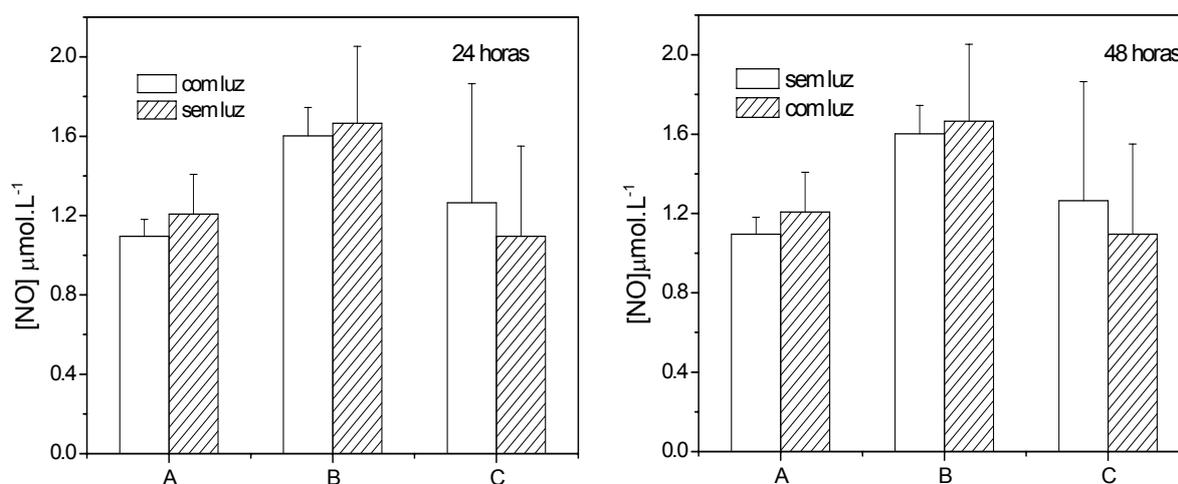


Figura 20: Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L.(V.) braziliensis* e tratados com AM e Luz. A: Macrófago e *Leishmania*; B: Macrófago, *Leishmania* e AM 0,53μmol.L⁻¹; C: Macrófago e AM 0,066μmol.L⁻¹

Como não houve aumento na produção de NO com o tratamento (AM e luz), conclui-se que o AM/LED não atuou como um agente ativador de macrófago. Assim o efeito não é mediado pelo NO.

IV.8 Aplicação da Terapia Fotodinâmica em hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Afim de avaliar o potencial da Terapia Fotodinâmica como um tratamento alternativo para leishmaniose tegumentar americana o estudo foi conduzido em

hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Os animais foram acompanhados semanalmente quanto ao desenvolvimento da lesão. A figura 21 mostra a espessura média das lesões, dos três grupos de animais, expressa como a diferença entre a pata infectada e a pata contralateral não infectada.

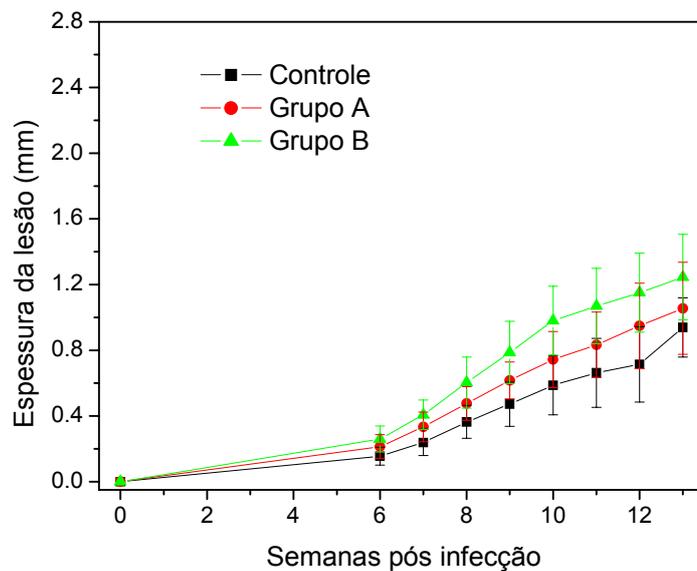


Figura 21: Evolução da infecção avaliada pela espessura da lesão (média \pm desvio padrão) medida pela diferença entre a pata infectada e a pata contralateral não infectada. Os animais foram inoculados na pata com 5×10^6 formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e acompanhados semanalmente. O grupo controle (n=8), o grupo A (n=14) e o grupo B (n=15)

Após todos os animais terem desenvolvido lesão, decorridos cerca de 90 dias, iniciou-se o tratamento. A figura 22 mostra a média da espessura da lesão nas patas infectadas dos três grupos de animais: grupo controle, grupo A (AM 0,5%, m/v em loção) e grupo B (AM 0,5%, m/v em água)), acompanhada durante o tratamento.

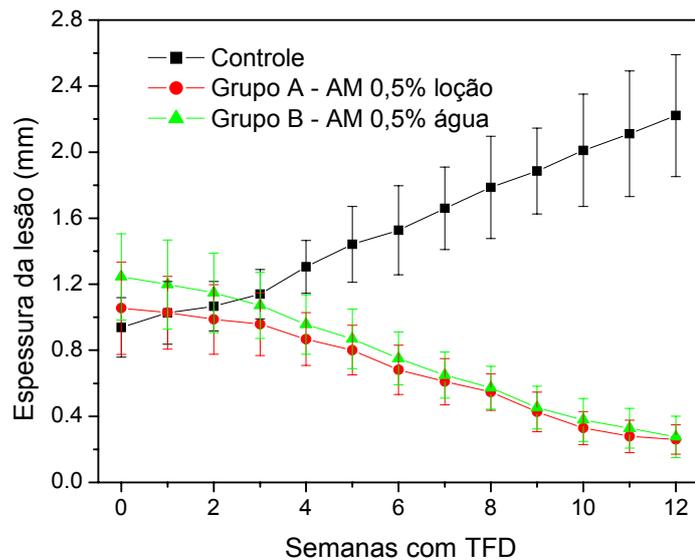


Figura 22: Evolução da infecção avaliada pela espessura da lesão (média \pm desvio padrão). Os animais foram inoculados na pata com 5×10^6 formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e após o desenvolvimento da lesão, foram tratados e acompanhados semanalmente. O grupo controle (n=8) não recebeu tratamento, o grupo A (n=14) foi tratado com AM em loção e o grupo B (n=15) foi tratado com AM em água.

Na figura 22 podemos observar que no grupo controle, o qual recebeu AM mas não luz, a lesão continuou se desenvolvendo, mostrando que a aplicação do corante sozinho aparentemente não afeta o desenvolvimento desta (inclusive não ocorreu mudança no perfil de crescimento das lesões, antes e após aplicação do AM). Contudo nos animais que receberam o tratamento, azul de metileno e luz, a lesão regrediu significativamente ($P=0,000131$ e $P=0,000107$ nos grupos A e B, respectivamente, comparando com o controle). Entre os grupos A e B, formulados em loção e em água, respectivamente, não houve diferenças significativas ($P=0,470357$), o que mostra que mesmo o formulado AM/água permite o contato do corante com o parasito.

Comparando-se os grupos ao final e no início do tratamento, nota-se que houve diferenças significativas nas espessuras dos mesmos, sendo para o grupo A: $P=0,000007$ e grupo B: $P=0,000003$, o que comprova a eficácia do tratamento.

Em relação a característica física da lesão: no seu início verifica-se o desenvolvimento de uma inflamação/nódulo dérmico (lesão edemaciada), onde a epiderme está intacta, apenas com inchaço. Posteriormente ocorre necrose, resultando na desintegração da pele, formando uma ulcera crostosa (lesão crostosa) e, em seqüência e decorrente desta, uma ulcera profunda (lesão ulcerada), (Neves, 2000). Assim o aspecto da lesão na pata dos animais foi avaliado no período do tratamento. A tabela 5 mostra que antes do tratamento apresentavam lesões ulceradas 14,3% e 40% dos animais do grupo A e B, respectivamente. Após 6 semanas de tratamento 13,3% dos animais do grupo B apresentavam lesões ulceradas enquanto que no grupo A foi de 0%. Ao término do tratamento (12 semanas) somente animais que não haviam recebido o tratamento (grupo controle) apresentavam lesões ulceradas, sendo que 40% e 50% dos animais com lesões do grupo A e B, respectivamente, tiveram cicatrização completa.

Tabela 5: Características das lesões dos animais infectados experimentalmente com *L. (L.) amazonensis*, tratados ou não com AM e luz.

	Característica da lesão	Início	6 semanas	Final
Controle (n=8)	Edemaciada	6	5	4
	Crosta	2	2	2
	Ulcerada	0	1	2
	Cicatrizada	0	0	0
Grupo A (n=14)	Edemaciada	9	9	9
	Crosta	3	3	3
	Ulcerada	2	0	0
	Cicatrizada	0	2	2
Grupo B (n=15)	Edemaciada	5	5	5
	Crosta	4	9	5
	Ulcerada	6	0	0
	Cicatrizada	0	1	5

Obviamente na discussão anterior de características físicas há um pouco de subjetividade, inclusive nesta é difícil, em palavras, apontar melhoras de uma lesão uma vez que a mesma pode ter tido boa recuperação do tecido, mas ainda assim apresentar aspectos característicos do tipo da lesão. Para fornecer uma melhor idéia sobre o quadro das lesões e da eficácia do método efetuou-se registros fotográficos de todas as patas durante a aplicação do tratamento.

A figura 23 mostra a pata de dois animais infectados representativos de cada grupo em diferentes períodos de tratamento.

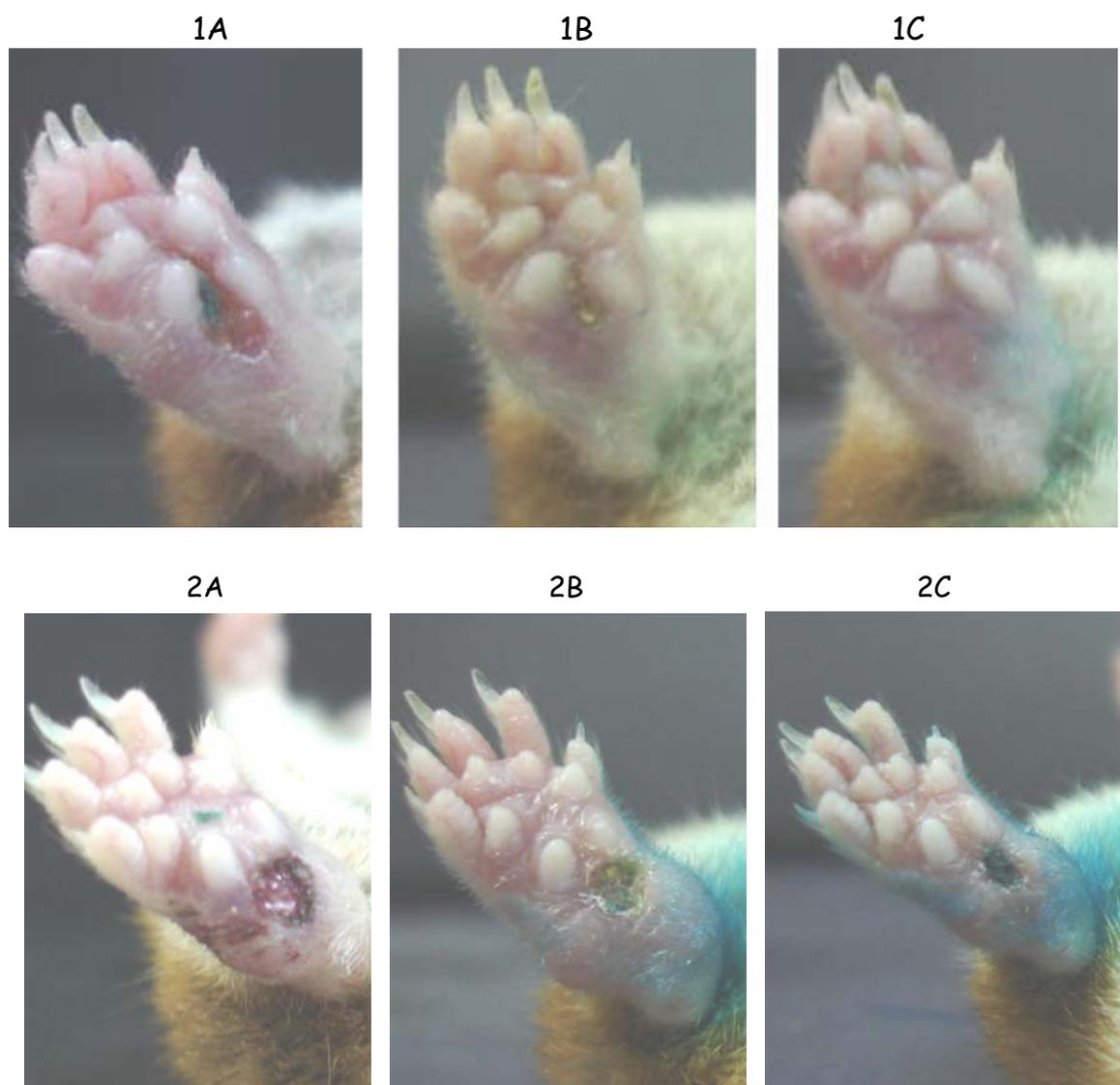


Figura 23: Lesão na pata de hamster inoculada com 5×10^6 promastigotas de *L.(L.) amazonensis*. **A** - antes do tratamento; **B** - 6 semanas com TFD; **C** - 12 semanas de tratamento; **1** tratado com AM em água e **2** tratado com AM em loção

Conforme podemos observar na figura 23-1A, no início tem-se uma lesão ulcerada, que com o tratamento forma uma crosta e depois cicatriza completamente; dessa forma vê-se a reepitelização, regressão e cicatrização da lesão. Segundo o manual de LTA (Ministério da Saúde, 2000) a cicatrização pode ser utilizada como critério de cura da doença em seres humanos. Entretanto na figura 23-2A, tem-se uma lesão ulcerada no início, que melhorou com a TFD, mas mesmo ao final do tratamento ficou uma lesão crostosa.

Para dimensionar a atuação do tratamento avaliou-se o parasito remanescente através da quantificação deste no baço e no linfonodo poplíteo regional à lesão. No primeiro órgão não foram encontradas formas do parasito em nenhum animal, logo não houve disseminação do parasito ao baço tanto em animais tratados e não tratados.

Quanto a análise no linfonodo, no grupo de controle (8 animais) encontrou-se parasitos em 7 animais, ou seja, em apenas 1 não encontrou-se parasitos sugerindo que somente neste a infecção foi controlada pelo sistema imune do animal. No Grupo A (formulado em água), dos 14 animais (houve morte natural de 1 animal antes do início do tratamento) apenas em 2 foram encontrados formas promastigotas no linfonodo. No Grupo B (loção) dos 15 animais que receberam tratamento, em 4 deles foi encontrado o parasito.

Na figura 24 mostra-se o valor médio da carga parasitária encontrado em cada grupo de estudo. Nos animais que não receberam tratamento, a carga parasitária foi significativamente maior, enquanto que nos animais tratados a quantidade remanescente é pequena comparada ao grupo controle, sendo nos grupos A: $P=0,000171$ e B: $P=0,000702$. Em relação às cargas parasitárias dos animais do grupo A e B, não houve diferença estatística entre ambos ($P=0,529224$), sugerindo não haver diferenças de eficiência dos formulados em loção e em água.

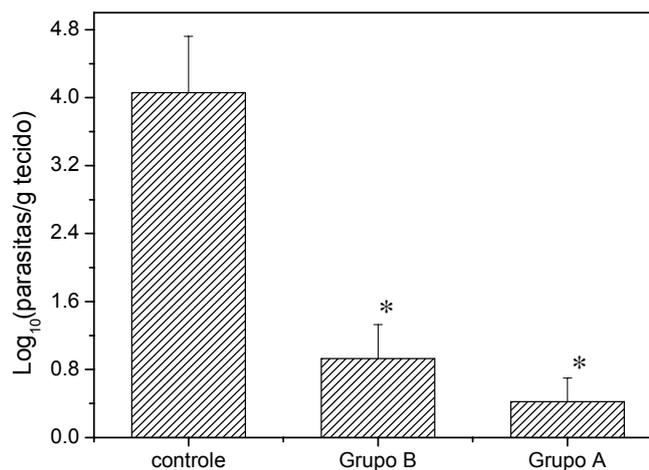


Figura 24: Efeito do tratamento com a TFD sobre o número de parasitas nos linfonodos poplíteos. (*) Significante $P < 0,05$ em relação ao controle - teste T de Student

De todos os animais tratados com a TFD, em 79,3% dos casos não foi detectado o parasito no linfonodo mostrando a eficácia do tratamento, enquanto que apenas em 20,7% apresentaram *Leishmania* residual - não resposta plena ao tratamento. Estes resultados evidenciam a ação fotodinâmica do sistema AM/LED mostrando que a Terapia Fotodinâmica pode ser uma boa alternativa no tratamento de leishmaniose tegumentar americana.

V. CONCLUSÕES

O azul de metileno tem um máximo de absorção na região entre 600 e 800 nm (na janela fototerapêutica para TFD); sofre pouca reação de fotobranqueamento e tem um bom valor de atividade fotodinâmica. O sistema de LED desenvolvido foi altamente conveniente para as aplicações propostas com o corante AM.

Os ensaios com microrganismos mostram efeitos inibitórios de crescimento e de mortandade nas cepas estudadas na presença de azul de metileno, com efeito altamente intensificado pela aplicação de luz, demonstrando que o sistema AM/LED pode ser uma alternativa para o controle de bactérias e fungos (este é um dos enfoques futuros do grupo visando-se instalações de hospitais, indústrias alimentícias e outros). Adicionalmente os ensaios com *Artemia salina* também mostraram efeitos similares aos com microrganismos.

Os resultados *in vitro* obtidos mostram que: o tratamento com AM e luz inibiu o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cultura; reduziu o índice fagocítico de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e não influenciou na produção de NO pelos macrófagos infectados. Os resultados *in vivo* sobre hamster mostram que o sistema AM/LED: reduziu a lesão das patas infectadas com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; reduziu a carga parasitária e aumentou o percentual de cicatrização. Assim o tratamento, aplicado contra leishmaniose, *in vitro* e *in vivo* com a TFD, mostra-se altamente promissor podendo vir a ser uma alternativa no tratamento clínico de pacientes.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKILOV, O.E., KOSAKA, S., O'RIORDAN, K., SONG, X., SHERWOOD, M., FLOTTE, T.J., FOLEY, J.W., HASAN, T.; The Role of Photosensitizer Molecular Charge and Structure on the Efficacy of Photodynamic Therapy against Leishmania Parasites, **Chemistry & Biology**, 13, 839-847, 2006

ANDER, P.; Dependence of molecular weight of polystyrene on initiator concentration - an introductory physical chemistry experiment, **Journal Chemical Education**, 47 (3), 233, 1970

ARIK, M., CELEBI, N., ONGANER, Y.; Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 170 (2), 105-111, 2005

ASILIAN, A., DAVAMI, M.; Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. **Clinical and Experimental Dermatology**, 31, 634-637, 2006

BUFFET, P.A., SULAHIAN, A., GARIN, Y.J.F., NASSAR, N., DEROUIN, F.; Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice, **Antimicrob. Agents Chemother**, 39, 2167, 1995

CALZAVARA-PINTO, P.G., VENTURINI, M., SALA R.; A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin, **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 78, 1-6, 2005

CANELLAKIS, E.S., COHEN, P.P.; On the nature of oxonic acid and allantoxaidin as oxidation products of uric acid and allantoin, **Journal of Biological Chemistry**, 213, 379-384, 1955

CARROLL, W.R., EISENBERG, H.; Narrow molecular weight distribution poly(styrenesulfonic acid) .I. Preparation solution properties and phase separation, **Journal Polymer Science**, A2, 599, 1966

CASTRO, E.A., SOCCOL, V.T., MEMBRIVE, N., LUZ, E.; Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose

tegumentar notificados na região norte do estado do Paraná de 1993 a 1998, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35, 445-452, 2002

DING, A.H., NATHAN, C.F., STUEHR, D.J.; Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production, **J Immunol**, 141, 2407-12, 1988

DUTTA, S., RAY, D., KOLLI, B.K., CHANG, K.P.; Photodynamic Sensitization of *Leishmania amazonensis* in both Extracellular and Intracellular Stages with Aluminum Phthalocyanine Chloride for Photolysis In Vitro, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49 (11), 4474-4484, 2005

FERNANDEZ, J.M., BILGIN, M.D., GROSSWEINER, L.; Singlet oxygen generation by photodynamic agents, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 37, 131-140, 1997

FISHER, F., GRASCHEWB, G., SINN, H.J., BORST, W.M., LORENZ W.J., SCHLAG, P.M.; A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers, **Clinica Chimica Acta**, 274, 89-104, 1998

FLOYD, R.A., SCHNEIDER, J.E., DITTME, D.P; Methylene blue photoinactivation of RNA viruses, **Antiviral Research**, 61, 141-151, 2004

GABRIELLI, D., BELISLE, E., SEVERINO, D., KOWALTOWSKI, A.J., BAPTISTA, M.S.; Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions, **Photochemistry and Photobiology**, 79 (3), 227-232, 2004

GARDLO, K., HORSKA, Z., ENK, C.D., RAUCH, L., MEGAHED, M., RUZICKA, T., FRITSCH, C.; Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy, **J Am Acad Dermatol**, 48, 893-896, 2003

GONTIJO, B., CARVALHO, M.L.R.; Leishmaniose tegumentar americana, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36 (1), 71-80, 2003

HUANG, Q., FU W.L., CHEN B., HUANG J.F., ZHANG X., XUE, Q.; Inactivation of dengue virus by methylene blue/narrow bandwidth light system, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 77, 39-43, 2004

IGNÁCIO, R.N.S., FERREIRA, P.L.J., ALMEIDA, B.M., KUBELKA, F.C.; Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts, **Journal of Ethnopharmacology**, 74, 181-187, 2001

Itri, R.; Coordenadora do *Livro de Resumos do Encontro "PDT 2002. Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações"*, São Pedro, SP, Brasil, 2002

LAMBRECHTS, S.A.G., ALDERS M.C.G., MARLE, J.V; Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin, **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, 49, 2026 - 2034, 2005

LEVY, J.G.; Photodynamic therapy, **Trends in Biotechnology**, 13(1), 14-18, 1995

LIMA, A.P., MINELLI, L., TEODORO, U., COMUNELLO, E.; Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, nos Estado do Paraná, Brasil, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 77, 681-692, 2002

LIVERMORE, D.M.; Antibiotic replace and transport by bacteria, **Scandinavian Journal of Infection Disease - Supplements**, 74, 15 -22, 1990

LIVERMORE, D.M.; Antibiotic resistance in Staphylococci, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 16, 3-10, 2000

MACHADO, A.E.H., Photodynamic Therapy: principles, potential of application and perspectives, **Química Nova**, 23 (2), 237-243, 2000

MANG, T.S.; Lasers and light sources for PDT: past, present and future, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** 1, 43-48, 2004

MANUAL DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia - Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, Brasília 2000

MEYER, B. N., FERRIGINI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E., MCLAUGHLIN, J. L.; Brine Shrimp - a convenient general bioassay for active-plant constituents, **Planta Medica**, 45 (1), 31-34, 1982

NEVES, D.P., 2000. Leishmaniose tegumentar Americana. *Parasitologia Humana* 10° ed, Editora Atheneu, São Paulo, 36-53

O'RIORDAN, K.; AKILOV, O.E.; HASAN, T.; The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2, 247-262, 2005

PERUSSI, J.R.; Inativação fotodinâmica de microrganismos, **Química Nova**, 30 (4), 1-7, 2007

PHOENIX, D.A., SAYED, Z., HUSSAIN, S., HARRIS, F., WAINWRIGHT, M.; The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 39, 17-22, 2003

RATH, S., TRIVELIN L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA D. M., JESÚS M. N., MARZAL P.C.; Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte, **Química Nova**, 26 (4), 550-555, 2003

REY, L. 2001; *Leishmania* e Leishmaníases: Os Parasitos. *Parasitologia*, 3° ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 214-226.

RONSEIN, G.E., MIYAMOTO, S., BECHARA, E., MASCIU, P.D., MARTINEZ, G.R.; Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismo de dano, estratégias para detecção e implicação biológicas, **Química Nova**, 29 (3), 563-568, 2006

SILVEIRA, T.G.V., ARRAES, S.M.A.A., BERTOLINI, D.A., TEODORO, U., LONARDONI, M.V.C., ROBERTO, A.C.B.S., RAMOS, M., SOBRINHO, N.A., ISHIKAWA, E., SHAW, J.J.; Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, sul do Brasil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32, 413-423, 1999

SILVEIRA, T.G.V., TEODORO U., LONARDONI M.V.C., GUILHERME, A.L.F., TOLEDO, M.J.O., RAMOS, M., ARRAES, S.M.A.A., BERTOLINI, D.A., SPINOS, A. R.P., BARBOSA, O.C.; Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas do estado do Paraná, sul do Brasil, **Cadernos de Saúde Pública**, 12, 141-147, 1996

SIMPLICIO, F. I., MAIONCHI, F., HIOKA, N.; Photodynamic therapy: Pharmacological aspects, applications and news from medications development, **Química Nova**, 25 (5), 801-807, 2002

Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica, www.sbcd.org.br/procedimentos consultada em 15/01/2007

STERNBERG, E.D., DOLPHIN, D., Pyrrolic photosensitizers, **Current Medicinal Chemistry**, 3, 293-324, 1996

STERNBERG, E.D., DOLPHIN, D., BRUCKNER C., Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy, **Tetrahedron**, 54, 4151-4202, 1998

TARDIVO, J.P., GIGLIO, A.D., OLIVEIRA, C.S., GABRIELLI, D.S., JUNQUEIRA, H.C., TADA, D.B., SEVERINO, D., TURCHIELLO, R.F., BAPTISTA, M.S.; Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2, 175-191, 2005

TEODORO, U., SILVEIRA, T.G.V., SANTOS, D.R., SANTOS, E.S., SANTOS, A.R., OLIVEIRA, O., KÜHL, J.B.; Frequência da fauna de flebotômíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo - Estado do Paraná - Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, 30, 209-223, 2001

TEICHERT, M.C., JONES, J.W., USACHEVA, M.N., BIEL, M.A.; Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model, **Oral surgery oral medicine oral pathology**, 93, 155-160, 2002

USACHEVA, M.N., TEICHERT, M., BIEL, M.A.; Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and gram-negative microorganisms, **Lasers Surg. Med.**, 29, 165-173, 2001

VALEUR, B. 2001; *Molecular Fluorescence*, Wiley Weinheim

VIEIRA, M.C.F., CARVALHO, T.V., SOUZA, W.; Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma Cruzi*, **Biochemical and Biophysical**, 203 (2), 967-971, 1994

WAINWRIGHT, M.: Methylene blue derivatives — suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 16, 381-394, 2000

WAINWRIGHT, M.: Pathogen inactivation in blood products, **Current Medicinal Chemistry**, 9 (1), 127-143, 2002

WAINWRIGHT, M.: The development of phenothiazinium photosensitisers, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2, 263-272, 2005

WAINWRIGHT, M., GIDDENS, R.M.: Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application, **Dyes and Pigments**, 57, 245-257, 2003

WAINWRIGHT, M., PHOENIX, D.A., MARLAND, J., WAREING, D.R., BOLTON, F.J.: A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series, **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 19, 75-80, 1997

WILSON, M., MIA, N.: Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light, **J. Oral Pathol. Med.**, 22, 354-357, 1993

World Health Organization, www.who.int/tdr/diseases/leish/index.html, consultada em 08/06/2006

ZEINA, B., GREENMAN J., PURCELL, W.N., DAS, B.: Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy, **British Journal of Dermatology**, 144, 274-278, 2001

ZHANG, L.Z., TANG, G.Q.: The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 74, 119-125, 2004