

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP

Eficiência da Ação Fotodinâmica em
Mycobacterium massiliense

DANILO PASTORI ARANTES

São Carlos – SP

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP

Eficiência da Ação Fotodinâmica em
Mycobacterium massiliense

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Danilo Pastori Arantes

Orientador: Prof. Dr. Clovis W. Oliveira de Souza

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

São Carlos – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A662ea Arantes, Danilo Pastori.
Eficiência da ação fotodinâmica em *Mycobacterium
massiliense* / Danilo Pastori Arantes. -- São Carlos :
UFSCar, 2013.
70 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2012.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Micobactérias. 3.
Mycobacterium massiliense. 4. Curcumina. I. Título.

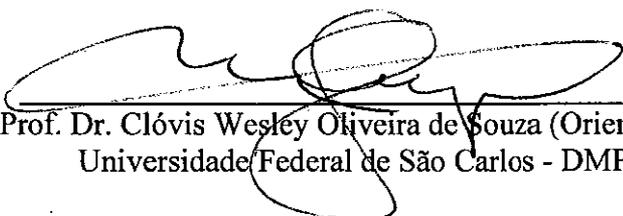
CDD: 660.6 (20ª)

Danilo Pastori Arantes

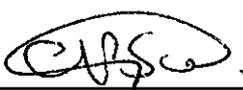
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 30/03/2012

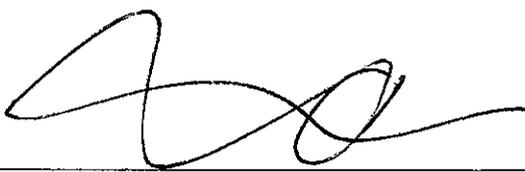
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos - DMP



Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Universidade Federal de São Carlos - DMP



Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli
UNESP

Dedicatória

Aos meus pais, *Claudemir e Regina*
que me propiciaram uma vida digna, onde eu pudesse crescer acreditando
que tudo é possível, desde que sejamos determinados, honestos, íntegros
e com caráter.

Aos meus avós maternos, *Hélio e Deolinda*
que sempre demonstraram amor, afeto e carinho se orgulhando em cada
etapa, em cada conquista minha.

RESUMO

ARANTES, D.P. Eficiência da Ação Fotodinâmica em *Mycobacterium massiliense*. [Dissertação de Mestrado]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar; 2012.

No Brasil houve um crescimento de infecções pós-cirúrgicas por micobactérias de crescimento rápido, principalmente por *Mycobacterium massiliense*, levando a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecer normas de notificação obrigatória dos casos ocorridos em todo território nacional. Tendo em vista de se tratar de um grande problema de saúde pública, o presente trabalho visou determinar a eficiência da atividade antimicrobiana utilizando Inativação Fotodinâmica (IFD) em *Mycobacterium massiliense* para futura utilização no tratamento de infecções por esse agente. O objetivo foi testar *in vitro*, a técnica da IFD no controle de *Mycobacterium massiliense*, para determinar a melhor dose de luz e concentração de cada fotossensibilizador (FS). Para realizar esta pesquisa foram utilizados dois FS: Photogem[®] e Sal de Curcumina (N-Metil-D-Glucominato de Curcumina, a 31,8%). Como fonte de luz para irradiação, uma BioTable[®] operou em 630nm (luz vermelha) para o Photogem[®] e em 460nm (luz azul) para o Sal de Curcumina. Após padronizado o inóculo, a amostra analisada foi adicionada em triplicata a uma placa de 24 poços a qual continha alíquotas de 500µl do inóculo +500µl do FS para os grupos de estudos testados, e o grupo controle contendo 1ml do inóculo, tendo 5 minutos como tempo de incubação (protegido da luz). Após decorrido o tempo de irradiação de acordo com as fluências previamente analisadas dos grupos testados e com posterior diluição da amostra até o valor de 10⁻⁵, 100µl da amostra foram semeadas em triplicata em placas contendo Agar 7H10 + OADC 10% e mantidas a 37° por aproximadamente 5 dias com posterior contagem das unidades formadoras de colônias. Com base nos resultados obtidos, estes mostraram que o FS Photogem[®] até a concentração de 1000µg/ml não foi efetivo na redução do número de UFC de *M. massiliense*. Em contraponto, o FS Sal de Curcumina foi efetivo a partir da concentração de 1300 µg/ml com dose de luz a 50 J/cm² comparado ao grupo controle. Assim, estes dados sugerem que o FS Sal de Curcumina sob ação fotodinâmica é uma alternativa viável para a redução de *M. massiliense* quando testadas *in vitro*.

Palavras-chave: Micobactéria, *Mycobacterium massiliense*, PDT, TDF, Photogem[®], Curcumina.

ABSTRACT

ARANTES, D.P. Efficiency of Photodynamic Action on *Mycobacterium massiliense*. [Dissertation]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar; 2012.

In Brazil there was an increase of post-surgical infections by rapidly growing mycobacteria, mainly *Mycobacterium massiliense*, leading the Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) to establish standards for the mandatory notification of cases occurring nationwide. In order to deal with a major public health problem, this study aimed to determine the efficiency of using antimicrobial photodynamic inactivation (PDIa) in *Mycobacterium massiliense* for future use in the treatment of agent infections. The objective was to test in vitro technique the PDI to control *Mycobacterium massiliense* to determine the best light dose and concentration of each photosensitizer (FS). To accomplish this search were used two FS: Photogem[®] and salt Curcumin (N-Methyl-D-Glucominato of Curcumin, 31.8%). As a light source for radiating a BioTable[®] operated at 630nm (red light) for Photogem[®] and 460nm (blue light) to the salt of curcumin. After the standardized inoculum was added to the sample analyzed in triplicate to a 24 well plate which contained 500µl aliquots of the inoculum +500 µl of the FS for the study groups tested, and the control group containing 1 ml of inoculum, and five minutes as time incubation (protected from light). After expiration of the irradiation time in accordance with the previously analyzed fluences of the tested groups and subsequent dilution of the sample to the value of 10⁻⁵, 100mL sample were plated in triplicate on 7H10 agar + OADC 10% and maintained at 37 for about 5 days with subsequent counting of colony forming units. Based on the results, they showed that FS Photogem[®] until the concentration of 1000 µg/MI was not effective in reducing the number of CFU of *M. massiliense*. In contrast, the FS Salt Curcumin was effective at concentrations of 1300 µg/MI with a light dose 50 J/cm² compared to controls. Thus, these data suggest that the salt FS Curcumin in photodynamic action is a viable alternative for reducing *M massiliense* when tested *in vitro*.

Keywords: Mycobacterium, *Mycobacterium massiliense*, PDT, Photogem[®], Curcumin.

AGRADECIMENTOS

É muito satisfatório passar por uma jornada desta e ter tanto a agradecer, e a tantos querer homenagear. É muito bom dizer obrigado, mesmo que isso me pareça tão pequeno, a tanta gente que neste período, em que se é acometido de tantos surtos de tristeza, incertezas, incapacidade, euforia, cansaço e alegrias, conseguiram se manter simplesmente presente.

Agradeço a Deus, por todas as dificuldades, todas as falhas, noites de desespero, solidão e vontade de desistir, pois sem elas, eu não estaria dando o verdadeiro valor a este trabalho. Agradeço pela conquista, pela sempre presença em minha vida e pela sabedoria para conseguir chegar até aqui com dignidade e integridade.

“Não importa saber se a gente acredita em Deus: o importante é saber se Deus acredita na gente (Mário Quintana)”.

Aos meus pais Claudemir e Regina e meu irmão Bruno, que tornaram tudo isso possível, pois sem as orações, ajuda e confiança recebida, nada teria sido concluído. Obrigado pela compreensão das minhas angústias. Vocês são o espelho que eu quero poder olhar e me ver refletido, pois são meu grande exemplo de vida, honestidade e respeito.

Agradeço a Prof^a Dr^a Fernanda de Freitas Anibal, a primeira responsável por tudo. Obrigado pela receptividade quando cheguei na UFSCar pela primeira vez, pela ajuda em me apresentar ao Prof^o Clovis e por toda a torcida e considerações, sempre tão importantes, no meu exame de qualificação do mestrado. Obrigado pelo carinho, amizade e doçura. Obrigado por me agregar!

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Clovis W. O. de Souza, o meu mais que muito obrigado. Obrigado pela aceitação em me orientar. Foram pouco mais de dois anos de trabalho e confusões, mas a tua paciência, sinceridade e cuidado me mostraram que tudo tem a sua hora e que só depende de nós para crescermos. Obrigado por abrir as portas do seu laboratório, da sua sala, sem mesmo me conhecer muito bem e dedicar estar comigo neste trabalho, procurando sempre aprender junto comigo. Que Deus te abençoe sempre.

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Vanderlei Salvador Bagnato os meus sinceros agradecimentos por toda força, pelo apoio técnico, pela bolsa, mas principalmente, por ter aceito me orientar no primeiro e-mail enviado e me mostrar o que realmente é e como fazer pesquisa. O senhor é mais que um professor, é uma pessoa disposta a ajudar em qualquer horário e em qualquer situação. Obrigado por ter sido quem foi pra mim.

Agradeço aos amigos que encontrei em São Carlos e estiveram ao meu lado para tudo. Joice, Sandra, Lais, Débora, Naiara, vocês serão sempre minhas grandes companheiras. Cada uma no seu jeito, cada uma com o seu olhar. Eu vou levar um pouco de cada uma de vocês para aonde quer que eu vá. Ajudas, confissões, confusões, risadas, festas, baladas, churrascos, jantas, sempre estarão guardados na minha memória, afinal, conviver com vocês foi muito especial. À Joice um agradecimento especial: obrigado pelos momentos felizes quando quase acabamos com todo o sorvete da cidade!

Aos amigos distantes que sempre, sempre irão estar no meu coração: Tallita Yano, Daia Gallo, Daia Bulgarelli, Débora Fadoni, LigiaVianna e Natália Strohmayr que mesmo distante, estavam sempre tão perto. A amizade de vocês é essencial para mim.

Os meus agradecimentos ao pessoal do DMP (Departamento de Morfologia e Parasitologia) da UFSCar pelo carinho e amizade, sempre. Em especial, gostaria de agradecer a secretária Cidinha, pela paciência em ajudar sempre que preciso e pelo sorriso de todo dia. A técnica Ivete pela colaboração e presença em grande parte dos meus experimentos, sendo me ajudando na leitura do espectrofotômetro, sendo no mão-na-massa dos experimentos. O meu muito obrigado.

Agradeço também especialmente a Mariana Carreira na ajuda em todos os experimentos. Não tinha dia nem hora, você esteve sempre presente com bom humor e disposição para me ajudar. Sua ajuda e amizade foram essenciais na concretização deste trabalho.

As pessoas do IFSC – USP que colaboraram para realização deste, o meu muito obrigado. Agradeço em especial a secretária Isabel, pela sempre paciência em me atender e me ajudar, ao Dr^o Denis Pablo Jacomassi pelo tempo e ajuda na realização dos gráficos iniciais e a Dr^a Carla Raquel Fontana, pela disposição e interesse em me ajudar,

pelo carinho e amizade que me fizeram sentir mais “em casa” quando na USP. Muito obrigado.

Ao Paulo Juliano (Julio), quero agradecer por todo inicio no mestrado. Pelo apoio na escolha, pela ajuda em encontrar minha casa, pela ajuda nos estudos, por me ajudar a escrever o projeto para bolsa em pouco mais de 24h, pelos gráficos, planilhas... Obrigado por toda ajuda, pela presença, pelas lições de vida e principalmente, pelo Téo.

A você, Cris Rozzini, obrigado por tudo! Pela extrema paciência, pelos cuidados, pela vontade e interesse em ajudar sempre, pelas palavras de apoio, de conforto. Obrigado por me mostrar um mundo diferente, onde as pessoas valem a pena, o amor à profissão é a verdadeira chave para o sucesso, o amor e pensamento na família são a base da nossa vida. Faço votos para que esteja sempre presente me ajudando a crescer e a viver a vida.

Ao CNPq, os meus agradecimentos sinceros pela bolsa recebida.

Para não me esquecer de ninguém nesta jornada que envolve tantas pessoas e que todas se tornam tão especiais, quero agradecer a VOCÊ, que direta ou indiretamente, colaborou na execução deste trabalho.

...conhecimento é poder,
e o conhecimento *certo* permite ao homem realizar tarefas milagrosas, quase divinas.
Sato tornou a baixar os olhos para Langdon e esfregou o pescoço.
- Instalar um cabo telefônico é algo muito diferente de ser um deus.
- Para os homens *modernos*, pode até ser – retrucou Langdon. – Mas, se George Washington soubesse que nós viramos uma raça com o poder de nos comunicar através dos oceanos, voar à velocidade da luz e pisar na Lua, ele iria supor que nós nos transformamos em deuses, capazes de tarefas milagrosas. – Ele fez uma pausa. – Nas palavras do futurista Arthur C. Clarke:
“Qualquer tecnologia suficientemente avançada é indistinguível da magia”.

Dan Brown – O Símbolo Perdido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1. <i>Mycobacterium</i> spp.	04
3.2. <i>Mycobacterium massiliense</i>	09
3.2.1. Infecções Envolvendo <i>Mycobacterium massiliense</i>	11
3.3. Terapia Fotodinâmica.....	12
3.3.1. Uso da Terapia Fotodinâmica como Agente Antimicrobiano..	15
3.4. Sistema de Irradiação – Fontes de Luz para TFD.....	18
3.5. Fotossensibilizador.....	18
3.5.1. Photogem®	21
3.5.1.1. Photogem® e seus usos na TFD e IFD.....	23
3.5.2. Sal de Curcumina.....	24
3.5.1.2. Curcumina: suas atividades farmacológicas e seus usos na TFD e IFD.....	27
3.6. Estudo de TFD/IFD em Micobactérias.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Amostra Bacteriana.....	35
4.2. Agente Fotossensibilizador.....	35
4.3. Escolha do Diluente.....	37
4.4. Fonte de Luz.....	37
4.5. Preparo do Inóculo de <i>Mycobacterium massiliense</i>	38

4.6. Processamento Experimental da IFD.....	39
4.6. Análise dos Resultados.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Photogem®.....	44
5.2. Sal de Curcumina.....	46
5.3. Resultados Analisados Segundo o Modelo Matemático Proposto por GIUSTI <i>et al.</i> , 2008.....	50
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS.....	60
9. ANEXO.....	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01. Representativo das diferenças estruturais da parede de bactérias (a) Gram(+), (b) Gram (-) e (c) Micobactéria (bactéria álcool-ácido resistente) (Adaptado, BLACK, 2008).

FIGURA 02. Estrutura detalhada da parede celular das micobactérias (BROOKS, *et al*, 2001).

FIGURA 03. Principais fotossensibilizadores utilizados na TFD.

FIGURA 04. Estrutura do monomérica do FS Photogem[®].

FIGURA 05. Espectro de absorção do Photogem[®] com detalhamento para a banda de absorção entre 370 nm e entre 500 e 700 nm (BONINI, 2006).

FIGURA 06. (a) ilustração das folhas, flor e rizoma da *Curcuma longa L.*, (b) detalhe do rizoma onde apresenta coloração acinzentada e internamente mostram uma superfície vermelho-alaranjada, (c) detalhe do pó da *Curcuma Longa L.* a partir do rizoma.

FIGURA 07. Estrutura da Curcumina e seus derivados (SASIKUMAR, 2005).

FIGURA 08. Espectro de absorção do Sal de CurcuminA (REGO *et al.*, 2011).

FIGURA 09. Detalhes da BioTable[®], mesa iluminada desenvolvida por pesquisadores da USP - IFSC.

FIGURA 10. Gráfico da curva de crescimento demonstrando a relação absorbância x tempo, para avaliar a densidade óptica do microrganismo analisado.

FIGURA 11. Curva da relação entre três diluentes para escolha do ideal frente à transmitância dos mesmos, como representativo da padronização para o procedimento experimental.

FIGURA 12. Avaliação do aumento da temperatura (°C) em relação ao tempo sobre Caldo 7H9 com duas potências de luz – 50 e 100 mW, para escolha do melhor diluente.

FIGURA 13. Avaliação do aumento da temperatura (°C) em relação ao tempo sobre PBS + Tween 80 com duas potências de luz – 50 e 100 mW, para escolha do melhor diluente.

FIGURA 14. Porcentagem de sobrevivência de *Mycobacterium massiliense* sob ação das diferentes concentrações do fotossensibilizador Photogem[®] em função das diferentes doses de luz (J/cm²) administradas no procedimento experimental.

FIGURA 15. Representação da *Dark Toxicity* – ausência de luz e presença da droga fotossensibilizadora, Photogem[®], em todas as concentrações testadas. Letras diferentes representam diferença estatística de $p < 0,05$ através do Teste de Tukey.

FIGURA 16. Gráfico representando os grupos controle (L-D-) e (L+D-) associado as doses de luz (J/cm^2) com diferentes concentrações de droga ($\mu g/ml$) aplicadas em *M. massiliense*. Letras diferentes representam diferença estatística de $p < 0,05$ através do Teste de Tukey.

FIGURA 17. Porcentagem de sobrevivência de *Mycobacterium massiliense* sob ação da IFD com FS Sal de Curcumina nas concentrações de 300 e 750 $\mu g/ml$ em função das doses de luz 0, 20 e 40 J/cm^2 administradas no procedimento experimental.

FIGURA 18. Porcentagem de sobrevivência de *Mycobacterium massiliense* sob ação de nas concentrações de 500, 1000, 1300, 1400 e 1500 $\mu g/ml$ do fotossensibilizador Sal de Curcumina em função das diferentes doses de luz 0, 20, 40, 50, 75 e 100 J/cm^2 administradas no procedimento experimental.

FIGURA 19. Gráfico representando os grupos controle (L-D-) e (L+D-) associado as doses de luz (J/cm^2) com diferentes concentrações de droga ($\mu g/ml$) aplicadas em *M. massiliense*. Letras diferentes representam diferença estatística de $p < 0,05$ através do Teste de Tukey.

FIGURA 20. Representação *Dark Toxicity* – ausência de luz e presença da droga fotossensibilizadora, Sal de Curcumina, em todas as concentrações testadas.

FIGURA 21. Gráfico com as letras maiúsculas com todas doses de luz e drogas. Diferentes letras (maiúsculas) apresentam diferenças significativas $p < 0,05$ pelo teste de TUKEY após ANOVA 2WAY.

FIGURA 22. Porcentagem de sobrevivência de *M. massiliense* em relação a concentração de Photogem[®] apresentando os valores médios e desvio padrão dos dados experimentais e a curva de ajustada (FIT) pela equação $SF = 1/(1+C/4602,35)$

FIGURA 23. Porcentagem de sobrevivência de *M. massiliense* em relação a concentração de Sal de curcumina apresentando os valores médios e desvio padrão dos dados experimentais e a curva de ajustada (FIT) pela equação $SF = 1/(1+C/1562,94)$

FIGURA 24. Curvas teóricas da Porcentagem de sobrevivência de *M. massiliense* em relação a concentração de Photogem[®] e a dose de luz (IFD) ajustadas pela equação $SF = 1/[1+C/4602,35 \times (1+D/12,58)]$

FIGURA 25. Curvas teóricas da Porcentagem de sobrevivência de *M. massiliense* em relação a concentração de Sal de curcumina e a dose de luz (IFD) ajustadas pela equação $SF = 1/[1+C/1562,94 \times (1+D/0,67)]$.

FIGURA 26. Valores de C_o e D_o calculados pelo ajuste dos dados experimentais.

LISTA DE ABREVIATURAS

MCR	Micobactéria de Crescimento Rápido;
MCL	Micobactéria de Crescimento Lento;
TFD	Terapia Fotodinâmica;
PDT	Terapia Fotodinâmica (do inglês, <i>Photodynamic Therapy</i>);
IFD	Inativação Fotodinâmica;
FS	Fotossensibilizador;
Hp	Hematoporfirina;
HpD	Derivado de Hematoporfirina (do inglês, <i>Derivative of HematoPorfirin</i>);
PBS	Solução Fosfato Tamponada (do inglês, <i>Phosphate Buffer Solution</i>);
TSB	Caldo Trípico de Soja (do inglês, <i>Tryptic Soy Broth</i>);
LJ	Meio de Cultura Löwenstein Jensen;
UFC	Unidade Formadora de Colônia;
LED	Luz Emissora de Diodo (do inglês, <i>Light Emitting Diodes</i>);
RGB	Red Green Blue - referente a um tipo específico de lâmpadas LED;
SF	Fator de Sobrevivência (do inglês, <i>Survival Factor</i>);
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado;
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado;
°C	Graus Celsius;
UA	Unidade de absorbância;
nm	Nanômetro;
µl	Microlitro;

ml Mililitro;

L Litro;

mg Miligrama.

1. INTRODUÇÃO

As micobactérias não tuberculosas são ubiqüitárias no meio ambiente e em determinadas ocasiões podem ocasionar infecções no homem. Em vários estudos na área hospitalar muita atenção tem sido dada aos grupos de micobactérias de crescimento lento. Entretanto, a contaminação de equipamentos hospitalares e medicamentos, rastreados para a presença desses microrganismos na água da torneira e sua resistência aos desinfetantes comumente utilizados, foi responsável por surtos em infecções pós-cirúrgicas. Publicações recentes indicam um número crescente de infecções secundárias em ambientes e estabelecimentos de saúde, onde infecções em pacientes pós-cirúrgicos submetidos a cirurgias vídeo-assistidas, cirurgias plásticas, septicemia associada à assistência médica e doença pulmonar após broncoscopia, foram ocasionadas por micobactérias de crescimento rápido (*M. abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum* e *M. fortuitum*) o que demonstra a importância desses organismos como causas de infecções (ADÉKAMBI *et al*, 2006; CARDOSO *et al*, 2008; WILLIAMS *et al*, 2009; DUARTE *et al*, 2009).

A dificuldade de diagnóstico e aparecimento de resistência antimicrobiana nesse grupo de bactéria tem sido um dos principais problemas no tratamento de tais infecções (O'RIORDAN *et al*, 2007).

Devido ao aumento no número de casos de infecções causadas por micobactérias, tornou-se cada vez mais importante a realização de diagnósticos rápidos e precisos levando assim, a procura de novas técnicas, viáveis para o controle desses microrganismos (OPLUSTIL *et al*, 2004).

Um dos mais novos avanços no tratamento de diferentes patologias de origem microbiana, viral, fúngica e inflamatória é a aplicação da Terapia Fotodinâmica (TFD) como atividade antimicrobiana (WAINWRIGHT, 1998; GAD *et al*, 2004).

A técnica de TFD consiste na utilização de uma luz ativando um corante (fotossensibilizador) para obter um efeito citotóxico. Fotossensibilizadores (FS) são veículos da TFD que permitem a transferência de energia luminosa para gerar produtos reativos que causam citotoxicidade, com conseqüente destruição do alvo, tendo a habilidade de se acumularem nos tecidos alvos, de forma mais ou menos específica. É

uma substância que induz sensibilidade luminosa a processos químicos e/ou físicos, normalmente insensíveis a luz (SIBATA *et al.*, 2001; ALISSON *et al.*, 2004).

O efeito da ação fotodinâmica parece ser um efeito único em bactérias nas quais os alvos, nas células, são igualmente susceptíveis, isto é, se uma única estrutura é danificada, a morte celular pode ocorrer (O'RIORDAN *et al.*, 2007; PERUSSI, 2008).

Os resultados utilizando a técnica de TFD são encorajadores uma vez que o método conduz a grandes reduções nas populações bacterianas. (CALIN, 2009)

Uma das vantagens da utilização da ação fotodinâmica antimicrobiana é que a morte das bactérias pode ser controlada restringindo-se a região irradiada. Assim evita-se a destruição microbiana em outros locais e o desenvolvimento de resistência seria improvável. Outra importante vantagem da técnica é o fato de que ela pode ser aplicada inúmeras vezes, com pouco efeito colateral, e sem causar as famosas reações sistêmicas a certos tipos de drogas. (BAGNATO, 2007)

No Brasil, a partir de 2004 houve um crescimento de infecções pós cirúrgicas por micobactérias de crescimento rápido, principalmente por *Mycobacterium massiliense*, levando a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecer normas de notificação obrigatória dos casos ocorridos em todo território nacional. Tendo em vista de se tratar de um grande problema de saúde pública o presente trabalho visa determinar a eficiência da Terapia Fotodinâmica em *Mycobacterium massiliense*, para futura utilização no tratamento de infecções por esse agente. (BRASIL, 2008)

2. OBJETIVOS

Dentro do contexto para o controle da bactéria em questão, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência da técnica IFD no controle de *Mycobacterium massiliense*, utilizando Photogem[®] e o Sal de Curcumina, separadamente, como fotossensibilizadores, avaliando, portanto, a melhor dose de luz e concentração das drogas analisadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 *Mycobacterium* spp

As micobactérias pertencem a ordem *Actinomycetales* e a família *Mycobacteriaceae*, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium* (*fungus bacterium*), nome proposto por Lehmann e Neumann em 1896, em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos que era similar a produzida por alguns fungos (GRANGE, 1990).

Um dos estudos clínicos bacterianos mais importantes e intensivos, é inegavelmente sobre o gênero *Mycobacterium*. O interesse clínico em micobactéria começou em 1882, com os trabalhos de Heinrich Hermann Robert Koch, quem detectou o bacilo da tuberculose (Bacilo de Koch) em tecido infectado animal e cultivou o organismo em meio de soro espesso (GANGADHARAM; JENKINS, 1998).

As micobactérias são bactérias com características Gram-positivas, aeróbicas obrigatórias (necessitam da presença de oxigênio molecular para o seu crescimento) onde o aumento da tensão de CO₂ intensifica o crescimento. Apresentam-se em forma de bastonete (bacilos na forma de células retas e finas), medindo cerca de 0.4 a 3 µm, não formam esporos (estrutura desidratada de múltiplas camadas que protege a bactéria, permitindo que ela permaneça num estado de “vida suspensa”), são imóveis e com a característica de crescimento em agregados. Sua parede celular é rica em lipídios, tornando a superfície hidrofóbica e as micobactérias resistentes a numerosos desinfetantes, bem como às colorações laboratoriais comuns. Como não são facilmente coradas por métodos comuns (como pelo método de coloração de Gram), resistindo à descoloração por ácido-álcool (álcool etílico a 95% contendo 3% de ácido clorídrico), são denominadas bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) onde a técnica de Ziehl-Neelsen de coloração é empregada para identificação desse grupo. Devido à complexidade da parede celular e às exigências desse grupo de microrganismos, a maioria cresce lentamente, dividindo-se a cada 12 a 24 horas. (BROOKS, *et al*, 2001; MURRAY *et al*, 2000; e http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/bacterias.htm; Acesso em 28 de Abril de 2010, às 15:30h).

A figura 01, demonstra a comparação da estrutura da parede celular de uma micobactéria (c) , com paredes de bactérias Gram(+) e Gram(-).

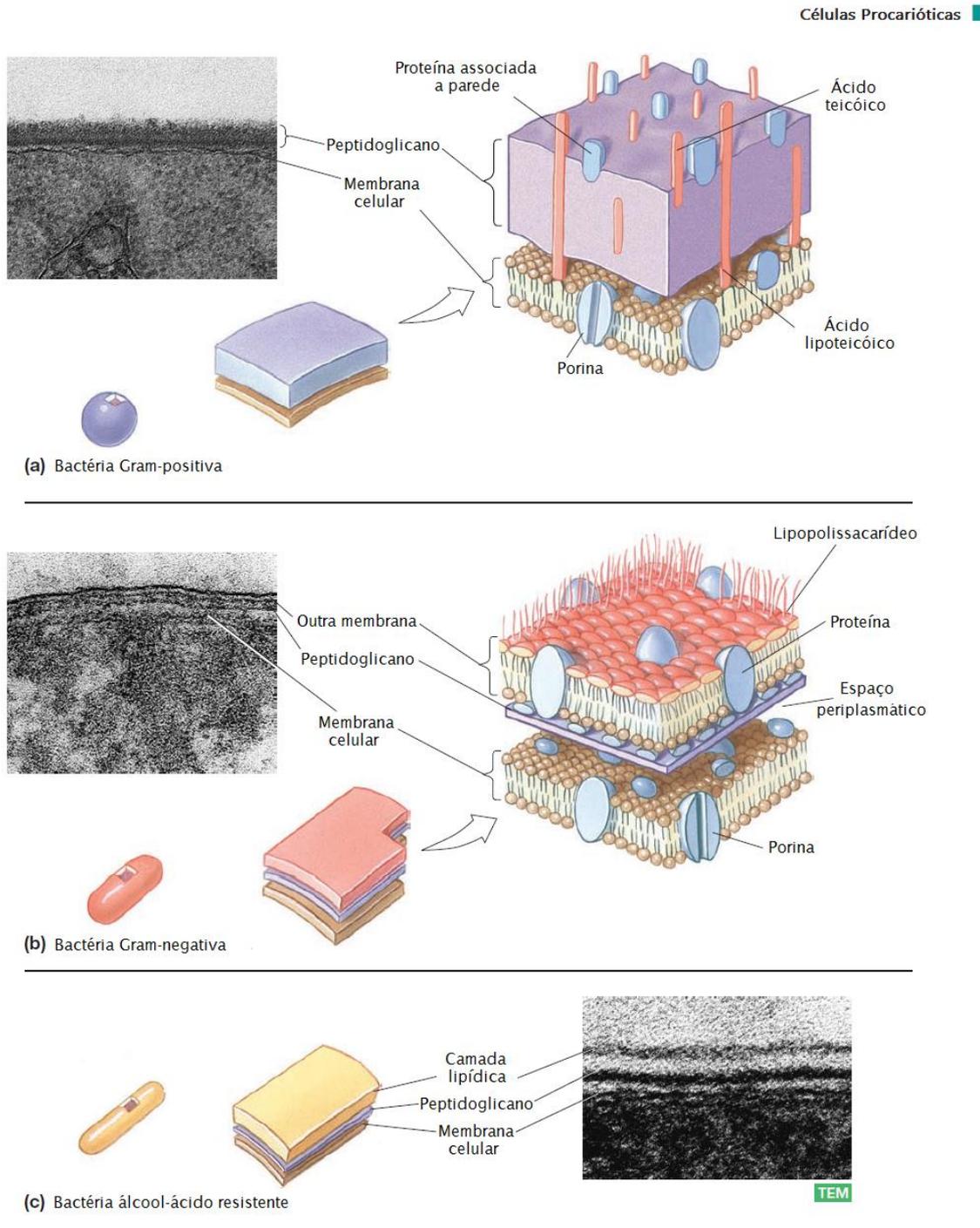


Figura 1. Representativo das diferenças estruturais da parede de bactérias (a) Gram(+), (b) Gram (-) e (c) Micobactéria (bactéria álcool-ácido resistente) (Adaptado, BLACK, 2008).

As micobactérias são classificadas dentro do gênero *Mycobacterium* com base na sua resistência a ácidos, presença de ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa de C78-C90), ceras e fosfatídios. Possuem uma complexa parede celular rica em lipídios (Figura 02), onde esta é responsável por muitas das propriedades características do gênero (resistência a ácidos, crescimento lento, resistência a detergentes, resistência a antibióticos comuns). A estrutura básica da parede celular é típica das bactérias Gram-positivas: uma membrana citoplasmática interna recoberta por espessa camada de peptidoglicano sem membrana externa. O peptidoglicano (mucopéptido ou mureína) é o principal componente estrutural da parede celular, um polímero misto de açúcares hexose (*N*- acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico) e aminoácidos. Os aminoácidos carregados e os polissacarídeos tornam a camada de peptidoglicano altamente polar, proporcionando à bactéria uma superfície hidrofílica. Entretanto, o esqueleto de peptidoglicano está ligado de modo covalente a moléculas de ácido micólico-arabinogalactano e é recoberto por lipídios livres e polipeptídios (MIMS *et al*, 1999; MURRAY *et al*, 2000).

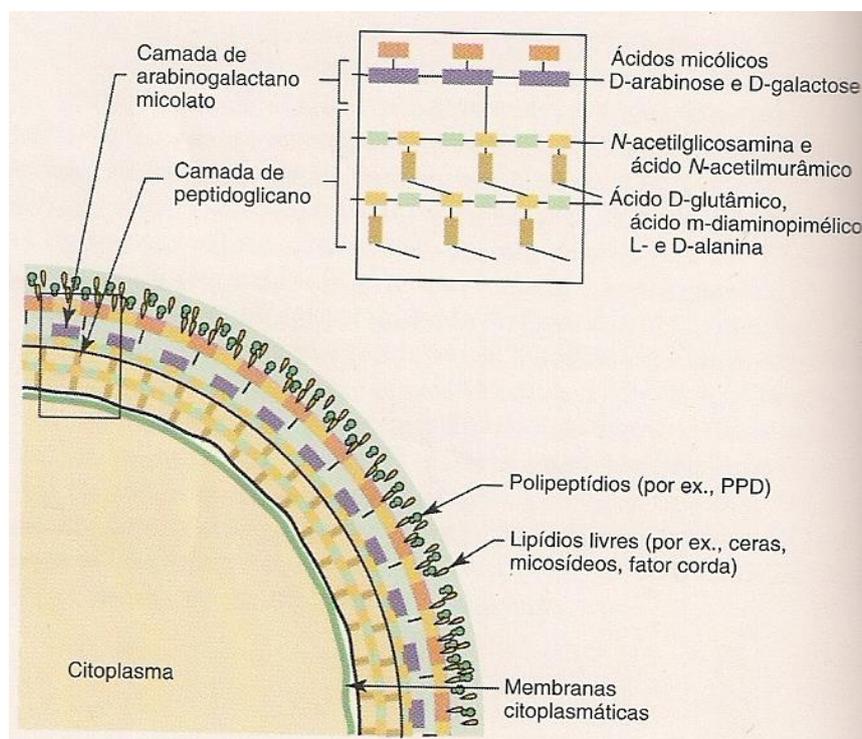


Figura 2. Estrutura detalhada da parede celular das micobactérias (BROOKS, *et al*, 2001).

No passado, todas as espécies de micobactérias que não causavam tuberculose haviam sido descritas como micobactérias atípicas e as outras como sendo

micobactérias que não eram bacilos tuberculosos (MOTT). Em meados dos anos cinqüenta, uma classificação foi introduzida por Runyon, onde as MOTT, foram divididas em quatro grupos baseados na taxa de crescimento e propriedades de pigmentação:

Grupo I: estão incluídas as micobactérias de crescimento lento. Produzem colônias com pigmentação de cor amarelada, quando expostas à luz. São, por isso, denominadas "fotocromógenas", incluindo-se nesse grupo *M. kansasii*, *M. simiae* e *M. marinum*.

Grupo II: micobactérias de crescimento lento, que também produzem colônias com pigmentação de cor amarelada, porém, independente de exposição à luz. São denominadas "escotocromógenas", sendo representantes desse grupo *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens lavesceus* e *M. xenopi*.

Grupo III: micobactérias de crescimento lento, que podem produzir pequena ou nenhuma pigmentação, mesmo quando expostas à luz intensa. São denominadas acromógenas, sendo representantes desse grupo o complexo *M. avium-intracellulare*, *M. terrae*, *M. triviale* e *M. gastri*.

Grupo IV: micobactérias de crescimento rápido (três a sete dias) que podem apresentar ou não pigmentação, sendo representante desse grupo o complexo *M. fortuitumcheloniae* (EISENSTADT; HALL, 1995; GANGADHARAM; JENKINS, 1998).

A classificação de Runyon – a qual tem muita utilidade quanto ao aspecto microbiológico, não tendo o mesmo valor quando se leva em consideração aspectos clínicos epidemiológicos, uma vez que se associam, em um mesmo grupo, espécies reconhecidamente patogênicas ao homem e outras não patogênicas - tem sido substituída por uma classificação mais natural (EISENSTADT; HALL, 1995; GANGADHARAM; JENKINS, 1998).

Na nomenclatura adotada pela American Thoracic Society, descreve todos os organismos que não pertencem ao complexo *M. tuberculosis*, como micobactérias não tuberculosas (MNT). As MNT estão associadas a determinados ambientes e surgiram como uma das principais causas de infecções respiratórias e oportunistas (CARDOSO et al, 2008). Como consequência da sua distribuição ubíqua, humanos são rodeados por estes patógenos oportunistas bem como animais, aves domésticas e peixes, sendo também chamadas de micobacterias ambientais (FALKINHAN, 2008). A partir de 2010, muitas espécies foram incluídas na “List of Prokaryotic names with Standing in

Nomenclature” do pesquisador J.P. Euzéby, a qual são citadas 153 espécies e 11 subespécies no gênero *Mycobacterium* spp. As últimas espécies incluídas foram: *M. paraffinicum* (Toney *et al.*, 2010), *M. paraseoulense* (Lee *et al.*, 2010), *Mycobacterium algericum* (Sahraoui *et al.*, 2011), *Mycobacterium europaeum* (Tortoli *et al.*, 2011), *Mycobacterium sherrisii* (van Ingen *et al.*, 2011), *Mycobacterium shinjukuense* (Saito *et al.*, 2011).

As infecções por micobactérias não tuberculosas (MNT) podem ser adquiridas por ingestão, inalação e inoculação a partir de fonte ambiental. O contínuo aparecimento de novas técnicas invasivas médicas e não-médicas, o aumento do número de procedimentos realizados e ainda o crescente número de casos de pacientes portadores de doenças que levam a imunodepressão têm elevado o número de casos de infecções ocasionadas por MNT (FALKINHAN, 2008).

Para o cultivo e diagnóstico das micobacterias, são utilizados meios de cultura na forma líquida e sólida. Os mais comumente utilizados são:

- Meios espessados com ovo (Löwenstein-Jensen) - são meios de cultura que contêm sais definidos, glicerol e substâncias orgânicas complexas (como por exemplo, gemas de ovo e farinha de batata). O verde de malaquita é incluído para inibir outras bactérias.
- Meios de Agar semi-sintéticos (Middlebrook 7H10 e 7H11) - tais meios de cultura contêm sais específicos, vitaminas, co-fatores, ácido oléico, albumina, catalase, glicerol, glicose e verde de malaquita. Os meios semi-sintéticos são utilizados para observar a morfologia das colônias.
- Meios de cultura com caldo (Middlebrook 7H9 e 7H12) - os meios com caldo propiciam a proliferação de pequenos inóculos. Normalmente, as micobactérias crescem em agregados ou massas, devido ao caráter hidrofóbico da superfície celular. Se forem adicionados Tweens (ésteres hidrossolúveis de ácidos graxos), eles umedecem a superfície e, desta maneira, permitem o crescimento em meios líquidos como uma dispersão. O crescimento é mais rápido que em meios de cultura complexos (MIMS *et al.*, 1999; MURRAY *et al.*, 2000).

Usualmente, as micobactérias são divididas em micobactérias de crescimento lento (MCL) e micobactérias de crescimento rápido (MCR). A distinção entre as espécies com crescimento lento e rápido é determinada pelos seguintes critérios:

- a) As espécies com crescimento lento requerem mais de sete dias em meios ricos para produzir colônias, facilmente visíveis de inóculos diluídos.
- b) A espécie dita rápida evidencia crescimento em menos de sete dias. Certas espécies são intermediárias quanto à velocidade de crescimento.

As MCR abrangem principalmente *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*. As MCR estão envolvidas em vários tipos de infecção como osteomielite, artrite, linfadenite, otite média crônica e infecções da córnea, e o tratamento de doenças por MCR é dificultada pelo fato desses microrganismos apresentarem resistência à maioria das drogas, exibirem diferentes perfis de sensibilidade aos outros antibióticos disponíveis, envolver meses de terapia com antibióticos e até a remoção do tecido infectado. Entre as três principais espécies de MCR, *M. abscessus* é considerada a mais patogênica e resistente a tratamentos quimioterápicos (BROWN; WALLACE, 2002)

Muita atenção tem sido dada as bactérias de crescimento lento. Entretanto, por causa da ocorrência de vários surtos em ambientes de estabelecimentos de saúde ocasionados por micobactérias de crescimento rápido, a importância desses organismos nas principais causas de infecções vem sendo demonstrada (WILLIAMS *et al.*, 2009).

Exemplos de doenças causadas por MCR em fornecimentos de água potável incluem infecções em pacientes que façam uso de hemodiálise, infecções de feridas pós-cirúrgicas, furunculoses causadas por *M. fortuitum* e bacteremia causada por *M. mucogenicum* (WILLIAMS *et al.*, 2009).

3.2 *Mycobacterium massiliense*

Surtos e infecções associadas à saúde causadas por micobactérias de crescimento rápido (MCR) foram notificados a partir do primeiro caso descrito em 1938 (DA COSTA-CRUZ, 1938).

No Brasil, surtos de infecções por MCR foram associados a cirurgias oftalmológicas para correção de problemas de refração, a procedimentos de estética

como mesoterapia, cirurgias plásticas de implante de prótese mamária e cirurgias por via laparoscópica (FREITAS *et al.*, 2003; SAMPAIO *et al.*, 2006; PADOVEZE *et al.*, 2007).

A partir de 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária vem monitorando, de forma permanente, a ocorrência de infecções pós-cirúrgicas por micobactérias de crescimento rápido (MCR) em diferentes regiões do país (BRASIL, 2008).

Em 2004, a espécie *M. massiliense* foi proposta, com base na caracterização fenotípica dos genótipos não-convencionais e de estudos de dois isolados recuperados a partir de escarro e lavado broncoalveolar de um paciente em Marselha - França. Uma vez que essas micobactérias foram isoladas em Marselha, foi proposto que os isolados fossem incluídos no gênero *Mycobacterium* como "*Mycobacterium massiliense*," um nome que remete para Massilia, onde os antigos gregos e romanos chamavam de Marselha. Após a descrição original, os relatórios de diferentes regiões do mundo têm descrito a ocorrência desta espécie, tanto em coleções de culturas previamente classificadas como *M. abscessus* e como causa de infecções oportunistas e surtos em cirurgias invasivas. A taxonomia do grupo *M. chelonae* - *M. abscessus* sofreu várias atualizações, devido à discriminação de novas espécies, seqüenciamento de genes múltiplos e, em menor medida, na avaliação das características fenotípicas. *Mycobacterium bolletii* e *Mycobacterium massiliense*, espécies recentemente propostas que estão estreitamente relacionadas com *M. abscessus* e *M. chelonae*, consequentemente, devem ser considerados parte do mesmo grupo (ADÉKAMBI *et al.*, 2004; RAHAV *et al.*, 2006; ADÉKAMBI *et al.*, 2006;).

Em praticamente todas as infecções hospitalares causadas por este grupo de microrganismos, houve falhas nos processos de esterilização de soluções, instrumentos cirúrgicos, ou dispositivos médicos. Recentes publicações indicam um número crescente de infecções secundárias para cirurgias de aumento dos seios e cirurgias vídeo-assistidas. O crescente número de casos e relatos podem ser devido, pelo menos em parte, à tolerância bem conhecida de glutaraldeído alcalino entre *Mycobacterium chelonae* - *Mycobacterium abscessus* isolados do grupo e à baixa suscetibilidade a desinfetantes de alto nível (MANZOOR *et al.*, 1999; DE GROOTE *et al.*, 2006; RAHAV *et al.*, 2006; VIANNA-NIERO *et al.*, 2008).

3.2.1 INFECÇÕES ENVOLVENDO *Mycobacterium massiliense*

A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em Nota Técnica Conjunta N° 01/2009 - SVS/MS, relata que foram reportados entre 1 de Janeiro de 2003 a 28 de Fevereiro de 2009, 2.128 casos de infecção ocorridos em hospitais públicos e privados, clínicas de cirurgia plástica, oftalmológicas, de acupuntura, de estética e, recentemente em unidades de vacinação onde o agente etiológico mais prevalente é *M. massiliense* (http://www.sobenfee.org.br/downloads/palestras/Infeccoes%20em%20Feridas_Aurea%20Paste_29-05_2.pdf Acesso em 01 de Maio de 2010, às 13:00h).

Desde abril de 2004 foram reportados 311 casos de um surto de infecção hospitalar causado por MCR em Belém – PA. Os pacientes foram submetidos a vários tipos de procedimentos invasivos (cirurgias plásticas, mesoterapia, cirurgias por via laparoscópica) por diferentes médicos e em 16 hospitais e clínicas. Em nenhum dos casos citados acima foi possível identificar a fonte de transmissão. Foram estudadas 67 amostras das quais as provenientes de procedimentos cirúrgicos foram identificadas como *Mycobacterium massiliense* e as cepas provenientes de mesoterapia como *M. bolletii*. Os resultados de tipagem molecular demonstraram que os casos de infecção após cirurgias laparoscópicas foram causados por uma única cepa de *M. massiliense* (VIANA-NIERO *et al.*, 2008).

DUARTE *et al.*, 2009, relata que uma epidemia de infecções (1.051 possíveis casos) após cirurgias vídeo-assistidas ocorridos no Rio de Janeiro, Brasil, foi causada por MCR. Desse casos, 74 foram confirmados e identificados como *M. massiliense*.

Em um caso clínico de paciente com pneumonia associada à hemoptóicos (expectorações com presença de sangue, comum na tuberculose), através de cultura pura de escarro e fluido bronquioalvolar, cepas foram isoladas e posteriormente identificados com características fenotípica e genotipicamente representativas de uma nova espécie dentro do grupo *M. chelonae* e *M. abscessus*, a *M. massiliense* (ADÉKAMBI *et al.*, 2004).

Na região central do Brasil, Goiás, ocorreram casos de infecções cirúrgicas após procedimentos artroscópicos e laparoscópicos. MNT foram isolados das amostras

(exudatos de abscessos cutâneos) de 18 pacientes, em 7 hospitais. Os 18 isolados, foram identificados como *M. massiliense* (CARDOSO *et al.*, 2008).

AH YOUNG CHO *et al.*, 2010, relataram a presença de *M. massiliense* em um caso de infecção cutânea associado a repetidas intervenções cirúrgicas.

Em caso clínico na Itália, uma cepa de *M. Massiliense* foi isolada no sangue do rim de uma paciente transplantada, a qual ao mesmo tempo, foi diagnosticada tendo tuberculose pulmonar. Bacteremia por *M. massiliense*, segundo o autor, parece ter desempenhado um papel importante em sua morte súbita (TORTOLI, 2008).

Apesar de a herniorrafia inguinal laparoscópica ser considerada segura, complicações podem ocorrer. COELHO *et al.*, 2010, avaliou as complicações de 780 cirurgias de herniorrafia inguinal laparoscópica onde, um paciente apresentou uma extensa infecção pré-peritonial causada por *M. massiliense* o que exigiu a remoção da tela (malha de polipropileno colocada no orifício da incisão na hérnia), desbridamento tecidual (limpeza dos tecidos infectados), e antibioticoterapia prolongada.

Outro caso de importância devido ao sítio de entrada do microrganismo, ocorreu na Korea. Em 2005, o primeiro caso de abscesso após injeção intramuscular foi relatado. Dos 2.984 pacientes que receberam a injeção, 77 apresentaram complicações com presença de uma massa palpável, dor, vermelhidão e pus que após análises genéticas, foi comprovada a presença de *M. massiliense* em 12 desses pacientes (KIM *et al.*, 2007).

Os surtos de infecções por outras espécies de MCR são raros, contudo, relatos da literatura indicam possível emergência de espécies, principalmente como *M. massiliense* em quadros clínicos de infecção disseminada após procedimentos invasivos (SIMMON *et al.*, 2007).

3.3. TERAPIA FOTODINÂMICA

O uso da propriedade terapêutica da luz é conhecida pela humanidade há mais de três mil anos, desde que os indianos usavam psoralenos para o tratamento de vitiligo (ACKROYD, *et al.*, 2001). Porém o conceito de morte celular induzida por interação de substâncias químicas e a luz foi empregado somente a pouco mais de cem anos.

Oskar Raab, em 1900 quando ainda estudante de medicina em Munique, foi o primeiro a observar e descrever essa interação. Raab observou em seus estudos para o tratamento da Malária, que a toxicidade do cloridrato de acridina contra *Paramecium caudatum* foi dependente da quantidade de luz resultando em um incidente em seu experimento. Publicou-se então o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos. No ano seguinte, 1901, o médico neurologista francês J. Prime tratou epilepsia de uma paciente com eosina via oral, tendo como achado clínico a indução de dermatite nas áreas expostas à luz solar (PRIME, 1901). Essas descobertas levaram, em 1903, Von Tappeiner e seu dermatologista A. Jesionek no se configurou como a primeira aplicação clínica no tratamento de tumores de pele, usando eosina tópica e luz branca (VON TAPPEINER; JESIONEK, 1903). Logo após, em 1904, Von Tappeiner, reportou que os efeitos tóxicos na presença de luz não foram devidos ao calor e sim da presença do oxigênio na reação encontrada. Após novas experiências incluindo a influência direta de luz, Von Tappeiner criou o termo “reação fotodinâmica” em 1907 e em 1924, Policard descreveu as primeiras observações clínicas (VON TAPPEINER; JODLBAUER, 1904 ; VON TAPPEINER; JODLBAUER, 1907 ; MAISCH, 2007).

Diversos estudos avaliando efeitos de fotossensibilidade e fototoxicidade, bem como farmacodinâmica e farmacocinética de fotossensibilizadores, foram descritos a partir daí. Em 1975, ocorreu um dos marcos mais importante da TDF, quando Dougherty *et al.* obtiveram resposta completa na tratamento de tumor de cérebro de rato com uso de derivado de hematoporfirina (HpD) e fonte de luz vermelha (DOUGHERTY *et al.*, 1975). No mesmo ano, o urologista J. F. Kelly, em Londres, demonstrou que células tumorais de bexiga humana transplantadas em ratos poderiam ser tratadas e destruídas com a TFD (KELLY; SNELL; BARENBAUM, 1975).

Em 1976, Kelly e Snell iniciaram os estudos em humanos com tratamento em cinco pacientes com câncer de bexiga após sucesso nas tentativas com modelo animal (KELLY; SNELL, 1976). O primeiro estudo clínico seriado com TFD, ocorreu em 1978, com Dougherty, no qual 25 vinte e cinco pacientes com cento e treze lesões resistentes a tratamentos convencionais foram tratadas com HpD, obtendo resposta satisfatória em 87% das lesões (DOUGHERTY, 1978), mostrando pela primeira vez a possibilidade do tratamento com sucesso de tumores resistentes a outras terapias.

A TFD, Terapia Fotodinâmica (do inglês Photodynamic Therapy, PDT), é comumente utilizada em tratamentos promissores para diversos tumores e doenças não-malignas (FERREIRA et al., 2004). Existem relatos na literatura da técnica TFD, sendo usada para tratar infecções em modelos animais selecionados em alguns ensaios clínicos: principalmente para lesões virais, mas também para a acne, infecção gástrica por *Helicobacter pylori* e abscessos cerebrais e aplicações clínicas, que incluem infecções em feridas e queimaduras, abscessos, infecções em cavidades do corpo, como boca, orelha, cavidade nasal, bexiga e estômago, e em infecções de superfície da córnea e da pele (HAMBLIN; HASAN, 2004)

A TFD consiste na indução de fototoxicidade letal nas células alteradas, ou tecidos-alvo induzida pela luz visível no comprimento de onda adequado, em baixas doses, seguido a administração de uma substância fotossensibilizadora (FS) administrado por via endovenosa, inalatória ou tópica, de forma sistêmica ou localizada, juntamente com oxigênio molecular (O_2) (LAUSTRIAT, 1986; BAGNATO, 2008). Apesar de muitas moléculas fotossensibilizadoras estarem naturalmente presentes como constituintes das células e tecidos, em TFD elas devem primeiramente ser introduzidas dentro do organismo (FERREIRA, 2007; BAGNATO, 2008).

Para realização desta técnica terapêutica, após transcorrido o intervalo fármaco-luz, que é definido para cada fármaco como período de acúmulo máximo nas células a serem tratadas, faz-se a aplicação da luz. A luz é aplicada na região dos tecidos ou células alterados e também sadios que circunda a área a ser tratada. Os efeitos iniciais da fotodinâmica aos tecidos ou células acontecem rapidamente, seguido por uma sequência de ações decorrentes da TFD, levando seletivamente os tecidos doentes à morte com preservação dos tecidos normais. (LAUSTRIAT, 1986)

Evidenciando esta sequência de ações decorrentes, a interação dos três produtos essenciais a técnica (luz no comprimento de onda adequado, FS e O_2), resulta em espécies reativas que induzem a inviabilização das células. Essa reação envolvida, ocorre primariamente da excitação eletrônica do corante pela luz, seguida de dois mecanismos principais de reação, a partir do seu estado excitado:

-Reação Tipo I ou via Formação de Radical - o fotossensibilizador ativado pode reagir com as moléculas ao seu redor por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando a produção de radicais livres.

- Reação Tipo II ou Via Formação de Oxigênio Singlete – a transferência do excesso de energia ao oxigênio molecular distribuído pelo sistema vascular leva a produção do oxigênio singlete $^1\text{O}_2$, altamente oxidante.

Ambas as reações, levam a morte celular e destruição do tecido doente (MACHADO, 2000; LAMBRECHTS *et al.*, 2005; DEMINOVA; HAMBLIN, 2005).

CARRÉ *et al.*, 1999, afirmou que o oxigênio singlete reage a quase todos os componentes celulares. Uma vez que as reações ocorrem na região extracelular, os lipídeos insaturados da membrana celular sofrerão oxidações comprometendo, assim, a viabilidade das células. As peroxidases por sua vez, facilitam a formação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) através dos hidroperóxidos resultantes. Sendo a reatividade dessas ROS não específicas com moléculas orgânicas, qualquer macromolécula intracelular pode ser um alvo em potencial da TFD, afirmando assim a vantagem da fotossensibilização, pois, essa multiplicidade de alvos dificulta o desenvolvimento de resistências por parte das células.

De uma forma resumida, a terapia fotodinâmica envolve o uso de um agente fotossensibilizador com afinidade as células malignas, de uma fonte de luz para excitação e do oxigênio molecular. As moléculas do fotossensibilizador são ativadas pela luz e começa um processo de troca de energia com as moléculas de oxigênio, produzindo uma espécie de oxigênio altamente reativa: o oxigênio singleto. Essa espécie reativa, oxida de forma rápida e eficaz quase todos os substratos biológicos em seu caminho sendo um processo rápido e seguro para eliminar células alteradas (BAGNATO, 2008).

3.3.1. USO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO – INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA (IFD)

Bactérias, fungos e vírus também podem ser mortos pela luz visível depois do tratamento com um fotossensibilizador apropriado e luz num processo denominado com

Inativação Fotodinâmica (PDI, do inglês, Photodynamic Inactivation). O efeito fotodinâmico parece ser um efeito único em bactérias nas quais os alvos, nas células, são igualmente susceptíveis, isto é, se uma única estrutura é danificada, a morte celular pode ocorrer. (WAINWRIGHT, 1998; GAD, 2004).

Inativação Fotodinâmica de microrganismos é baseada no conceito em que um corante, conhecido como fotossensibilizador, deve ser localizado preferencialmente na bactéria, e não nas células ou tecidos circundantes, e posteriormente ativadas por baixas doses de luz visível de um adequado comprimento de onda, para não haver efeito tóxico nas células (MAISCH, 2007)

As bactérias tem um papel importante na morbidade animal e humana, e um grande número delas desenvolveram resistência aos antimicrobianos. Desde meados do século passado, a terapia fotodinâmica antimicrobiana foi esquecida devido a descoberta da antibioticoterapia, mas nos anos 90 houve a retomada da aplicação antimicrobiana de fotossensibilizador impulsionada por dois eventos: a disseminação da AIDS devido ao HIV e o enorme crescimento das infecções hospitalares devido as multiplicações das bactérias resistentes aos antimicrobianos (WAINWRIGHT, 1998; MAISCH, 2007; CALIN; PARASCA, 2008).

Pesquisadores têm obtido resultados encorajadores, pois, o método conduz a grandes reduções nas populações bacterianas. É interessante salientar que os estudos que visam uma única espécie bacteriana tiveram melhores resultados (mesmo com bactérias Gram(-), sugerindo uma certa especificidade do fotossensibilizador a uma bactéria, provavelmente derivado do metabolismo particular de cada espécie que afeta a absorção do corante pela célula bacteriana. Vários estudos mostraram que existe uma diferença na susceptibilidade de TFD antibacteriana entre bactérias gram-positivas e gram-negativas (MAISCH, 2007; CALIN; PARASCA, 2008).

Verificou-se que, em geral, moléculas de fotossensibilizadores neutra ou aniônicas, são obrigadas a eficiência e fotodinamicamente inativar bactérias Gram(+), que são vinculadas, em maior ou menor grau, mas apenas a membrana externa de células bacterianas Gram(-), não são inativadas depois da iluminação. A alta sensibilidade das espécies Gram(+) é explicada pela sua fisiologia, como a sua membrana citoplasmática está rodeada por uma camada relativamente porosa de

peptidoglicano e ácido lipoteicóico, permite com que o fotossensibilizador possa atravessá-la. O envelope da célula bacteriana Gram(-) é constituído por uma membrana citoplasmática interior e uma membrana externa que são separadas pelo peptidoglicano, que contém periplasma. A membrana exterior faz uma barreira física e funcional entre a célula e seu ambiente. Na membrana exterior, várias diferentes proteínas estão presentes, algumas dos quais funcionam como poros para permitir a passagem de nutrientes, enquanto outras têm uma função enzimática ou estão envolvidos na manutenção da integridade estrutural da membrana externa e da forma da bactéria. Sabe-se também que o fotossensibilizador carregando uma carga catiônica ou o uso de agentes que aumentam a permeabilidade da membrana celular externa, podem aumentar a eficácia de matar bactérias Gram(-) (HAMBLIN; HANSAN, 2004).

Diversos grupos de trabalhadores permitiram PDI em espécies Gram(-). O grupo de israelitas Nitzan e colaboradores utilizaram o PMBN (do inglês, polycationic péptide polimixina B nonapeptide), que aumentou a permeabilidade da membrana externa das espécies Gram(-) e permitiu que os fotossensibilizadores que são normalmente excluídos da célula, penetrassem em um local onde as espécies reativas de oxigênio gerado mediante iluminação, possam causar danos fatais a célula. PMBN não libera lipopolissacarídeo (LPS) a partir das células, mas "expande" o folheto exterior da membrana, permitindo ao fotossensibilizador, tal como a deuteroporfirina (DP), penetrar e permitir a penetração da PDI em *E. coli* e *P. aeruginosa* (NITZAN *et al.*, 1992; HAMBLIN; HANSAN, 2004).

Estudos destinados a comparar bactérias Gram(+) e Gram(-) têm mostrado melhores resultados sobre os primeiros, pelas dificuldades de o corante penetrar nas células bacterianas Gram(-). Atenta-se que escolher o melhor fotossensibilizador, e não a potência da fonte de luz é a chave elemento na obtenção de bons resultados (CALIN; PARASCA, 2008)

Em geral, a intensidade da luz, diminui com a profundidade de penetração através das diversas camadas da pele devido aos efeitos combinados da dispersão e absorção, porque a pele é de forma irregular, não homogênea, multifacetada, e contém folículos pilosos e glândulas. A penetração de luz em mais tecidos biológicos aumenta após o aumento do comprimento de onda, pelo menos no intervalo de 400-700 nm.

Portanto, um compromisso deve ser encontrado no que diz respeito à profundidade de penetração da luz, o espectro de absorção do sensibilizador utilizado e de localização dos sítios de agentes patogênicos. No que diz respeito às fenotiazinas (azul de metileno, toluidina azul) ou porfirinas, existe ainda uma eficaz absorção de luz para comprimentos de onda acima 600 nm. No momento, diferentes sistemas de laser e fontes incoerentes de luz são utilizados na TFD (MAISCH, 2007).

3.4. SISTEMA DE IRRADIAÇÃO - FONTES DE LUZ PARA TFD

NOWIS *et al.*, 2005 relatam que as primeiras fontes de luz usadas em TFD foram lâmpadas convencionais em que o emissor era definido por filtros. O efeito térmico e a imprecisão para o cálculo dosimétrico, apesar de serem mais acessíveis pelo preço e facilidade de uso, eram suas maiores desvantagens. Historicamente, lasers de Argônio e de vapor de metal são as escolhas iniciais para o uso em TFD, apesar do seu alto custo. Estes combinam muitas características como: maior facilidade para o cálculo dosimétrico, alta potência, comprimento de onda ajustável, e a possibilidade de acoplamento a fibras ópticas para o uso em procedimentos endoscópicos. (NOWIS *et al.*, 2005).

Como outras fontes de luz, podemos citar os dispositivos a base de LEDs (acrônimo do inglês “light emitting diodes”) com as vantagens de serem confiáveis, menores, portáteis, de fácil manejo e comparativamente mais baratos em relação as fontes de luz laser, com banda de emissão variando entre 5-10 nm e intensidade de 150 mW/cm² em áreas de até 20 cm², sendo ajustável a área de irradiação . Como desvantagens, apresentam comprimento de onda fixo dificultando o uso para mais de um FS e intensidade relativamente baixa, entretanto, o advento de novos avanços tecnológicos nessa área poderão melhorar esses aspectos (PATTERSON; WILSON, 1999).

3.5. FOTOSSENSIBILIZADOR (FS)

Fotosensibilizadores (FS) são veículos da TFD que permitem a transferência de energia luminosa para gerar produtos reativos que causam citotoxicidade, com conseqüente destruição do alvo, tendo a habilidade de se acumularem nos tecidos alvos, de forma mais ou menos específica. É uma substância que induz sensibilidade luminosa

a processos químicos e/ou físicos, normalmente insensíveis a luz (SIBATA *et al.*, 2001; ALISSON *et al.*, 2004).

Segundo MENEZES, P.F.C., o FS ideal deve apresentar propriedades específicas que garantam a eficácia e a segurança do tratamento, por isso devem apresentar uma baixa toxicidade no escuro e propriedades fotofísicas adequadas (MENEZES, 2006).

Para ser considerado um FS ideal, este deve apresentar como principais características: ser puro, ter sua composição química conhecida, ser minimamente tóxico na ausência de luz, ser preferencialmente retido no tecido alvo, ter uma rápida eliminação após tratamento, não ser mutagênico/carcinogênico, causar mínimos efeitos colaterais, custo acessível, ter bandas de absorção dentro da janela biológica do espectro eletromagnético (600 – 800 nm) (SHARMAN; ALLEN; VAN LIER, 1999).

As Hematoporfirinas (Hp), um composto isolado da hemoglobina, derivado da porfina, representam os FS mais utilizados em estudos e aplicações clínicas, incluindo a TFD, sendo aprovados para o uso por órgãos reguladores de medicamentos e equipamentos médicos e odontológicos, como a FDA (*Food and Drug Administration*) e a ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) (MENEZES, 2006).

A porfirina é o esqueleto básico para a construção de uma ampla variedade de porfirinas, clorinas, ftalocianinas, etc. A molécula da porfirina e seus derivados químicos são largamente encontrados nos seres vivos: são as unidades centrais em moléculas como a clorofila, vitamina B12, citocromos, hemoglobina e mioglobina. (DARWENT *et al.*, 1982)

Em 1912, Meyer-Betz demonstrou que a Hematoporfirina (Hp), um composto isolado da hemoglobina, era extremamente poderoso como fotossensibilizador, com propriedades de localização tumoral. A purificação da Hp levou a preparação do Derivado de Hematoporfirina (DHP), uma mistura complexa de componentes com melhor localização tumoral do que a Hp. A partir daí os composto derivados da Hematoporfirina são fotossensibilizadores amplamente utilizado para o tratamento de câncer com TFD, onde podemos destacar o Photofrin®, o Photogen® e o Photosan®. Estes não são compostos quimicamente definidos, mas sim uma mistura complexa de

porfirinas, monômeros, dímeros e oligômeros, que apresentam impurezas, e foram os primeiros FS a serem sistematicamente estudados para a aplicação clínica em TFD considerados então, FS de primeira geração (FERREIRA *et al.*, 2004; SIBRIAN-VAZQUEZ *et al.*, 2007). Apesar da diferença de suas composições, suas formas comerciais parecem ser clinicamente equivalentes nos seus resultados (KESSEL, 1987).

Algumas das vantagens dos DHp são, destruir o tumor eficientemente, ser atóxica na ausência da luz, de preparação fácil para administração intravenosa e menor custo relativo. Como desvantagens, induz fotossensibilidade cutânea prolongada e tem baixa seletividade aos tecidos tumorais nos períodos iniciais após administração endovenosa (GILSON *et al.*, 1988; MORIWAKI *et al.*, 2001).

A porfirina sódica foi o primeiro fármaco fotossensibilizador a receber aprovação para a TFD sendo composta de DHp, com seu componente s inativos (compostos pouco ou insensíveis a fotoativação) removidos (BONNETT; BERENBAUM, 1983).

Nos últimos 20 anos, muitas pesquisas tem sido feitas para o desenvolvimento de novos FS, otimizando suas propriedades (Tabela I). Uma característica complementar importante dos FS não está em sua capacidade de promover apenas tratamento, mas também possibilitar aplicações de métodos diagnósticos, como a biópsia óptica através de suas propriedade de fluorescência, por exemplo (BONINI, 2006).

A busca por um novo fotossensibilizador quimicamente definido, com propriedades biológicas, ópticas e farmacocinéticas foi necessária surgindo assim os comumente chamados “FS de segunda geração”. Estes, são moléculas semelhantes a porfirina, como benzoporfirinas, clorinas, texapirinas e naftalocianinas (CALZAVARA-PINTON *et al.*, 2007).

Relacionando a este trabalho, na TFD Antimicrobiana, as concentrações dos fotossensibilizadores são consideradas relativamente baixas para não causarem um efeito citotóxico no hospedeiro. O fotossensibilizador incorporado lentamente na bactéria pode causar dano na parede celular após a exposição a irradiação da luz enquanto um período maior de pré-irradiação (incubação) entre o fotossensibilizador e a

bactéria resulta num efeito distinto, como por exemplo a ruptura de ácidos nucleicos (WAINWRIGHT, 1998).

Classe	Nome do Fármaco	Banda de Absorção (nm)
Porfirinas	Porfirina sódica, Poliematoporfirina	630
	Protoporfirina IX	633
Clorinas	Verteporfirina (derivado de Benzoporfirina)	690
	Temoporfirina	652
Bacterioclorinas	Ainda não aprovadas	740
Ftalocianinas	Ftalocianina de alumínio sulfonada (mistura)	680
Compostos Fenotiazídicos	Ainda não aprovados	670
Texafrinas	Lutexafirina	734

Figura 3. Principais fotossensibilizadores utilizados na TFD.

3.5.1. PHOTOGEM®

A porfirina sódica Photogem®, é classificado como representante da primeira geração dos FS, onde segundo MENEZES *et al.*, 2005 possui várias bandas de absorção quando em solução de água destilada. Este FS é derivado da Hp, produzido a partir de sangue de animais e tem sua origem Russa. É um fármaco aprovado pelo “Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russiam Federation” sob autorização 42-3199-98. e preparado no Instituto de Química Fina de Moscou, foi aprovado para uso em humanos pelo comitê estatal de Farmacologia da Federação Russa e aprovado no Brasil pela ANVISA (data 08/ 04/ 2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4). Este fotossensibilizador, constituído de uma mistura de monômeros e oligômeros (figura 3) de derivados da Hp, é obtido em frascos de 50 ml, contendo 200 mg, apresentando-se como um pó com coloração violeta-escuro, podendo ser armazenado

quando protegido da luz por até 02 anos a temperatura inferior a 05°C. A figura 4 apresenta o espectro de absorção do Photogem[®] que está entre as bandas de 500 e 630nm e mostra o detalhamento das bandas entre 500 e 700 nm. (BONINI, 2006).

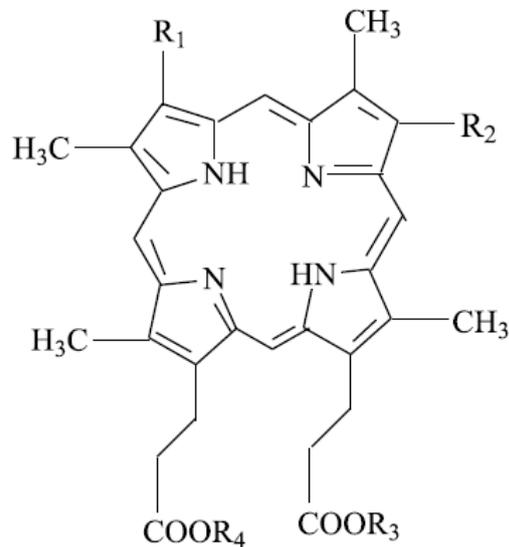


Figura 4. Estrutura do monomérica do FS Photogem[®]

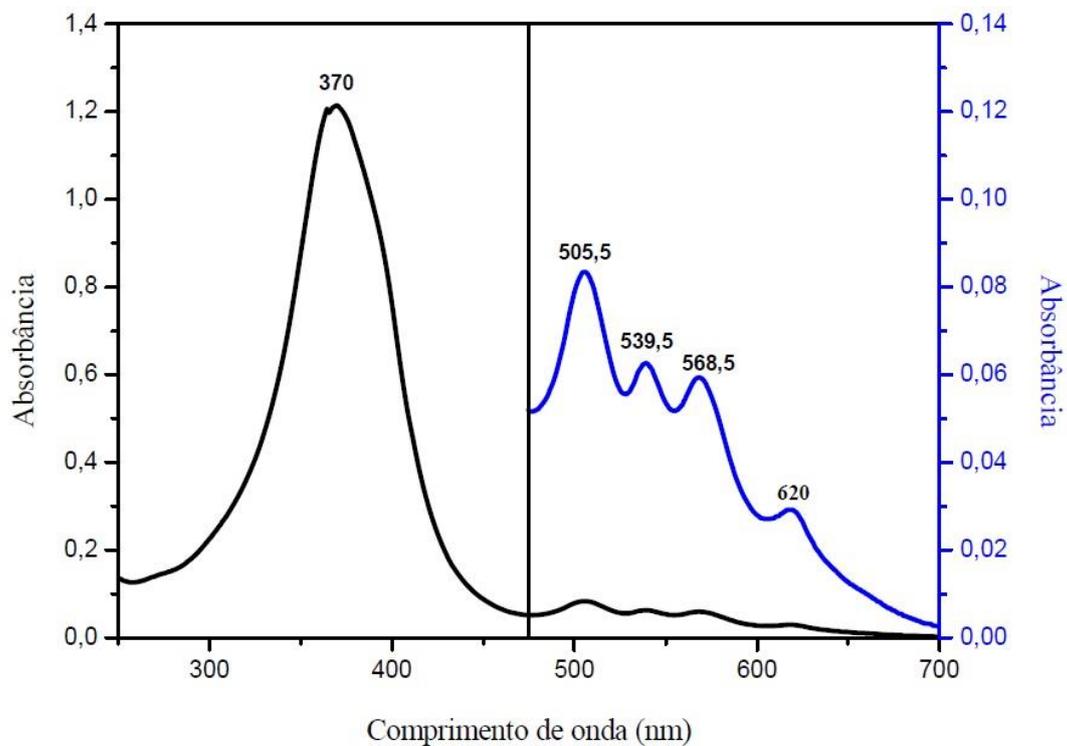


Figura 5. Espectro de absorção do Photogem[®] com detalhamento para a banda de absorção entre 370 nm e entre 500 e 700 nm (BONINI, 2006).

3.5.1.1. PHOTOGEM® E SEUS USOS NA TFD e IFD

A literatura relata vários trabalhos utilizando o Photogem® como um FS eficaz na TDF e IFD. Antes disso, avaliar não somente os parâmetros para a inativação das células alvo na TFD, mas assegurar que esses parâmetros não causem injúrias aos tecidos e células normais seriam de grande valia. Foi quando, RIBEIRO, 2009 avaliou o potencial citotóxico da TFD utilizando como FS, Photogem®, em concentrações de 10, 25 e 50 mg/L associado a LEDs azuis (455nm, 22mW/cm²) nas doses de 25,5 e 37,5 J/cm² e vermelhos (630nm, 25mW/cm²) com doses de 75 e 100 J/cm², sobre cultura de fibroblastos L929 e células odontoblásticas MDPC-23. Ambas as linhagens tiveram seu metabolismo celular reduzido significativamente quando submetidas a TFD que também causou a redução da atividade mitocondrial das células e intensas alterações morfológicas (redução do tamanho celular e ausência de limites celulares - indicando que as células estariam em processo de morte pelo rompimento da membrana citoplasmática). Para determinar se os parâmetros necessários para inativação de microrganismos podem causar algum efeito tóxico em células normais, ZEINA *et al*, 2002 verificaram que o tempo mínimo da TFD para causar alterações nos queratinócitos foi 200 vezes maior que o utilizado para inativação das bactérias. Entretanto, este tempo mínimo de TFD foi somente 18 vezes maior que o tempo necessário para inativar *C. albicans*.

O efeito dose-dependente entre concentração de FS e toxicidade da TFD para microrganismos, foi observado em alguns trabalhos como o de GOES, 2010, que após avaliar a susceptibilidade *Staphylococcus aureus* na TFD sob ação do Photogem®, obteve seus melhores resultados (100% de morte) a 60 J/cm², sua dose mais elevada, com 50 µg/ml (concentração mais elevada), confirmando ser dose-dependente, enquanto BRUZELL, 2005 após testar a fototoxicidade da curcumina como potencial FS com aplicações orais em cinco preparações aquosas, afirma que o efeito fototóxico foi dependente da concentração mínima de luz (≤ 6 J/cm²) e curcumina ($\leq 0,5$ µM).

GUISTI *et al*, 2008, nos demonstrou isso quando, usando a técnica da TFD, irradiou *Streptococcus mutans* com doses de 24 e 48 J/cm² (630nm – 400 mW/cm²).

Uma fonte luz externa ao processo fotodinâmico, a quimiluminescência, associada ao Photogem® no controle microbiano *in vitro* de *Staphylococcus aureus*,

resultou em uma redução bacteriana com valores superiores a 98%, ou seja, valores próximos de duas ordens de redução logarítmica promovendo um resultado antimicrobiano similar aos verificados na literatura que se utilizam de *lasers* e LED, foi demonstrado por FERRAZ, 2011.

Em se tratando de IFD de microrganismos mais resistentes, PERUSSI, 2007 realta que a membrana nuclear dos fungos pode representar uma barreira adicional à penetração do FS. Confirmando este parâmetro, DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005 relata que fungos, tais como *Candida albicans*, são ainda mais resistentes a terapia fotodinâmica devido a presença desta membrana nuclear, mas essa resistência vem sendo superada. Exemplo disso são publicações de DOVIGO *et al.*, 2011 que quando utilizando o FS Photogem[®] associado a luz LED (455nm) para avaliar, *in vitro*, a susceptibilidade de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* com doses de 18.0, 25.5 e 37.5 J/cm², reportaram redução completa de *C. albicans* quando observada depois após 18.0 J/cm² e 50 mg/l de FS. Cepas de *C. dubliniensis* foram inativadas após 18.0 J/cm² e 25 mg/l. A inativação de *C. tropicalis* foi observada após fotossensibilização com 25 mg/l e subsequentemente iluminação em 25.5 J/cm². Para *C. krusei*, nenhuma das associações entre FS e luz resultou em completa redução, porém houve redução de sua viabilidade.

A mesma autora, DOVIGO *et al.*, 2010 utilizando o FS Photogem[®] para inativação de espécies fluconazol-resistente de *Candida* (*C. glabrata* e *C. albicans*) com luz na região do azul, testando as fluências de 10.5, 18, 25.5, 37,5 J/cm², concluíram que as espécies fluconazol-resistentes testadas, apresentam sensibilidade reduzida a PDT em comparação com cepas referência (ATCC).

Visto isso, a literatura nos fornece argumentos suficientes para comprovar a eficácia do Photogem[®] como droga fotossensibilizadora eficiente na TFD e IFD de microrganismos, nos dando bases sólidas para sua escolha como FS neste presente trabalho.

3.5.2. SAL DE CURCUMINA

Desde o ano 3000 a.C., as plantas adquiriram fundamental importância através de relatos de cura na China. Outra descoberta, foi o documento egípcio Ebers, encontrado em 1872 e que menciona a existência de herboristas no antigo Egito, além

de documentos que mostram a importância que as ervas tiveram na saúde, na culinária, no preparo de produtos diversos e para embalsamar faraós. Na antiga Grécia, os valores terapêuticos e tóxicos das plantas eram bastante conhecidos e, a partir da Era Cristã, europeus, árabes e alquimistas diversos contribuíram para a abertura de novas e amplas perspectivas na medicina natural (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 2006).

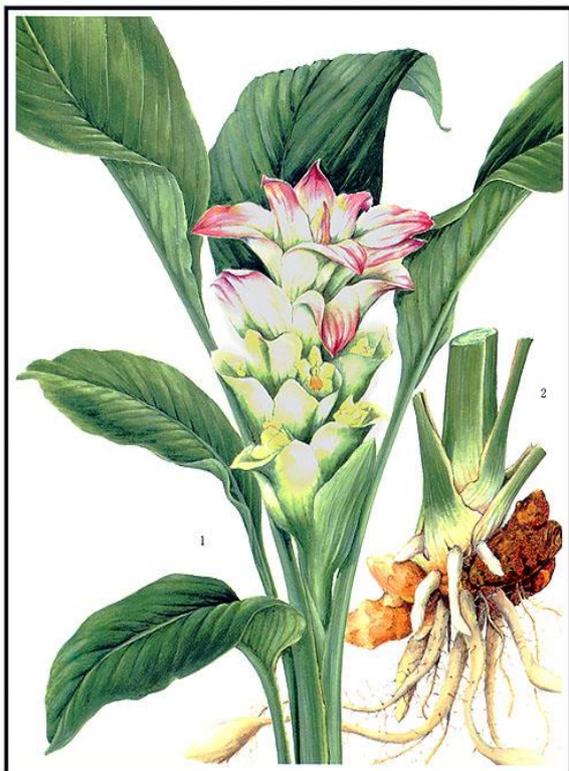
O poder medicinal das plantas se dá a um conjunto de componentes ativos sintetizados nos tecidos que, a princípio, podem ser considerados terapêuticos, mas também podem causar efeitos tóxicos. Estes componentes ativos, quando introduzidos nos organismos animais, promovem respostas fisiológicas e homeostasia, apresentando, de um modo geral, mecanismos de ação semelhantes às drogas sintéticas (SIMÕES *et al.*, 2001).

Segundo PANIZZA, S., 1997, o açafrão (*Curcuma longa Linn*) é uma planta nativa da Índia e da Ásia Meridional e foi introduzida no Brasil pelos colonizadores (PANIZZA, 2007).

A denominação cúrcuma vem do Persa *Kurkum*, que significa açafrão e popularmente possui diversas sinonímias como: açafroeira, açafrão-da-terra, açafrão-da-Índia, gengibre amarelo, curcume, tumeric (inglês) e outras (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 2006).

A *Curcuma longa*, pertencente à família das Zingiberáceas, é uma herbácea perene, rizomatosa, sendo o rizoma principal piriforme e ovóide com inúmeras ramificações laterais compridas e finas, onde os rizomas externamente apresentam uma coloração acinzentada e internamente mostram uma superfície vermelho-alaranjada, como ilustrado na figura 03. A *Curcuma longa L.* possui diversos princípios ativos, como óleo essencial, resinas, substância amarga, curcumina, turmerona, açúcares, amidos e saponinas, que atualmente enquadram o açafrão no quadro de plantas úteis medicinais (PANIZZA, 2007).

a)



b)

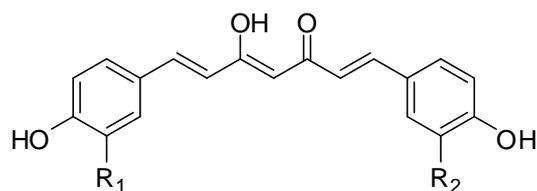


c)

Figura 6. (a) ilustração das folhas, flor e rizoma da *Curcuma longa L.*, (b) detalhe do rizoma onde apresenta coloração acinzentada e internamente mostram uma superfície vermelho-alaranjada, (c) detalhe do pó da *Curcuma Longa L.* a partir do rizoma.

Do rizoma da cúrcuma, além do pó, também podem ser extraídos os óleos essenciais, aonde estes são compostos por turmeronas e por cetonas aromáticas em menor proporção (NAGHETINI, 2006)

Os teores dos pigmentos curcuminóides encontrados no rizoma cúrcuma podem variar de 4 a 8 mg/100g e são eles: a curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), a desmetoxicurcumina ($C_{20}H_{18}O_6$) e a bisdesmetoxicurcumina ($C_{19}H_{16}O_4$) representados na figura 6 (MATHAI, 1976; MARTINS, 1992). Apresentam absorções máximas, a curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina nos comprimentos de onda de 429, 424 e 419 nm, respectivamente. O espectro de fluorescência é de 434 nm de excitação e 520 nm de emissão apresentando fluorescência amarela sob luz ultravioleta (SOUZA, 1998; PÉRET-ALMEIDA, 2000).



Curcumina: $R_1 = R_2 = \text{OMe}$
 Demetoxi-curcumina: $R_1 = \text{OMe}, R_2 = \text{H}$
 Bis-demetoxi-curcumina: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}$

Figura 7. Estrutura da Curcumina e seus derivados (SASIKUMAR, 2005)

O Sal de Curcumina utilizado neste trabalho, foi avaliado quanto ao seu espectro de absorção, demonstrando que está na faixa de 430nm, como demonstrado na figura 7.

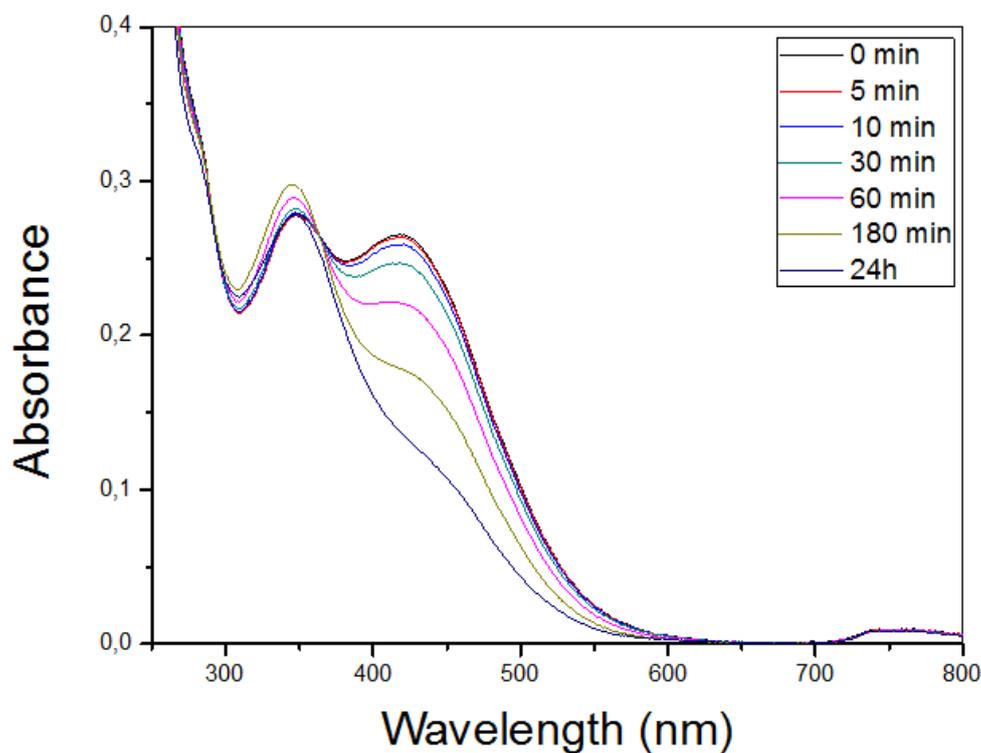


Figura 8. Espectro de absorção do Sal de CurcuminA (REGO *et al.*, 2011)

3.5.2.1 CURCUMINA: SUAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E SEUS USOS NA TFD e IFD

A Curcumina é um importante corante natural que apresenta uma gama de atividades farmacológicas incluindo efeito antimicrobiano, antiinflamatório, antioxidante

e anti-câncer (SOWBHAGYA *et al.*, 1998; SAMPATHU *at al.*, 2000) A utilização de óleos essenciais da cúrcuma, demonstraram essas mesmas propriedades quando analisadas por JITOE *et al.*,1992; SINGH *et al.*, 2002 e PÉRET-ALMEIDA *et al.*, 2006.

O óleo essencial obtido por hidrodestilação da cúrcuma, foi avaliado sem diluição na inibição de bactérias. Os resultados obtidos, quando comparados ao antibiótico gentamicina (30 µg), foram *Staphylococcus aureus* 36%, *Staphylococcus epermidis* 90%, *Escherichia coli* 18%, *Pseudomona aeruginosa* 22%, e *Salmonella typhymurium* 31% (SINGH *et al.*, 2002).

BHAVANISHANKAR *et al.*, 1979, afirmou que o extrato alcoólico da curcumina, quando testado *in vitro*, apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* na concentração de 2,5 a 50 mg/100 mL e LUTOMSKI *et al.*, 1974, em testes com o *Aspergillus parasiticus*, o extrato alcoólico da cúrcuma também promoveu a inibição de crescimento atuando como fungistático

Quando, KIM *et al.*, 2003, realizaram testes em plantas, pulverizaram uma suspensão preparada com água, tween 80 e curcumina isolada na concentração de 250 mg/L e aplicaram esta mistura em plantas infestadas, estas apresentaram atividade antifúngica nas proporções de 85% para *Phytophthora infestans*, 76% para *Puccinia recondita* e 45% para *Rhizoctonia solani*. PÉRET-ALMEIDA *et al.*, 2003, obtiveram resultados promissores na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de rizoma de cúrcuma contra fungos, especificamente *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* utilizando extrato obtido por hidrodestilação.

Frente a esses resultados, HAUKVIK *et al.*, 2009 relata que a curcumina tem potencial fotossensibilizante na terapia fotodinâmica para infecções superficiais localizadas, contudo, é um desafio alcançar uma formulação otimizada da curcumina que apresente uma solubilidade aceitável, pH estável e uma combinação com luz altamente seletiva para atividade fototóxica em bactérias. Uma formulação adequada de curcumina, deve não ser apenas estável durante a produção e estocagem, mas também durante a irradiação da TFD. Uma vez que os produtos da fotodegradação da curcumina não mostram nenhuma atividade fotobiológica, o efeitos fotobiológicos tem sido atribuídos ao estado excitado da curcumina. (TØNNENSEN; KARLSEN, 1987; HEGGE, 2010).

DOVIGO, 2001, descreveu a associação da curcumina com luz LED na inativação de *Candida albicans* em fase planctônica e biofilme. Suspensões de *Candida* foram tratadas com nove concentrações de curcumina: 0.005, 0.01, 0.05, 1, 5, 10 e 20 μM e expostas a diferentes fluências: 1.32, 2.64, 3.96, 5.28, 6.60, 13.20, e 26.4 J/cm^2 com luz na faixa do azul (455nm – 22mW/cm²). Os resultados provaram que a curcumina pode ser um efetivo FS na inativação de *Candida albicans*, tanto na forma planctônica quanto em biofilme. A alta taxa de fotodegradação na preparação utilizada indica que, curtos períodos de iluminação são adequados para fotoinativação do corante e causar efeito fototóxico. A mesma autora, DOVIGO, 2011, avaliou o efeito fotodinâmico mediado pela curcumina (FS), contra isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. Neste estudo a luz entregue estava na faixa do azul (emissão máxima de 455nm), com potência (irradiância) de 22 mW/cm² e doses de 5.28, 18, 25.5 e 37.5 J/cm^2 . Os resultados mostraram que baixas concentrações de curcumina podem ser altamente efetivas na inativação de isolados de *Candida* quando associadas à excitação com luz.

Fatores interferentes em referência a utilização da curcumina são relatados. Atualmente, a curcumina não é aprovada como agente terapêutico e a baixa bioavaliabilidade deve ser o fator limitante para a sua aplicação médica. A baixa bioavaliabilidade é provavelmente relatada por causa da extrema baixa solubilidade da curcumina em pH ácido e neutro. Curcumina é solúvel em pH alcalino, porém, sofre uma rápida degradação hidrolítica (HEGGE, 2010). Em relação a isso, trabalhos vem sendo realizados para aumentar e/ou melhorar o veículo de entrega da curcumina no sítio de ação.

Assim sendo, HEGGE *et al.*, 2010 iniciando trabalhos de melhoria na entrega da Curcumina nos sítios-alvo, desenvolveram duas espumas carregadas com curcumina e outro composto na tentativa de aumentar sua solubilidade e avaliar seu fototóxico como FS após sua entrega em feridas. As espumas foram carregadas, uma com alginato de sódio (sodium alginate) mais a curcumina e a outra, carregada com Polietilenoglicol 400 (PEG 400), além da curcumina. Utilizaram luz azul (entre 400 e 500nm) com potência de 16.1 Mw/cm² e diferentes doses de luz para os microrganismos de escolha, *Enterococcus faecalis* com dose de 9.7 J/cm^2 e *Escherichia coli* com 29.0 J/cm^2 . Os resultados revelaram que *E. faecalis* teve uma redução de ≥ 6 logs quando na espuma

contendo PEG 400, porém uma fototoxicidade de 100%, enquanto *E. coli*, com a mesma espuma, apresentou uma redução de 81%, sendo então a espuma carregada com PEG 400 e curcumina, nas doses testadas, o melhor veículo de entrega do FS nas feridas, podendo ser removido após o uso não causando dano ao tecido, diminuindo a atenuação da luz.

BRUZELL *et al.*, 2009, usaram como modelos bacterianos, cepas de bactérias Gram(+): *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus intermedius* e também cepas de bactéria Gram(-): *Escherichia coli*, expondo estas a luz azul (430nm – 17mW/cm²) nas doses de 0.5 e 30 J/cm². Neste estudo, o efeito fototóxico contra esses gêneros foram investigados em 5 preparações aquosas diferentes, contendo DMSO, ciclodextrinas, lipossomos e surfactantes conhecidos por interferir na permeabilidade da membrana. As preparações aquosas contendo DMSO e polietilenoglicol associados a curcumina, foram os mais efetivos veículos para exercer “photokilling” de bactérias Gram(+) e Gram(-).

A curcumina associada a combinação de luz, também apresenta efeitos anti-câncer e de prevenção tumoral. Fototoxicidade das células mamárias pela curcumina, já foram anteriormente reportados por BRUZELL, 2005 aplicando luz através de uma lâmpada halógena (350 – 550 nm com emissão máxima de 490nm), e potência de 431 mW/cm² com doses de 6.0 e 1.6 J/cm² em células acinares de glândulas salivares investigando cinco preparações aquosas diferentes consistindo em 5% de DMSO, micelas não iônicas, ciclodextrina, lipossomos ou um polímero hidrofílico, demonstrou que a preparação aquosa de lipossomos foi o mais eficiente veículo de entrega da curcumina para induzir morte celular. O efeito fototóxico induzido pela curcumina é altamente dependente do tipo de preparação. Curcumina pode ser um FS em potencial no tratamento de lesões orais e cânceres, tendo o cuidado na seleção do melhor veículo de entrega.

A partir destes dados, a literatura nos comprova a eficácia da Curcumina como um corante natural com efeito antimicrobiano, antifúngico e antiinflamatório. O uso da Curcumina como droga fotossensibilizadora eficiente na TFD e IFD de microrganismos foi relatada em alguns trabalhos como BRUZELL, 2005; HAUKVIK *et al.*, 2009; DOVIGO, 2010 e DOVIGO 2011 nos dando bases sólidas para sua escolha como FS

neste presente trabalho, e avaliar assim, sua capacidade antimicrobiana e fotodinâmica em *Mycobacterium massiliense*.

3.6. ESTUDO DE TFD/IFD EM MICOBACTÉRIAS

Trabalhos com micobactérias como modelo de estudo, vem sido desenvolvidos como uma estratégia de tratamento eficiente às micobacterioses em razão a grande resistência deste grupo de bactéria multi-droga e desinfetante resistente. O tratamento longo e não eficaz da antibioticoterapia torna inviável a sua aplicação, principalmente em paciente imunossuprimidos, além da resistência a desinfetantes estar disseminando infecções letais por MCR (GROOTE, 2006; ROSE, 2007; PITOMBO, 2009; FALKINHAM, 2009; LORENA, 2009; FALKINHAM, 2010).

Por este motivo, a TFD vem sendo testada como uma nova opção de tratamento rápido e seguro a este gênero de bactérias, pois não oferece possibilidade de resistência e efeitos colaterais mínimos como: edema, vermelhidão, fotossensibilidade após tratamento, além de dor referente a leve ardor na área de tratamento durante a TFD (WIEGELL, 2006; TAVARES, 2010).

Mycobacterium marinum é a causa de “granuloma de piscina” mais ocorrente em pacientes expostos a peixes ou tanques de peixes. Em reporte de caso, WIEGELL, 2006 após identificar como *Mycobacterium marinum* o microrganismo envolvido em um granuloma na face dorsal do quinto dedo da mão de uma mulher, 50 anos, que regularmente tinha contato com tanques de peixe, foi indicado antibioticoterapia que após 1 mês e meio foi cancelado por falta de melhoria da lesão. *Mycobacterium marinum* contém porfirinas (coproporfirina III) que é ativada pela luz vermelha e em menor medida pela luz azul. Primeiramente, a lesão foi tratada por 10 semanas com 7.8 J/cm² de luz azul o que resultou na resolução da parte mais fina da lesão. A falta do efeito na parte mais espessa desta lesão foi devido a baixa penetração da luz. Luz vermelha foi aplicada posteriormente por penetrar mais profundamente. A lesão foi tratada por 7 semanas a 75 J/cm² e após esse tratamento havia melhorado de aspecto, porém, uma nova lesão se desenvolveu na borda da antiga lesão. In vitro, incubou-se *Mycobacterium. marinum* com ALA mostrando um acumulo de protoporfirina IX após 3 horas. As lesões remanescentes foram tratadas uma vez por semana, durante 3 semanas para acumular profirinas, sendo iluminadas com 37 J/cm² de luz vermelha.

Após TFD, as lesões foram curadas e não observou-se a recorrência após 7 meses do tratamento, indicando que TFD pode ser eficiente no tratamento de “granuloma de piscina”.

Comprovando o fato das espécies do gênero micobactéria acumularem porfirinas, BRUCE-MICAH *et al.*, 2009 avaliaram a farmacocinética dos FS ALA e h-ALA (aminolevulínico benzóico) induzindo a produção de porfirinas nos modelos bacterianos de *Mycobacterium phlei* e *Mycobacterium smegmatis*. Na TFD, o sucesso é dependente da acumulação efetiva nas células bacterianas de substâncias fotoquímicas, denominadas FS que, usualmente são porfirinas.

Neste estudo, foi examinado o acúmulo dos FSs nas duas espécies de micobactéria, que serve de modelo para outras espécies que são importantes patógenos, analisados por microscopia de fluorescência e espectroscopia. As cepas foram sensibilizadas com as diferentes drogas (410nm – 20 mW/cm² à 2 mJ/cm²). A fluorescência foi medida em cubetas, iluminadas por luz LED a 410 nm e 6 mW. O acúmulo das porfirinas foram avaliados pela função do tempo nas diferentes concentrações de ALA e h-ALA. Os resultados mostraram que ambas as cepas das micobactérias testadas, enriqueceram de porfirinas após a administração dos FSs detectadas pelos picos de fluorescência (em torno de 620 nm). Através de análises específicas, a porfirina pode ser identificada, na maior parte, como coproporfirina.

A técnica da TFD foi aplicada *em in vitro* e *in vivo* usando *Mycobacterium bovis*. O'RIORDAN *et al.*, 2006 também reporta a utilização de um gel tridimensional de colágeno como veículo de entrega do FS, inserida subcutaneamente, para induzir especificidade localizada no granuloma das lesões no camundongo. Foi utilizado com agente FS, um derivado da benzoporfirina – Verteporfín que, quando exposto a luz com 690 nm (65 mW/cm²) e fluências de 60 a 100 J/cm² nos estudos *in vitro*. No estudo *in vivo*, o FS foi administrado intravenosamente e deixado circular por 1 hora. Após, o granuloma subcutâneo foi exposto transcutaneamente com a mesma potência da luz na dose de 60 J/cm². Nos estudos *in vitro*, 87% da micobactéria tratada com apenas o FS (sem ativação da luz) sobreviveram quando irradiadas sem o FS, demonstraram uma taxa de sobrevivência de 104%. A TFD obteve uma taxa de morte de 50%. *In vivo*, comparado ao controle, a redução de micobactéria demonstrou que o tratamento de

granulomas com TFD, foi significativamente viável. Concluíram então que a TFD tem potencial tratamento em infecções localizadas por micobactéria como, em granulomas pulmonares e cavitais.

Os mesmos autores, em 2007, testando a TFD com FSs fenotiazínicos (EtNBS (5-ethylamino-9-diethylaminobenzo[a]phenotiazinium chloride) e EtNBSe (5-ethylamino-9-diethylaminobenzo[a]phenoselenazinium chloride)). Iluminaram as colônias de *Mycobacterium bovis* com 635 nm (60 mW/cm²) com fluências de 0 a 80 J/cm². Os resultados mostraram uma taxa de redução $\geq 90\%$ onde acredita-se que, EtNBS e EtNBSe aparecem exibir perfis similares na ação antimicobactericida, em estudo *in vitro*.

Como esforços para o controle da tuberculose dificultada pela emergência de cepas multi-drogas resistentes, neste trabalho foi explorada a viabilidade da espécie de micobactéria pela TFD por GHILADI; FEESE, 2009. *In vitro*, foi aplicada a TFD em *Mycobacterium smegmatis* como substituto de *Mycobacterium tuberculosis* onde foi examinado o tipo de FS, concentração e dose de luz. Os FS utilizados foram:

- (1) Porphirin Tetratosylate – TMPyP [5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinyl)],
- (2) Porphyrin Tetrachloride – TNMAP [5,10,15,20-tetrakis(4-N,N,N-trimethylanilinium)],
- (3) Azul de Metileno (MB),
- (4) Porphyrin – TSPP [(5,10,15,20-tetrakis(4-sulphonatophenil)],
- (5) Porphyrin-Pd(II) – TCPP-Pd [5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenil)] e
- (6) Phthalocyanine tetrasulphonic acid – PhCS.

M. smegmatis ao crescer em cultura, foi incubada a 37° até a densidade óptica de 0.6 – 0.7 a 600nm, correspondente a concentração de $1-3 \times 10^8$ UFC/mL. As culturas foram centrifugadas por 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas num volume total de 5 mL de PBS – Tw 80 a 0,5%, e com as apropriadas concentrações do FS. As células foram incubadas por 5 minutos no escuro. Alíquotas (1 mL) da suspensão bacteriana em PBS, foram adicionadas a placas de 24 orifícios e iluminadas com luz branca (400 – 700nm) com taxas de fluência em 60 mW/cm² e doses de 3.4, 18, 54 e 108 J/cm². Após a iluminação, diluições seriadas

(1:10) de 100µl da suspensão foram realizadas 6 vezes, plaqueadas em Middlebrook 7H10-ADS e incubadas a 37° por 40 horas. Amostras com FS, mas mantidas no escuro (controle do escuro – dark toxicity) e amostras iluminadas apenas, sem FS (controle da luz) serviram como controles. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Os melhores resultados demonstraram que, a inativação fotodinâmica de *M. smegmatis* é encontrada com uma notável redução de 5-6 log em UFC (99,999% + células viáveis erradicadas) quando empregados FS catiônicos pois a alta carga catiônica do FS empregada na micobacteria (Gram(+)) parece ser o primeiro fator de inativação da célula bacteriana. FS Aniônico não foi efetivo mediante a inativação fotodinâmica de *M. smegmatis* devido a sua incapacidade de associação com a membrana celular das micobactérias que são carregadas negativamente.

Apesar da importância clínica das bactérias do gênero *Mycobacterium* ainda são escassos os trabalhos referentes a terapias e inativação fotodinâmica nesse gênero quando comparados a outra espécies bacterianas como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA BACTERIANA

A cepa de *Mycobacterium massiliense* foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) com prévia aprovação da ANVISA. Em anexo, o documento de sua origem e recebimento.

4.2. AGENTES FOTOSSENSIBILIZADORES

O presente estudo teve como finalidade analisar em quais condições a IFD pode ser adequada como controle microbiológico em *Mycobacterium massiliense*. Testada em fase planctônica, o microrganismo foi submetido a ação de dois diferentes FSs: Photogem[®] e Sal de Curcumina.

Aplicando a IFD em *Mycobacterium massiliense* com o fotossensibilizador Photogem[®],

Material e métodos os grupos analisados foram:

L(-) D(-)	ausência de luz e ausência de droga (grupo controle)
L(-) D+	ausência de luz e presença de droga
L+D(-)	presença de luz e ausência de droga
L+D+	presença de luz e presença de droga

onde, para o grupo controle (L-D-) nenhuma dose de luz ou concentração de droga foi utilizada, para analisar a toxicidade da droga no escuro (L-D+) foi utilizado do fotossensibilizador Photogem[®], concentrações de 30, 80, 100, 300, 600 e 1000 µg/ml sem a presença da luz. No grupo L+D- nenhuma concentração da droga foi utilizada e as fluências de luz LED a 630nm foram de 20, 60 e 100 J/cm² e para o grupo L+D+, utilizados o fotossensibilizador nas concentrações de 30, 80, 100, 300, 600 e 1000 µg/ml associadas a irradiações de 20, 60 e 100 J/cm².

Para obtermos as seis concentrações do FS Photogem[®], alíquotas da solução em estoque foram diluídas em solução fosfato tamponada - PBS, com 0,05% de Tween 80 (PBS-Tw) estéril, em dupla concentração, visto que quando estas soluções foram

adicionadas a suspensão bacteriana a concentração de Photogem® foi reduzida pela metade, atingindo-se as concentrações finais relatadas anteriormente. Durante todo o processo de diluição até o início do experimento *in vitro*, ou seja, durante todo o procedimento experimental, o fotossensibilizador foi protegido da luz com a utilização de papel-alumínio.

O Sal de Curcumina utilizada neste estudo (N-Metil-D-Glucominato de Curcumina) a 31,8%, solúvel em água, foi obtida através do extrato da *Curcumina Longa L.*, produzida pela PDT Pharma (Ribeirão Preto – SP – Brasil) e gentilmente cedida pelo IFSC - USP.

Aplicando a IFD em *Mycobacterium massiliense* com o fotossensibilizador Sal de Curcumina, os grupos analisados em fase planctônica foram:

L(-) D(-)	ausência de luz e ausência de droga (grupo controle)
L(-) D+	ausência de luz e presença de droga
L+D(-)	presença de luz e ausência de droga
L+D+	presença de luz e presença de droga

onde, para o grupo controle (L-D-) nenhuma dose de luz ou concentração de droga foi utilizada, para analisar a toxicidade da droga no escuro (L-D+) foi utilizado como FS o Sal de Curcumina, concentrações de 300, 500, 750, 800, 1000, 1100, 1300, 1400 e 1500 µg/ml sem a presença da luz. No grupo L+D- nenhuma concentração da droga foi utilizada e as fluências de luz LED a 460nm foram de 20, 40, 50, 75 e 100 J/cm² e para o grupo L+D+, utilizamos o fotossensibilizador nas concentrações de 300, 500, 750, 800, 1000, 1100, 1300, 1400 e 1500 µg/ml associadas a irradiações de 20, 40, 50, 75 e 100 J/cm².

Para obtermos as nove concentrações do FS Sal de Curcumina, alíquotas da solução em estoque foram diluídas em PBS-Tw estéril em dupla concentração. As diluições e o procedimento experimental para este fotossensibilizador recebeu exatamente o mesmo tratamento que o FS Photogem®.

As soluções de FS foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 μm de porosidade.

4.3. ESCOLHA DO DILUENTE

Para a verificação de qual diluente seria utilizado no presente trabalho, foi realizada prévia pesquisa na literatura. Os diluentes: PBS-Tw, caldos Middlebrook 7H9 e TSB (Tryptoy Soy Broth – Caldo Triptona de Soja) foram os mais citados e assim, determinamos a análise de transmitância e curva de aquecimento para aprovação do uso.

4.4. FONTE DE LUZ

Neste trabalho, como fonte de luz, protótipos de duas mesas iluminadoras com LEDs para estudos de fotobiologia (figura 09), idealizada e desenvolvida por pesquisadores do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP) Campus de São Carlos no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF) intitulada BioTable[®], foram utilizadas.



Figura 9. Detalhes da BioTable[®], mesa iluminadora desenvolvida por pesquisadores da USP – IFSC (ARANTES, 2010).

A mesa possui 54 LEDs RGB (Red Green Blue), revestida internamente com material refletor para que seja possível iluminação uniforme. Sobre as lâmpadas, foi acoplada uma placa de vidro difusora para permitir a emissão de luz em toda a superfície a ser iluminada como suporte para as placas de microtitulação. Um sistema de controle de cor e intensidade dos LEDs foi acoplada à mesa. Para o Photogem[®], a BioTable[®] operou em 630nm (luz vermelha) com irradiância de 50 mW/cm² e a outra para o Sal de Curcumina, em 460nm (luz azul) com irradiância de 36,1 mW/cm².

Na avaliação do Photogem[®], foram utilizadas as doses de luz de: 20, 60 e 100 J/cm² e para a avaliação do Sal de Curcumina, as doses de luz foram de 20, 40, 50, 75 e 100 J/cm².

4.5. PREPARO DO INÓCULO DE *Mycobacterium massiliense*

Neste estudo, para o microrganismo *Mycobacterium massiliense* após o recebimento, foi realizada a hidratação da cultura original liofilizada e preparada culturas estoques em tubos de vidro previamente identificados, em meio de cultura Löwenstein-Jensen (LJ), meio utilizado para isolamento primário de micobactérias, com posterior congelamento das mesmas à -21°C, conforme o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

Para a reativação e posterior utilização do microrganismo, uma alçada da amostra foi retirada do meio LJ e inoculada em 10 ml de caldo Middlebrook 7H9 + OADC 10% contido em tubo de ensaio e posteriormente incubado a 37°C (± 1°C) por sete dias.

Após crescimento, um tubo contendo 10ml de 7H9 + OADC 10% foi inoculado com 100 µl da amostra que foi incubada a 37°C (± 1°C) durante 7 dias. Decorrido este tempo, o tubo anteriormente inoculado foi homogeneizado e agitado por 30 segundos e 100µl desta cultura foi transferida para um novo tubo contendo 10ml de 7H9 + OADC 10%, que foram utilizados para a padronização do inóculo e realização dos experimentos.

Para padronizar o inóculo e o tempo de crescimento do microrganismo para atingir a óptica desejada de 10⁸ UFC/ml, foi realizado o acompanhamento do crescimento a partir de uma cultura do microrganismo. Em diferentes tempo de cultivo,

o tubo foi colocado em agitador de tubos, agitado vigorosamente por 30 segundos e alíquota de 1 ml dessa suspensão, analisada em espectrofotômetro operando em comprimento de onda de 600 nm, onde obtivemos os dados para a curva de crescimento mostrada na figura 10.

A partir dos resultados obtidos, os cultivos para realização dos experimentos foram incubados a 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 3 dias ($\pm 70\text{h}$) até o valor de absorbância entre 0,080 a 0,090 UA (unidade de absorbância), que correspondem a aproximadamente 10^8 UFC/mL conforme determinado experimentalmente.

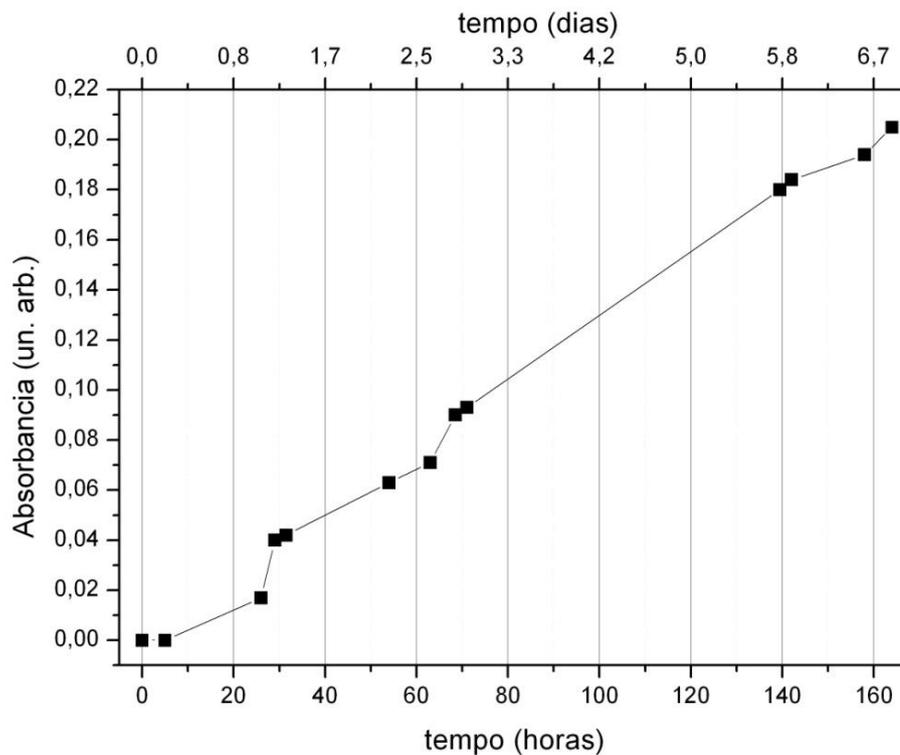


Figura 10. Gráfico da curva de crescimento demonstrando a relação absorbância x tempo, para avaliar e densidade óptica do microrganismo analisado.

4.6. PROCESSAMENTO EXPERIMENTAL DA IFD

Após atingida a densidade óptica, a cultura foi transferida para um tubo de 15ml. Este tubo foi centrifugado em centrífuga por 20 minutos a 3.000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em PBS-Tw

até atingir a densidade óptica (absorbância) de 0,080 a 0,090 determinada em espectrofotômetro.

Depois de confirmada densidade óptica do inóculo, em fluxo laminar com o auxílio de pipeta automática, o inóculo foi adicionado a placa de 24 orifícios. Alíquotas de 500µl da suspensão bacteriana foram depositadas em 3 orifícios diferentes, pois cada grupo testado foi realizado em triplicata. Após isso, foi adicionado 500µl da solução fotossensibilizadora de escolha, respeitando a concentração apropriada para cada grupo testado.

Para o cálculo do tempo de irradiação, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$D = I \cdot t$$

Onde: D é a dose de luz aplicada (J/cm²), I é intensidade de luz ou irradiância (W/cm²) e t, o tempo em segundos.

No grupo controle sem luz e sem droga-FS (L-D-) e no grupo que recebeu somente irradiação LED (L+D-), foram adicionados 500µl de PBS, sem adição de fotossensibilizador para completar o volume do orifício.

No grupo tratado somente com a droga (L-D+; *Dark toxicity*) e no grupo TFD (L+D+), os orifícios foram completados com 500µl as diluições dos fotossensibilizadores. Cobriu-se toda a placa com papel alumínio para proteger contra a luz e aguardou-se o tempo de incubação referente a 5 minutos e para os grupos L-D- e L-D+ os mesmos foram mantidos no escuro pelo tempo máximo experimental.

Após o tempo de incubação e antes da realização da irradiação por luz LED, o papel alumínio foi retirado e a placa foi colocada na BioTable[®], a temperatura ambiente, de acordo com os comprimentos de onda e as fluências (doses de luz) previamente estabelecidas. Decorrido o tempo de irradiação, a placa foi retirada da BioTable[®] e com uma pipeta de 1ml, retirou-se o conteúdo de cada poço (1 ml) que foi posteriormente colocado em tubos contendo 9ml de PBS-Tw. Após realizada a primeira diluição, seguiu-se com diluições seriadas em tubos contendo 0,9ml de PBS-Tw, até a diluição de 10⁻⁵. O mesmo procedimento de diluição foi realizado com os grupos L-D- e L-D+.

As diluições foram feitas em ambiente com baixa iluminação para evitar ativação da droga pela luz.

O plaqueamento das diluições, pelo método de espalhamento (*spread plate*) foi realizado a partir das diluições dos três grupos (A, B e C) em triplicada sob placas de Petri com Agar 7H10 + OADC 10%. Após o procedimento de semeadura, as placas de Petri foram acondicionadas em estufa a 37°C pelo período de 5 a 7 dias. A partir disso foi realizada a contagem manual do número de UFC que representam uma quantificação dos microrganismos sobreviventes em cada grupo testado.

A porcentagem de sobrevivência bacteriana foi definida como sendo a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) dos resultados individuais dos grupos testados, dividida pela média de UFC contadas no grupo controle (L-D-) multiplicada por 100.

4.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi realizada análise estatística dos resultados (porcentagem de sobrevivência,) por meio do teste de análise de variância ANOVA e ANOVA 2WAY. Os resultados que apresentaram diferença significativa $p < 0,05$ foram submetidos ao teste de comparação múltipla de TUKEY, pelo programa Origin versão 8.5.1.

Os resultados também foram analisados utilizando o modelo matemático proposto por GIUSTI I *et al.*, 2008 que nos permite uma análise individual e comparativa dos dados onde, dois parâmetros aplicados são capazes de quantificar a ação fotodinâmica.

5. RESULTADOS

Na figura 11 estão representados os dados da curva de padronização da transmitância dos diferentes diluentes testados. Podemos observar que dos diluentes analisados, o PBS-Tw apresentou menor porcentagem de absorção de luz em diferentes comprimentos de onda.

Além disso, o TSB apresentou transmitância próxima de zero na faixa dos 430 nm e a 660 nm uma transmitância de aproximadamente 85%, considerando então seria prejudicial aos experimentos.

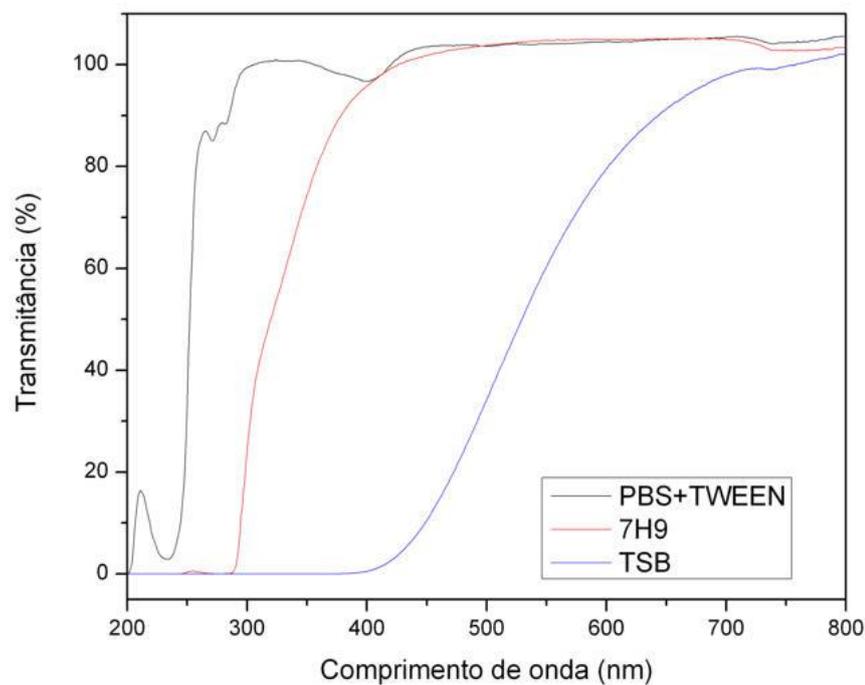


Figura 11. Curva da relação entre três diluentes para escolha do ideal frente à transmitância dos mesmos, como representativo da padronização para o procedimento experimental.

5.1. CURVA DE AQUECIMENTO

Apesar do 7H9 não apresentar transmitância nas faixas de luz utilizadas neste

trabalho, quando se realizou a curva de aquecimento (figuras 12 e 13) utilizando a BioTable[®] vermelha, observou-se que houve elevação de temperatura maior da apresentada pelo PBS-Tw, portanto optou-se por utilizar o PBS-Tw para os experimentos de TFD.

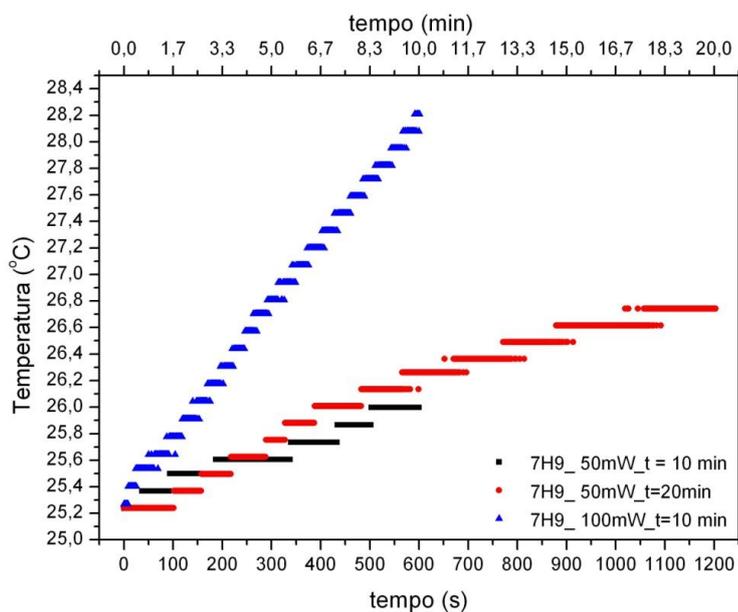


Figura 12. Avaliação do aumento da temperatura (°C) em relação ao tempo sobre Caldo 7H9 com duas potências de luz – 50 e 100 mW, para escolha do melhor diluente.

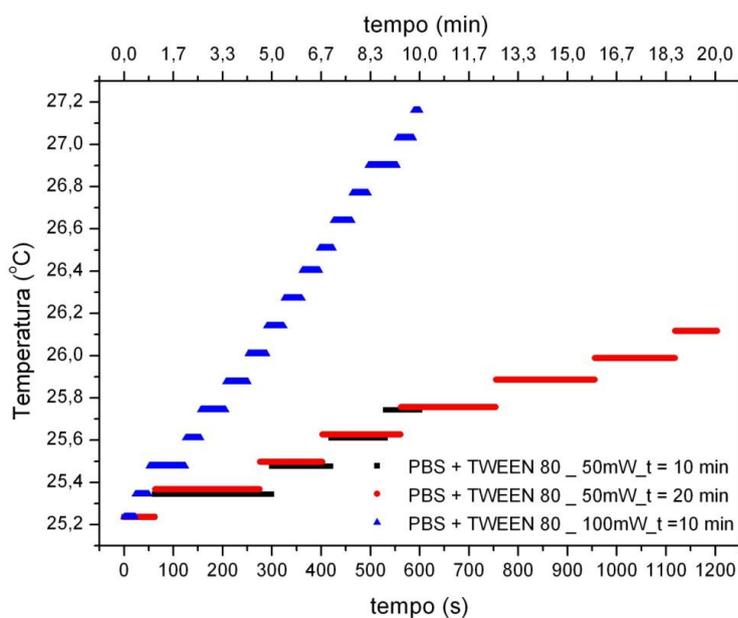


Figura 13. Avaliação do aumento da temperatura (°C) em relação ao tempo sobre PBS + Tween 80 com duas potências de luz – 50 e 100 mW, para escolha do melhor diluente.

5.1. PHOTOGEM®

Os resultados referentes aos estudos utilizando o fotossensibilizador Photogem® sobre a ação fotodinâmica em *Mycobacterium massiliense* estão representados na figura 14, onde se demonstra a dose de luz utilizada em relação à porcentagem de sobreviventes e nas diferentes doses do fotossensibilizador.

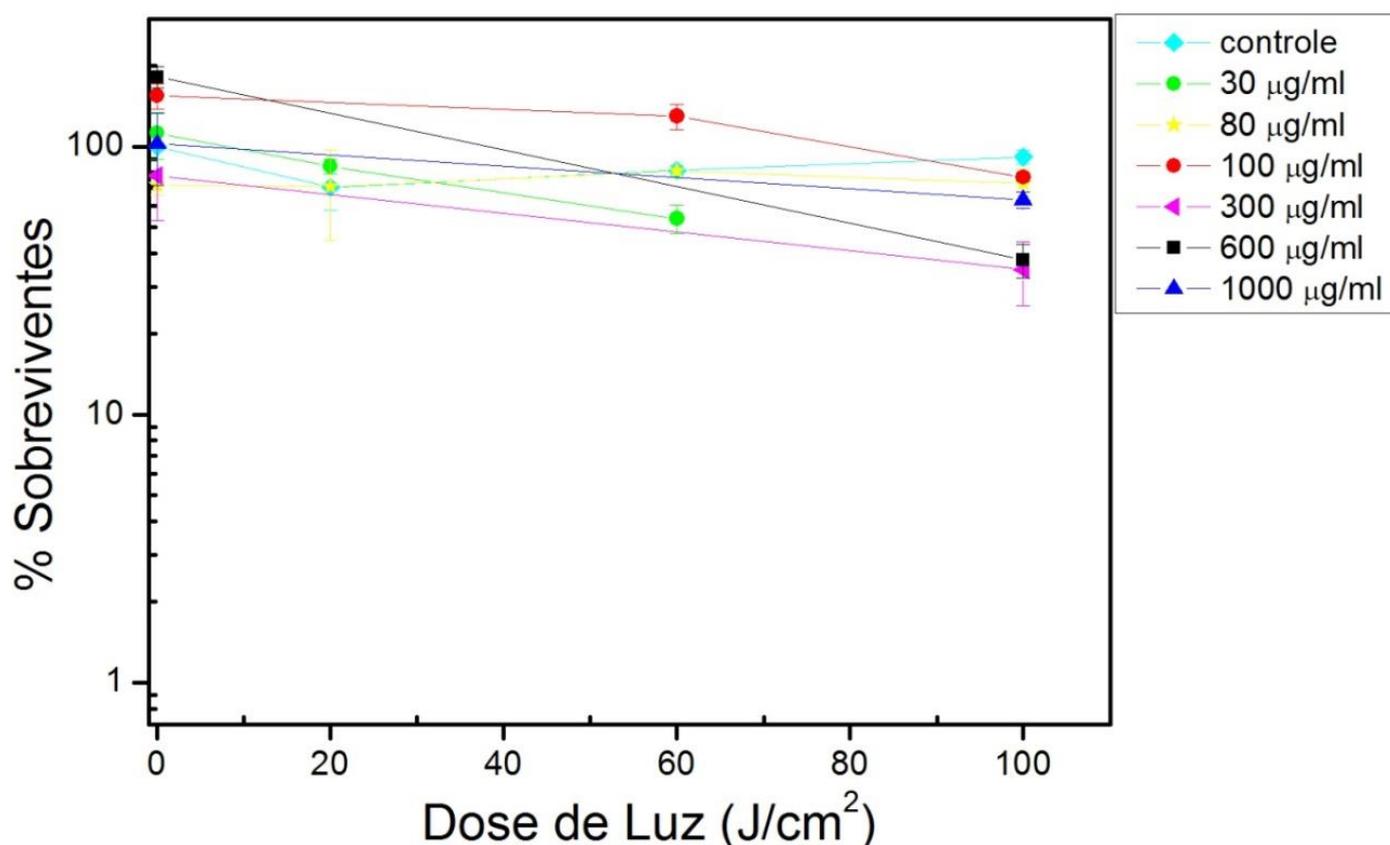


Figura 14. Porcentagem de sobrevivência de *Mycobacterium massiliense* sob ação das diferentes concentrações do fotossensibilizador Photogem® em função das diferentes doses de luz (J/cm²) administradas no procedimento experimental.

Sobre os resultados da fase planctônica apresentados na figura 14, os aspectos mais importantes são:

a) Efeitos da Irradiação LED (L+D-)

Considerando os resultados apresentados na Figura 15, nenhuma redução bacteriana significativa foi observada a partir da irradiação LED operando em 630nm com as fluências anteriormente descritas.

b) Efeitos do Controle da Droga – *Dark Toxicity* (L-D+)

Observando o efeito da presença da droga e ausência da luz (representado na figura 15), foi possível demonstrar que com o FS Photogem® houve uma morte de aproximadamente 20%. A análise de variância dos resultados mostrou diferença significativa entre as médias de porcentagem de sobrevivência dos tratamentos. A comparação das médias são apresentadas na figura 15.

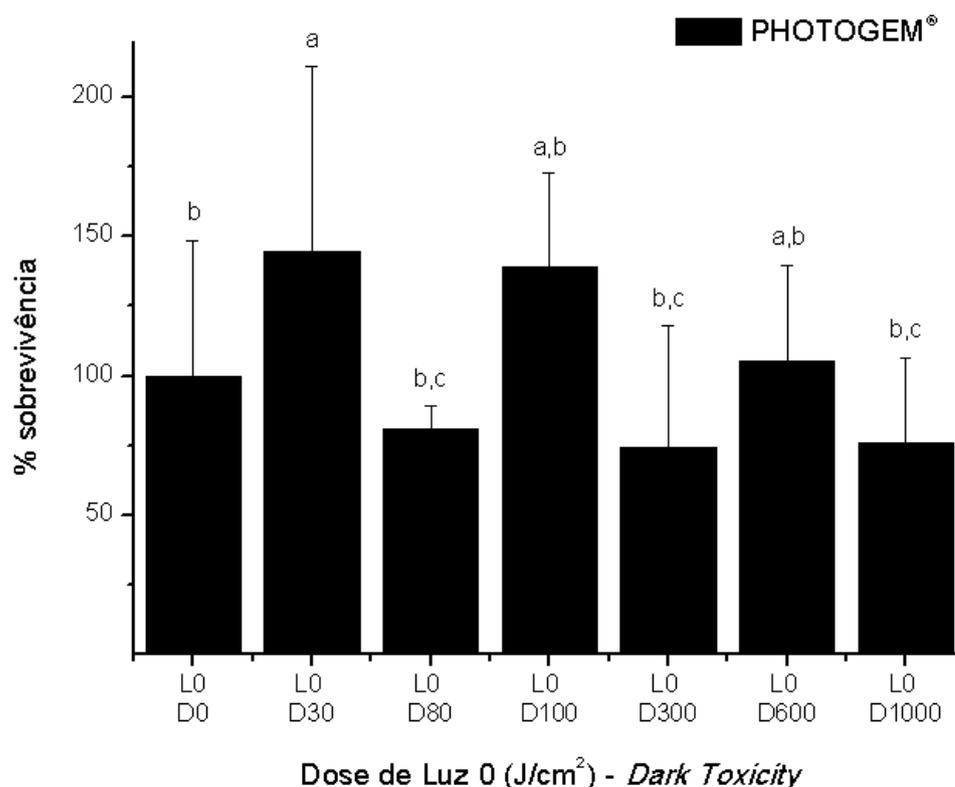


Figura 15. Representação da *Dark Toxicity* – ausência de luz e presença da droga fotossensibilizadora, Photogem®, em todas as concentrações testadas. Letras diferentes representam diferença estatística de $p < 0,05$ através do Teste de Tukey.

c) Terapia Fotodinâmica (L+D+)

O grupo L+D+, onde demonstra o resultado da IFD em *Mycobacterium massiliense* utilizando o FS Photogem®, nas concentrações já descritas, é apresentado na figura 14. Na figura 16 podemos observar que houve redução de 70% e após realizada a análise de variância ANOVA, constatou-se diferença significativa entre as médias de

sobrevivência. A IFD com concentrações de droga acima de 300 μg apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (L-D-).

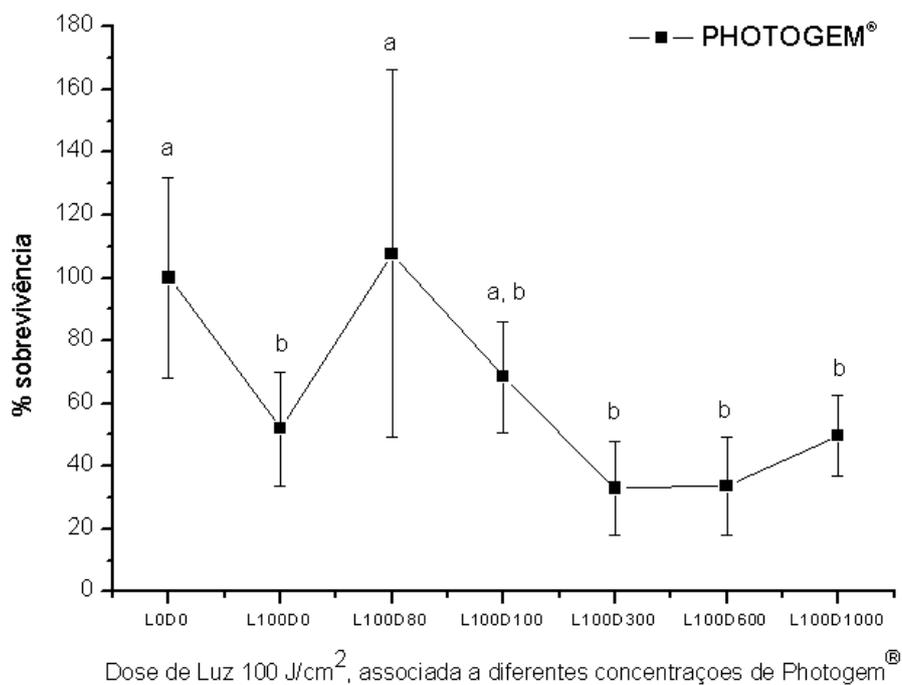


Figura 16. Gráfico representando os grupos controle (L-D-) e (L+D-) associado as doses de luz (J/cm^2) com diferentes concentrações de droga ($\mu\text{g}/\text{ml}$) aplicadas em *M. massiliense*. Letras diferentes representam diferença estatística de $p < 0,05$ através do Teste de Tukey.

5.2. SAL DE CURCUMINA

Os resultados referentes ao estudo utilizando o fotossensibilizador Sal de Curcumina sobre a ação fotodinâmica em *Mycobacterium massiliense*, estão representados nas figuras 17 e 18 em forma de gráfico, onde se demonstra a dose de luz utilizada em relação a porcentagem de sobreviventes.

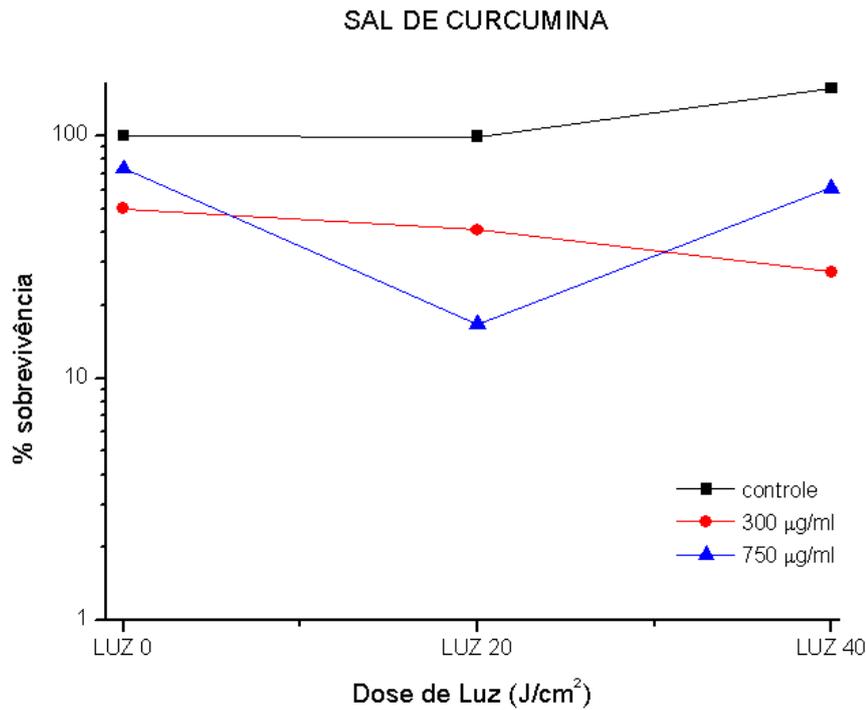


Figura 17. Porcentagem de sobrevivência de *Mycobacterium massiliense* sob ação da IFD com FS Sal de Curcuma nas concentrações de 300 e 750 µg/ml em função das doses de luz 0, 20 e 40 J/cm² administradas no procedimento experimental.

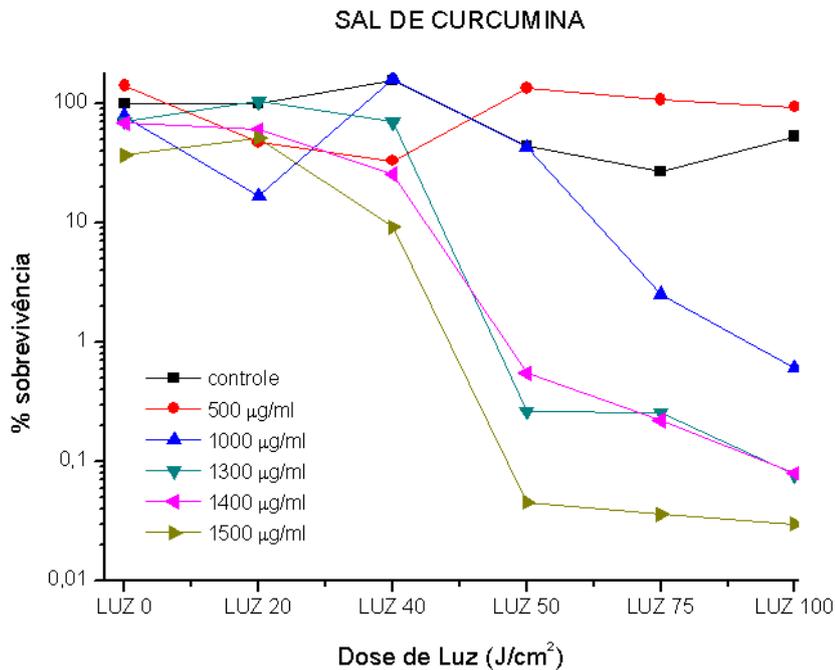


Figura 18. Porcentagem de sobrevivência de *Mycobacterium massiliense* sob ação de nas concentrações de 500, 1000, 1300, 1400 e 1500 µg/ml do fotossensibilizador Sal de Curcuma em função das diferentes doses de luz 0, 20, 40, 50, 75 e 100 J/cm² administradas no procedimento experimental.

Sobre os resultados da fase planctônica apresentados na figura 17 e 18, os aspectos mais importantes são:

a) Efeitos da Irradiação LED (L+D-)

Considerando os resultados apresentados na Figura 19, e análise de variância ANOVA, pode-se observar uma redução bacteriana estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi observada a partir da irradiação LED de 50 J/cm^2 operando em 460nm comparado ao controle (L-D-).

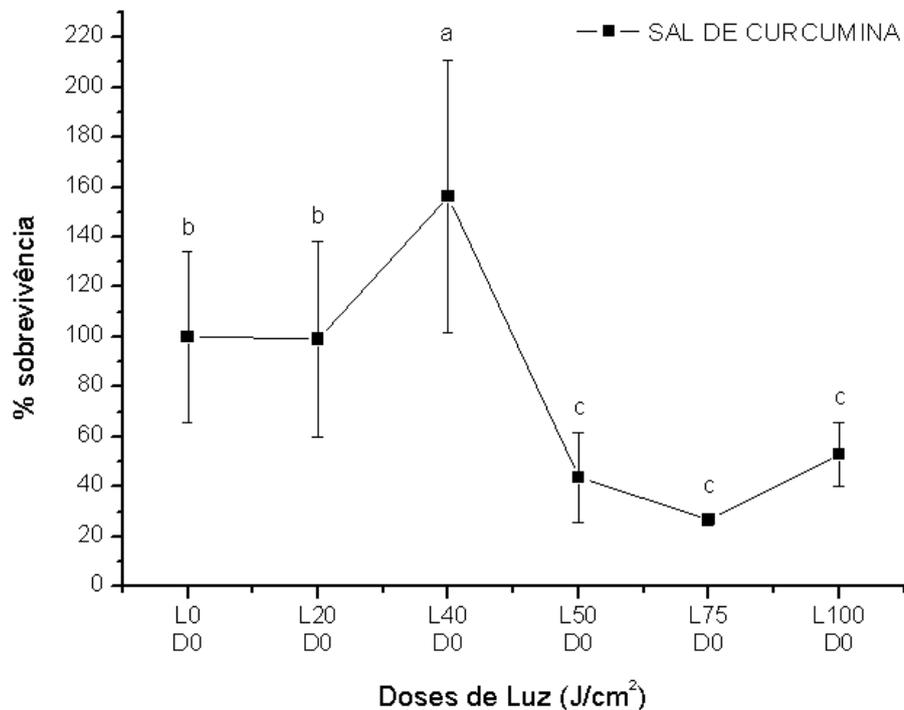


Figura 19. Gráfico representando os grupos controle (L-D-) e (L+D-) associado as doses de luz (J/cm^2) com diferentes concentrações de droga ($\mu\text{g/ml}$) aplicadas em *M. massiliense*. Letras diferentes representam diferença estatística de $p < 0,05$ através do Teste de Tukey.

b) Efeitos do Controle da Droga – *Dark Toxicity* (L-D+) observou que o aumento da droga, aumentou a porcentagem de morte, comprovando então, ser dose-dependente. Observando o efeito da presença da droga e ausência da luz (representado na figura 20), foi possível observar que o FS Sal de Curcumina apresentou a porcentagem de morte máxima em aproximadamente 64%.

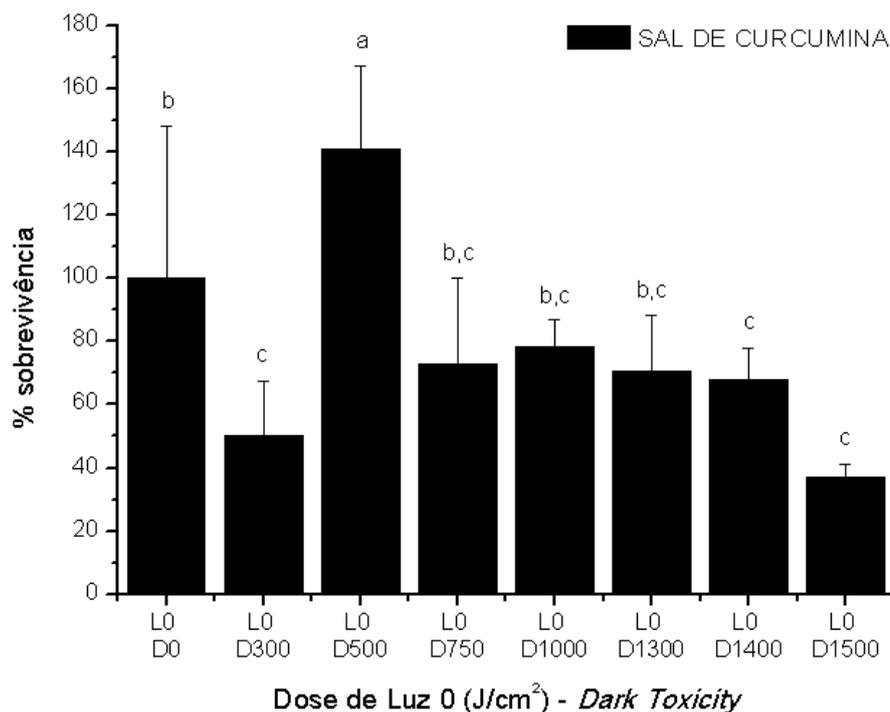


Figura 20. Representação *Dark Toxicity* – ausência de luz e presença da droga fotossensibilizadora, Sal de Curcumina, em todas as concentrações testadas.

c) Terapia Fotodinâmica (L+D+)

O grupo L+D+, onde demonstra o resultado da Terapia Fotodinâmica em *Mycobacterium massiliense* utilizando o fotossensibilizador Sal de Curcumina, nas concentrações já descritas, é apresentado nas figuras 17 e 18. De acordo com os resultados apresentados nestes gráficos, observamos que para o grupo L+D+, onde a Inativação Fotodinâmica foi aplicada, obtivemos uma redução bacteriana significativa a partir da fluência de 50 J/cm² associada a concentração mínima do fotossensibilizador que foi de 1300 µg/ml. A partir destes resultados apresentados, é possível determinar que o fotossensibilizador Sal de Curcumina apresentou redução acima de 3 ordens logarítmicas (3-4log¹⁰).

Após realizar análise de variância ANOVA 2WAY, verificou-se diferença significativa entre a luz, droga e luz/droga. Na figura 21 verificamos que não houve diferença significativa em relação às doses de luz 50, 75 e 100 J/cm² onde estas foram estatisticamente significantes em relação as doses menores de 20 e 40 J/cm².

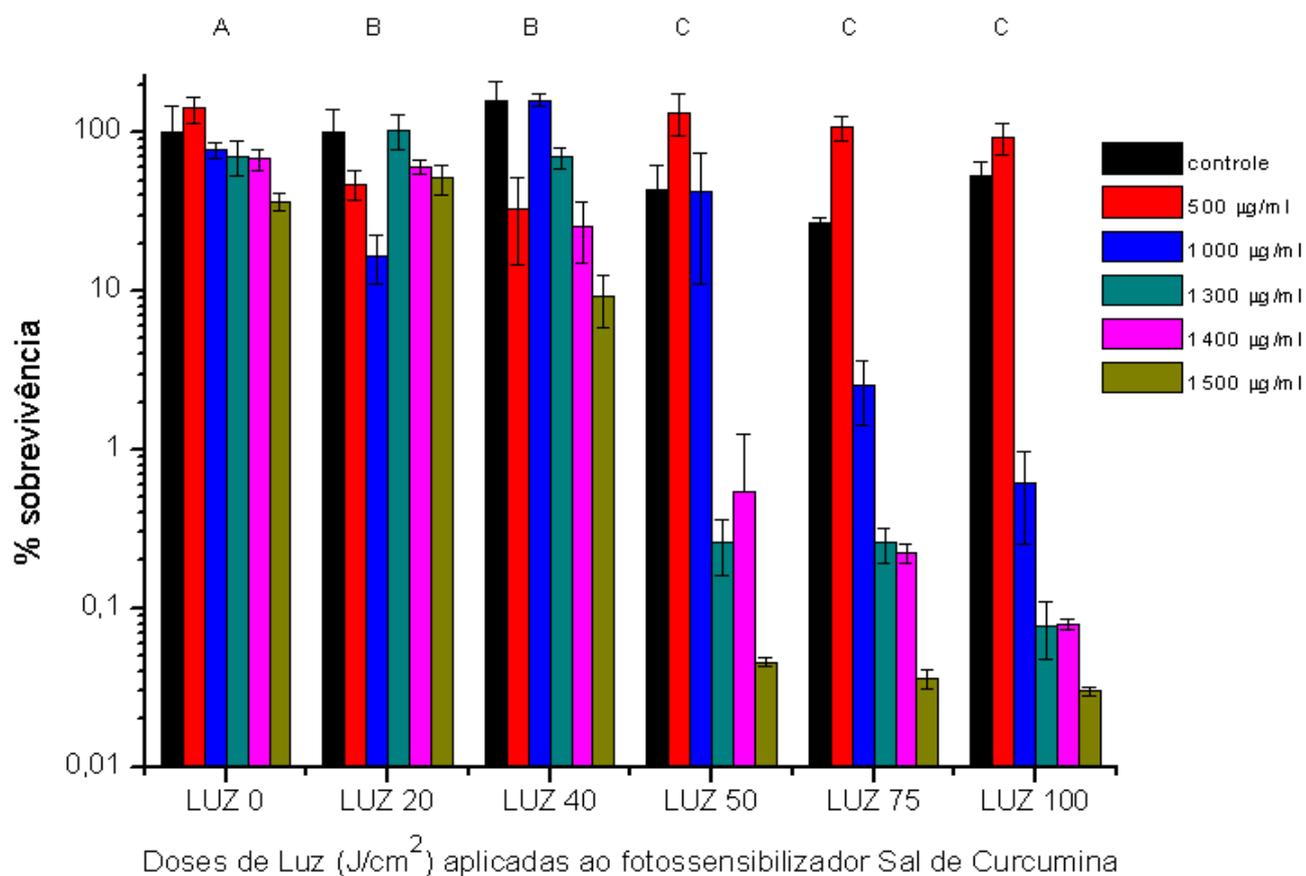


Figura 21. Gráfico com as letras maiúsculas com todas doses de luz e drogas. Diferentes letras (maiúsculas) apresentam diferenças significativas $p < 0,05$ pelo teste de TUKEY após ANOVA 2WAY.

5. 3. RESULTADOS ANALISADOS SEGUNDO O MODELO MATEMÁTICO PROPOSTO POR GIUSTI *et al.*, 2008

Através dos resultados obtidos (figura 26 da página 57), são apresentados os valores de C_0 e D_0 para o FS Photogem[®] e Sal de Curcumina. Na figura 22 são apresentados os valores médios da taxa de sobrevivência (SF) obtidos pelos resultados experimentais com o Photogem[®] (*Dark Toxicity*) e a curva de ajuste para cálculo do C_0 .

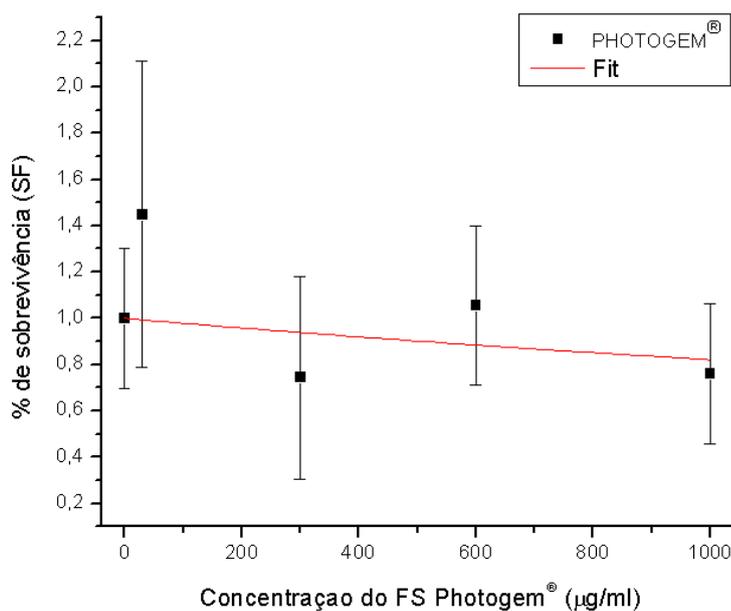


Figura 22. Porcentagem de sobrevivência de *M. massiliense* em relação a concentração de Photogem® apresentando os valores médios e desvio padrão dos dados experimentais e a curva de ajustada (FIT) pela equação $SF = 1/(1+C/4602,35)$

Da mesma forma, são apresentados na figura 23 valores médios da taxa de sobrevivência (SF) obtidos pelos resultados experimentais com o Sal de Curcumina (*Dark Toxicity*) e a curva de ajuste para cálculo do C_0 .

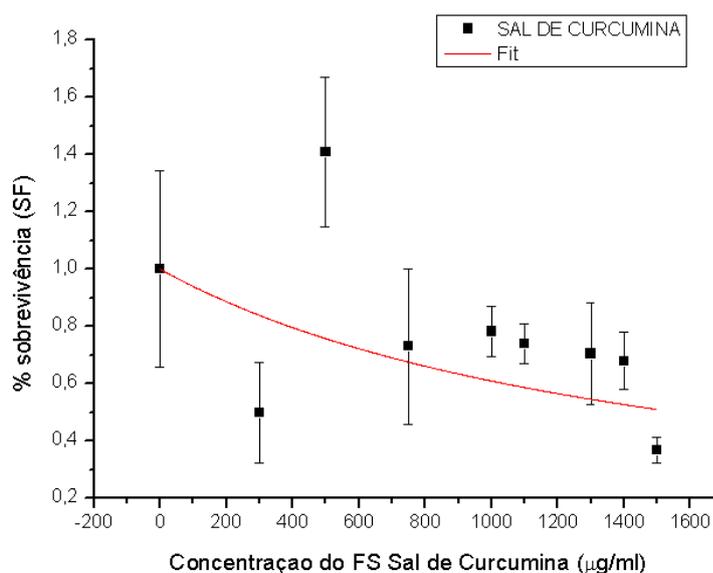


Figura 23. Porcentagem de sobrevivência de *M. massiliense* em relação a concentração de Sal de curcumina apresentando os valores médios e desvio padrão dos dados experimentais e a curva de ajustada (FIT) pela equação $SF = 1/(1+C/1562,94)$

Após a determinação dos valores de C_0 e D_0 , as curvas teóricas obtidas através do modelo proposto por GIUSTI *et al.*, 2008 quando da interação Droga+Luz, são apresentados na figura 24 e 25.

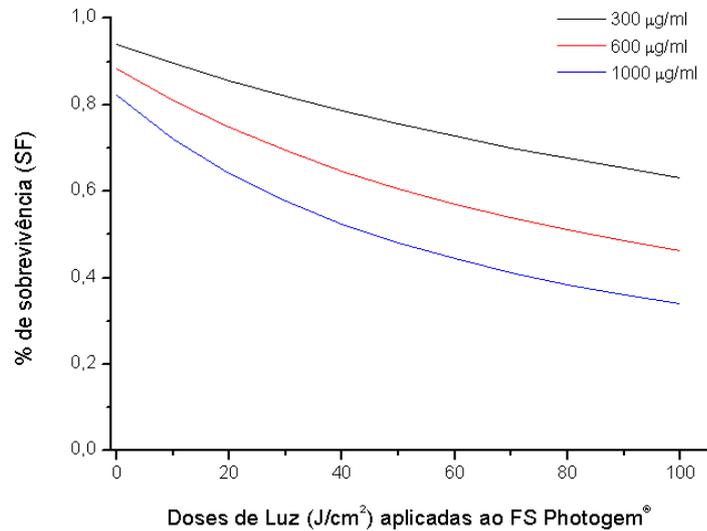


Figura 24. Curvas teóricas da Porcentagem de sobrevivência de *M. massiliense* em relação a concentração de Photogem® e a dose de luz (IFD) ajustadas pela equação $SF = 1/[1+C/4602,35x(1+D/12,58)]$

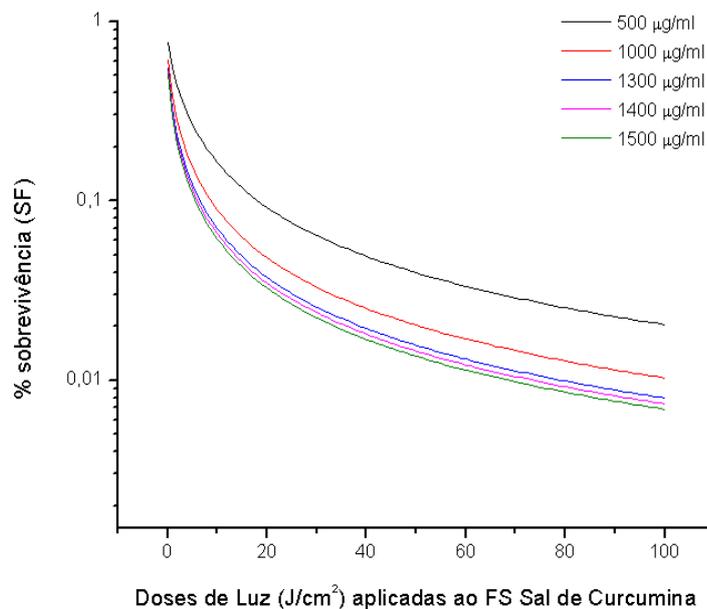


Figura 25. Curvas teóricas da Porcentagem de sobrevivência de *M. massiliense* em relação a concentração de Sal de curcumina e a dose de luz (IFD) ajustadas pela equação $SF = 1/[1+C/1562,94x(1+D/0,67)]$.

6. DISCUSSÃO

Para inativação de espécies microbianas, desde bactérias até fungos, e para eliminação de células de origem tumoral, a terapia fotodinâmica tem sido empregada atualmente (AHN *et al.*, 2004; LAMBRECHTS, 2005).

Uma união entre energia luminosa e FS gera uma cascata de eventos oxidativos levando a formação tanto de radicais livres (reação do tipo I) como oxigênio singlete (reação do tipo II), onde esses produtos são capazes de promover o estresse oxidativo, resultando na morte celular devido aos danos causados nas mitocôndrias, lisossomos e na membrana citoplasmática. Qualquer tipo celular está sujeito a esse estresse por espécies reativas de oxigênio (EROs), dessa forma, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e os demais radicais livres interagem através de vários mecanismos, sobre as diferentes estruturas celulares dos microrganismos, como proteínas, ácidos nucleicos e membranas lipídicas, resultando em morte celular por danos na estrutura (KONOPKA, 2007).

Essa variedade de mecanismos de ação em diferentes estruturas intracelulares dificulta o desenvolvimento de resistência dos microrganismos a essa terapia (DONELLY, 2008), como demonstrou TAVARES *et al.*, 2010 que, para demonstrar a resistência bacteriana após o tratamento com TFD, utilizou o 5,10,15-tris(1-Methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl)-porphyrin triiodide (Tri-Py⁺-Me-PF), uma porfirina tricatiônica, como FS e irradiação sobre bactérias Gram(-) sendo elas, *Vibrio fischeri* e *Escherichia coli* com luz branca (40 Wm^2) durante 270 minutos. O estudo mostrou que o FS destruiu eficazmente as Gram(-) testadas após TFD, sem a recuperação da viabilidade bacteriana, e, posteriormente, confirmando que bactérias fotossensibilizadas com este FS não desenvolveram mecanismo de resistência contra o processo fotodinâmico, por não ter sido recuperada sua viabilidade durante a TFD por 10 gerações seguintes.

Levando em consideração, aspectos com esses, muitos fatores estão relacionados a toxicidade da TFD, como a natureza do FS, o tipo celular, intensidade da luz, e o tempo de incubação da droga (HSIEH, 2003).

No presente estudo, foi verificado uma baixa toxicidade da IFD pelo Photogem[®] em *M. massiliense* e uma toxicidade que reduziu três ordens logarítmicas pelo Sal de

Curcumina, sugerindo que o Sal de Curcumina tem possibilidade de ser utilizado como fotossensibilizador para inativação de *M massiliense*.

Neste estudo também foi observado que não houve relação entre o aumento da concentração do FS e da dose de luz em relação a morte da bactéria estudada pelo Photogem[®], porém houve essa relação entre o Sal de Curcumina. Nos grupos submetidos a IFD com LED vermelha, a menor concentração do FS (Photogem[®] a 30 µg/ml) utilizada apresentou resultados semelhantes aos obtidos quanto a maior (1.000 µg/ml) foi utilizada, independente do tempo de irradiação, mostrando a baixa toxicidade do Photogem[®] as micobactérias. Em relação a IFD associada a curcumina, a menor concentração do FS (Sal de Curcumina a 300µg/ml) utilizada, apresentou menor toxicidade comparada as maiores (1.000, 1.300 e 1.400µg/ml).

Os dados da IFD com Photogem[®] deste presente trabalho divergem com outros estudos, nos quais foi observado o efeito dose-dependente entre concentração de FS e toxicidade da IFD para microrganismos, além de também divergir quando a mesma literatura nos mostra que o Photogem[®] pode ser um bom FS quando aplicado às bactérias Gram(+) (BRUZELL, 2005; GIUSTI *et al.*, 2008; GOES, 2010; FERRAZ, 2011), pois neste referido trabalho, o Photogem[®] não apresentou uma fototoxicidade favorável a inativação da bactéria estudada. Isso pode ser devido às características das bactérias do gênero *Mycobacterium*, contarem com a presença de ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa de C78-C90), ceras e fosfatídios, e principalmente por possuírem uma complexa parede celular rica em lipídios, onde esta é responsável por muitas das propriedades características do gênero que lhes confere resistência a ácidos, crescimento lento, resistência a detergentes, resistência a antibióticos comuns, sua estrutura básica da parede celular é típica das bactérias Gram(+): uma membrana citoplasmática interna recoberta por espessa camada de peptidoglicano sem membrana externa (MIMS *et al*, 1999; MURRAY *et al*, 2000) - são os motivos pelo qual o fotossensibilizador Photogem[®] não foi eficiente para seu controle.

É conhecido que bactérias Gram(+), geralmente, são mais susceptíveis a IFD enquanto as espécies Gram(-) são significativamente resistentes a muitos FS comumente usados em TFD de tumores (HAMBLIN; HASAN, 2004), contudo, os resultados são um tanto quanto inconclusivos. DOBSON, 1992 usando um derivado de

hematoporfirina (mesma classe do Photogem[®]) a 0,005% e laser a 5,5 J/cm² (7.3mW) não reportou nenhum resultado favorável para Gram(-) enquanto WILSON, 1993 notificou uma fotossensibilização letal em Gram(-) quando suspenso em solução, mas não em biofilme. SHARMA, 2008 comenta que para bactérias Gram(-), tem sido utilizado EDTA para aumentar a permeabilidade de algum fotossensibilizadores aniônicos.

Em DADRAS *et al.*, 2006 relata-se que bactérias Gram(+) como *Staphilococcus aureus*, tem uma espessa parede celular composta de camadas de peptidoglicano que podem prevenir a luz de penetrar no interior das camadas, por outro lado, bacterias Gram(-), como *P. aeruginosa*, tem uma fina camada de parede celular cercada por outra membrana semipermeável que permite a luz penetrar na cadeia respiratória na membrana citoplasmatica , sendo então absorvida e começando as reações de bioestimulação primária.

Como já dito, as micobactérias possuem características Gram(+), porém, sua espessa camada lipídica é comparada com a membrana nuclear dos fungos que pode representar uma barreira adicional a penetração do FS (PERUSSI, 2007).

As diferenças encontradas na susceptibilidade à TFD antimicrobiana entre bactérias de mesma classificação Gram, dependem tanto de fatores que podem ser peculiares das barreiras de permeabilidade das membranas mas também de diferenças nas enzimas antioxidantes no DNA ou até mesmo de mecanismos de reparo do DNA bem como de fatores simples, tais como tamanho da célula microbiana. É válido ressaltar também, que as características de cada FS é muito importante, pois a hidrofobicidade e a presença de cargas nos FSs levam a diferentes interações com as organelas, desse modo, a ação fotodinâmica de um corante positivo pode ocorrer na mitocôndria, enquanto que a de um corante negativo pode ocorrer na membrana nuclear para uma mesma classe de bactérias, por exemplo, relata PERUSSI, 2007.

Apesar de uma grande variabilidade de resultados advindos dos experimentos de cultura deste presente trabalho, nota-se claramente que há um efeito de toxidade no escuro (*Dark Toxicity*), e ao mesmo tempo, nota-se um efeito da luz adicionando certa fototoxicidade aos microrganismos.

Este fato é claramente observado quando comparamos os resultados do uso do Photogem[®] sem luz e ao longo do aumento da concentração, mostrando a tendência de diminuição da taxa de sobrevivência. Semelhantemente, o uso de 100 J/cm² mostra diminuição quando comparado a 0 J/cm².

Com relação ao uso do Sal de Curcumina, também notamos a presença da ação tóxica e fototóxica. Neste caso, porém, um efeito merece destaque: na ausência da luz, a fototoxicidade mostra tendência a diminuição com a concentração, mas ao verificarmos a variação da fototoxicidade notamos uma transição de comportamento para doses superiores a 50 J/cm². Este comportamento evidenciado pelo gráfico da figura 18 demonstra que a dinâmica droga+luz neste microrganismo apresenta complexidades não comuns nos demais sistemas.

Comumente uma dependência mais suave é observada, e isso pode ser devido ao fato que a luz acima de 50 J/cm² pode gerar sub-produtos da curcumina (que é instável sob luz), que acabam ajudando no processo. Certamente há outras hipóteses, mas que não poderão ser consideradas com os dados gerados no presente experimento.

Considerando que há *Dark Toxicidade* e fototoxicidade, podemos elaborar um modelo aproximado que nos permite uma análise individual e comparativa mais adequada.

Neste sentido, adotamos o modelo proposto por GIUSTI, *et al.*, 2008 onde dois parâmetros permitem quantificar a ação fotodinâmica em nosso sistema.

O modelo pede que aplicando uma certa concentração (C) de fotossensibilizador e uma certa dose de luz (D), a quantidade de microrganismos sobreviventes (SF) deve obedecer a relação:

$$SF = 1 / [1 + C/C_0(1 + D/D_0)]$$

Nesta expressão, C₀ representa a quantificação de toxidade no escuro do FS e D₀ representa a fototoxicidade inicial. Os dados experimentais foram aplicados ao modelo e apresentados nas figuras de 22 a 25.

Adotemos o procedimento de ajuste das curvas aos pontos médios de SF experimentais utilizando a função já descrita, pois este procedimento nos fornece as constantes C_0 e D_0 previstas no modelo.

Nas figuras.22 a 25 foram apresentados as melhores curvas de ajuste (FIT) obtidas, através das curvas sólidas que ajustam os pontos das médias e desvios padrões dos resultados experimentais.

Os valores obtidos para as constantes são:

	C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	D_0 (J/cm^2)
PHOTOGEM [®]	4602,35	12,58
SAL DE CURCUMINA	1561,94	0,67

Figura 26. Valores de C_0 e D_0 calculados pelo ajuste dos dados experimentais

Em primeiro lugar, vemos que o elevado valor de C_0 , mostra que a ação direta do FS no microrganismo demonstra uma grande dificuldade de ação sobre o microrganismo *Mycobacterium massiliense*. Ambos FS apresentaram elevado C_0 , tornando difícil a ação da luz futura. Quanto mais C_0 , mais difícil é a interação com o microrganismo.

Apenas para comparação, níveis de C_0 da ordem de 300 a 800 $\mu\text{g/ml}$ foram relatados por GIUSTI *et al* 2008. A dificuldade de interação do fotossensibilizador sozinho com o microrganismo já pode indicar dificuldades no seu uso.

Os valores de D_0 para o Photogem[®] também mostram-se demasiadamente elevado para uma ação fotodinâmica. A combinação de um elevado C_0 e um elevado D_0 , torna a ação fotodinâmica para este microrganismo pouco significativa.

Da relação $SF = 1 / [1 + C/C_0(1 + D/D_0)]$ um grande valor do produto C_0D_0 , torna o efeito da luz menos significante. Comparando C_0D_0 para ambos FS usados, tiramos que

$$C_0D_0 = 5,8 \cdot 10^4 \text{ (Photogem}^{\text{®}}\text{)}$$

$$C_0D_0 = 1,0 \cdot 10^3 \text{ (Sal de Curcumina)}$$

Isto torna o Photogem[®] 58 vezes menos fotodinâmico do que o Sal de curcumina. Este fato está certamente revelado através dos resultados obtidos.

Apesar do Sal de Curcumina ser marcadamente melhor que o Photogem[®], ainda ele mesmo apresenta um coeficiente C_0D_0 grande comparado a outros valores de CD praticados em nossos experimentos.

É claro que ao atingirmos a região acima de 50 J/cm^2 como concentração acima de $1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$, temos $CD \sim 5 \cdot 10^4$, tornando o efeito fotodinâmico mais acentuado.

É importante que novos estudos envolvendo a IFD sejam desenvolvidos para determinar melhores parâmetros de energia e ação de novos fotossensibilizadores de forma que, esta inativação seja empregada com sucesso no controle de micobactérias.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o FS Photogem[®] até a concentração de 1000µg/ml não foi efetivo na redução do número de UFC de *M. massiliense*.

Em contraponto, o fotossensibilizador Sal de Curcumina foi efetivo, com redução de 3-4 ordens logarítmicas, a partir da concentração de 1300 µg/ml com dose de luz a 50 J/cm² comparado ao grupo controle.

Assim, estes dados sugerem que o Sal de Curcumina sob ação fotodinâmica é uma alternativa viável para a redução de *M. massiliense* quando testadas *in vitro*.

8. REFERÊNCIAS

ACKROYD, R; KELTY, C; BROWN, N; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v.74, p.656-69, 2001.

ADÉKAMBI, T., BERGER, P., RAOULT, D., DRANCOURT, M. 2006. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 133-143.

AHN, W. S.; BAE, S. M.; HUH, S. W.; LEE, J. M.; NAMKOONG, S. E.; HAN S. J. Necrosis-like death with plasma membrane damage against cervical cancer cells by photodynamic therapy. **Int J Gynecol Cancer**. 2004;14:475-82.

ALLISON RR, DOWIE GH, CUENCA R, HU X-H, CHILDS CJH, SIBATA CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004;1:27-42.

BAGNATO, V.S. Luz contra os agressores. On line Pesquisa Fapesp, São Paulo, set. 2007. Coluna Fiat Lux. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=4221&bd=2&pg=1&lg=>>. Acesso em 09 jul. 2010.

BHAVANISHANKAR, T. N.; MURTHY S. V. Effect of turmeric fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria in vitro. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 17, p. 1363-1366, 1979.

BLACK, J. G. Microbiology - principles and explorations, 7ª edição, ed. Wiley, 2008.

BONNET, R.; BERENBAUM, M. C. HPD – a study of its components and their properties. **Adv Exp Med Biol**, v.160, p.241-50, 1983.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Micobactérias**: nota técnica 08/08/2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.p](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.pdf)
[df](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.p)> Acesso em : 29 set. 2008.

BRUZELL, E. M.; MORISBAK, E.; TØNNESEN, H. H. Studies on curcumin and curcuminoids XXIX. photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected preparations. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.4, n.7,p. 523-530, July 2005.

BRUZELL, E.M., MORISBAK, E., TONNESEN, H.H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem. Photobiol Sci.*, 2005, **4**, 523-530.

CALIN, M. A.; PARASCA, S.V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. **Lasers Med Sci.** 2009;24:453 – 460.

CARDOSO, A. M.; SOUZA, E. M.; VIAN-NIERO, C.; BORTOLI, F. B.; NEVES, Z. C. P.; LEÃO, S. C.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. Emergence of nosocomial mycobacterium massiliense infection in Goiás, Brazil. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1552-1557, 2008.

CHERNOVIZ, P. L. N. **A grande farmacopéia brasileira:** formulário e guia médico. 19 ed. Belo Horizonte: Itatiaia Ltda, 1996. v. 2. p. 632-634.

DADRAS, S.; MOHAJERANI, E.; EFTEKHAR, F.; HOUSSEINI, M. Different photoresponses of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa to 514, 532 and 633 low level lasers in vitro. **Current Microbiology**. v. 53, p. 282-286. Oct. 2006.

DOBSON, J.; WILSON, M. (1992). Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from low-power laser. **Arch. Oral. Biol.** 37, 883–887.

DONNELLY R. F.; McCARRON P. A.; TUNNEY M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiol Res.** 2008;163:1-12.

DOUGHERTY, T. J.; GRINDEY, G. B.; FIEL, R.; WEISHAUPT, K. R.; BOYLE, D. G. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. **J Natl Cancer Inst**, v.55, p.115-21, 1975.

DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUPT, K. R.; BOYE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res**, v.38, p.2628-35, 1978.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; MIMA, E. G. O.; GIAMPAOLO, E. T.; VERGANI, C. E.; BAGNATO, V. S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, Berlin, 2010.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, A. P.; BRUNETTI, I. L.; COSTA, C. A. S.; JACOMASSI, D. P.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, 87:895-903, 2011.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; CARMELLO, J. C.; MACHADO, A. L.; BRUNETTI, I. L.; BAGNATO, V. S. Susceptibility of Clinical Isolates of *Candida* to Photodynamic Effects of Curcumin. **Laser in Surgery and Medicine**. 43:927-934. 2011.

DUARTE, R. S.; LOURENÇO, M. C. S.; FONSECA, L. S.; LEO, S. C.; AMORIM, E. L. T.; ROCHA, I. L. L.; COELHO, F. S.; VIANA-NIERO, C.; GOMES, K. M.; DA SILVA, M. G.; DE OLIVEIRA LORENA, N. S.; PITOMBO, M. B.; FERREIRA, R. M. C.; DE OLIVEIRA G.; M.H.; DE OLIVEIRA, G. P.; LUPI, O.; VILACA, B. R.; SERRADAS, L. R.; CHEBABO, A.; MARQUES, E. A.; TEIXEIRA, L. M.; DALCOLMO, M.; SENNA, S. G.; SAMPAIO, J. L. M. 2009. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **J. Clin. Microbiol.** 47:2149–2155.

EISENSTADT, J., HALL, G.S. Microbiology and classification of mycobacteria. **Clin. Dermatol.**, v.13, n.3, p.97-206, 1995.

FERRAZ, R. C. M. C.; FONTANA, C. R.; DE RIBEIRO, A. P.; TRINDADE, F. Z.; BARTOLONI, F. H.; BAADER, J. W.; LINS, E. C.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Chemiluminescence as a PDT light source for microbial control. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 103 (2011) 87–92.

GAD F., ZAHRA T., HASAN T., HAMBLIN, M.R. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob Agents Chemother.** 2004; 48:2173–2178.

GANGADHARAM, P. R. J.; JENKINS, P. A.; *Mycobacteria*. I. Basic aspects, Chapman & Hall Medical Microbiology Series. Singapore: International Thomson Publishing, 1998.

GILSON, D.; ASH, D.; DRIVER, I.; FEATHER, J. W.; BROWN, S. Therapeutic ratio of photodynamic therapy in the treatment of superficial tumors of skin and subcutaneous tissues in man. **Br J Cancer**, v.58, p.665-7, 1988.

GIUSTI, J. S. M., SANTOS-PINTO, L., PIZZOLITO, A. C., HELMERSON, K., CARVALHO PINTO, E., KURACHI, C., BAGNATO, V. S. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light - emitting diode light source - Photomedicine Laser Surg **26(4)**: 279 – 285. 2008.

GOIS, M. M.; KURACHI, C.; SANTANA, E. J. B.; MIMA, E. G. O.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; PELINO, J. E. P.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an *in vitro* study. **Laser Med Sci** (2010) **25**:391-395.

GRANGE, J. M. The Mycobacteria. In: TOPLEY and WILSON. Principles of bacteriology, virology and immunity. London, 1990. p.74101.

HAUKVIK, T.; BRUZELL, E.; KRISTENSEN, S.; TONNESEN, H. H. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**. 2009 Oct; 64(10): p. 666-73.

HEGGE, A. B.; ANDERSEN, T.; MELVIK, J. E.; BRUZELL, E.; KRISTENSEN, S.; TONNESEN, H. H. Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: studies on curcumin and curcuminoids XLII. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, **100**: 174–185.

HSIEH, Y. J.; WU, C. C.; CHANG, C. J.; YU, J. S. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. **J Cell Physiol**. 2003;194:363-75.

JITOE, A.; MASUDA, T.; TENGAH, I.G.P.; SUPRAPTA, D.N.; GARA, I.W.; NAKATANI, N. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 1337-1340, 1992.

KELLY, J. F.; SNELL, M. E.; BERENBAUM, M. C. Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. **Br J Cancer**, v.31, p.237-44, 1975.

KESSEL, D.; THOMPSON, P.; MUSSELMAN, B.; CHANG, C. K. Probing the structure and stability of the tumor-localizing derivative of hematoporphyrin by reductive cleavage with LiAlH₄. **Cancer Res**, v.47, p.4642-5, 1987.

KIM, D. S. H. L.; PARK, S. Y.; KIM, J. Y. Curcuminoids from *Curcumina longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC 12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from β A(1-42) insult. **Neuroscience Letters**, v. 303, p. 57-61, 2001.

KONOPKA K.; GOSLINSKI T.; Photodynamic Therapy in Dentistry. **J Dent Res**. 2007; 86:694-707.

LAMBRECHTS S. A. G.; ALDERS M. C. G.; VAN MARLE J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. **Antimicrob Agents Chemother**. 2005; 49:2026-34.

LAUSTRIAT, A. L.; NELSON, I. L.; COX, M. M. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. In: (Ed). **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Savier, 2000.

LEE, H. K.; LEE, S. A.; LEE, I. K.; YU, H. K.; PARK, Y. G.; HYUN, J. W.; KIM, K.; KOOK, Y. H.; KIM, B. J. *Mycobacterium paraseoulense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species related genetically to *Mycobacterium seoulense*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 60, p. 439-443, 2010.

LORENA, N. S. O.; DUARTE R. S.; PITOMBO M. B. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos videocirúrgicos – a hipótese do glutaraldeído. **Rev. Col. Bras. Cir**. 2009;36(3):266-7.

LUTOMSKI, J.; KEDZIA, B.; DEBSKA, W. Effect of on alcohol extract and of active ingredients from *Curcumina longa* on bacteria and fungi. **Planta Medica**, v. 26, n.1: 9 - 19, 1974.

M.M. GOIS, C. KURACHI E.J. SANTANA, E.G. MIMA, D.M. SPOLIDORIO, J.E. PELINO, V.S. BAGNATO, Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-

mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study, **Lasers Med. Sci.** 25 (2010) 391–395.

MENEZES, P. F. C.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C.; IMASATO, H. ; PERUSSI, J. R. Photocytotoxicity of Photogem[®] submetid to photobleaching. **Proceedings of SPIE**, v. 5689, p. 244-245, 2005

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I. **Microbiologia Médica**. São Paulo: Editora Monole, 1999. e 2, p. 25-28.

MORIWAKI, S. I.; MISAWA, J.; YOSHINARI, Y.; YAMADA, I.; TAKIGAWA, M.; TOKURA, Y. Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin). **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.17, p.241-3, 2001.

MURRAY, P.R.; ROSENTAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. e3, p.266-275.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochim Pol**, v.52, p.339-52, 2005.

O'RIORDAN, K.; AKILOVE, O. E.; CHANG, S. K.; FOLEY, J. W.; HASAN, T. Real-time fluorescence monitoring of phenothiazinium photosensitizers and their antimycobacterial photodynamic activity against *Mycobacterium bovis* BCG in in vitro and in vivo models of localized infection. **Photochem. Photobiol. Sci.**, V. 6, P. 1117-1123, 2007.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. São Paulo: Sarvier, 2004, p. 184-185.

PATTERSON, M. D.; WILSON, B. C. Photodynamic Therapy. In: J. V. Dyh (Ed.) **The technology of radiation oncology**. Madison Physics Publishing, p. 941-980, 1999.

PÉRET-ALMEIDA, L. *Curcumina longa* L. – Separação e caracterização de pigmentos curcuminóides, avaliação da atividade antimicrobiana, cultivo *in vitro* para o estabelecimento de gemas, calos, órgãos (raízes) e produção de metabólitos secundários.

Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2006.136p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).

PERUSSI, J. P.; IMASATO, H. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. In: BAGNATO, V.S. (Org). Novas técnicas ópticas para a área da saúde. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008. p. 163-178.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos, *Quimica Nova* 30, 988 - 994, (2007).

PITOMBO, M.B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009, v. 31(11), 529-33

PRIME, J. Les axidentes toxiques par l'eosinate de sodium. **Jouve and Boyer, Paris**, 1901.

RIBEIRO, A.P.D. Efeito citotóxico da terapia fotodinâmica associando Photogem® e LED azul e vermelho em cultura de células normais. 2008. 196 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araraquara, 2008.

SAMPATHU, S.R., LAKSHMINARAYANAN, S., SOWBHAGYA, H.B., KRISHNAMURTHY, N., ASHA, M.R., Feb. 2000. Use of curcumin as a natural yellowcolourant in ice cream. Paper Presented at National Seminar on Natural Colouring Agents. Eastern Book Company, Lucknow, India.

SHARMA, M., *et al.* Toluidine blue-mediated photodynamic effects on Staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* v.52, p.299-305, 2008.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discov Toady**, v.4, p. 507-517, 1999.

SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy in oncology. **Expert Opin Pharmacother**, v.2, p.917-27. 2001.

SIMMON KE, POUNDER JI, GREENE JN, WALSH F, ANDERSON CM, COHEN S, *et al.* Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by rpoB

sequencing of clinical isolates collected in the United States. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1978-80.

SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcumina* species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, v. 45, p. 75-81, 2002a.

SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P.M. Antibacterial activity of *Curcumina longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Current Science*, v. 83, n. 6, p. 737-740, 2002(b).

TAVARES A., CARVALHO C.M.B., FAUSTINO M.A., NEVES M.G.P.M.S., TOME J.P.C., TOME A.C., CAVALEIRO J.A.S., CUNHA Â., GOMES N.C.M., ALVES E., ALMEIDA A. (2010) Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Marine Drugs*. 8, 1, 91-105.

TONEY, N.; ADEKAMBI, T.; TONEY, S.; YAKRUS, M.; BUTLER, WR. Revival and emended description of 'Mycobacterium paraffinicum' Davis, Chase and Raymond 2010 as *Mycobacterium paraffinicum* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 60, p.

TÖNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *Journal of Pharmaceutical Science*, Washington, v. 76, p. 373-373, 1987.

TRINDADE, F.Z., PAVARINA, A.C., RIBEIRO, A.P.D., BAGNATO, V.S., VERGANI, C.E., COSTA, C.A.S. Toxicity of photodynamic therapy with LED associated to Photogem®: An *in vivo* study. *Laser Med Sci.* 2011.

VON TAPPEINER, H; JESIONEK, A. Therapeutische Versuchen MIT fluoreszierenden Stoffen. **Muench. Med. Wochenschr**, v.47, p.2042-2044, 1903.

VON TAPPEINER, H; JODLBAUER, A. Die Sensibilierende Wirkung fluoriszierender Substanzen. *Gesammte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*. **F. C. W. Vogel, Leipzig**, 1907.

VON TAPPEINER, H; JODLBAUER, A. Über Wirkung der Photodynamischen Stoffe auf Protozoen und Enzyme. **Dtsch. Arch. Klin. Med.**, v.80, p.427-487, 1904.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v.42, p. 13-28, 1998.

WIEGELL, S.R.; KONGSHOJ, B.; WULF, H.C. Mycobacterium marinum Infection Cured by Photodynamic Therapy. *Arch Dermatol.* V. 142. P. 1241-1242, 2006.

WILLIAMS, M. M.; YAKRUS, M. A.; ARDUINO, M. J.; COOKSEY, R. C.; CRANE, C. B.; BANERJEE, S. N.; HILBORN, E. D.; DONLAN, R. M. Structural Analysis of Biofilm Formation by Rapidly and Slowly Growing Nontuberculous Mycobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2091-2098, 2009.

WILSON, M., DOBSON, J., and SARKAR, S. (1993). Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol. Immunol.* 8, 182–187.

ZEINA B, GREENMAN J, CORRY D, PURCELL WM. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol.* 2002;146:568-73.

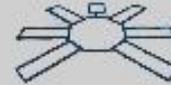
9. ANEXO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**INCQS**

Laboratório de Materiais de Referência

Informe de bactéria de referência

15 out-09

MICROORGANISMO:	<i>Mycobacterium massiliense</i>
INCQS:	00894
ORIGEM:	IEC 735
LOTE:	0209594
HISTÓRIA:	USP<-IEC
ISOLAMENTO:	Sítio cirúrgico por via laparoscópica
MEIO DE CULTURA INDICADO:	Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H9, Middlebrook 7H10 (suplementados com ADC e OADC, respectivamente).
TEMPERATURA (em Graus Celsius):	37
TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas):	5-7dias
RESPIRAÇÃO:	Aeróbica
APLICAÇÃO:	Referência para ensaios de avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes hospitalares para artigos semi-críticos, de acordo com a resolução da ANVISA RDC nº 75 de 23/10/08
SOROLOGIA:	_____
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	_____
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	_____
VALIDADE:	Indeterminada se mantida entre -10C e -20 °C.
OBSERVAÇÕES:	<p>O lote é constituído de sete dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa INCQS.</p> <p>representante do surto de infecções cirúrgicas que teve início em Belém em 2004 e disseminou para outros estados do Brasil.</p>

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
 Tel (21) 3866-6151 Fax (21) 2290-0915
 www.incqs.fiocruz.br

PGP 86 3230 006-Anexo G-Rav 01

REIDRATAÇÃO 05/10/09