

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THAILA QUATRINI CORRÊA

Efeito de diferentes fotossensibilizadores no controle de
Acanthamoeba polyphaga in vitro

SÃO CARLOS

2013

THAILA QUATRINI CORRÊA

Efeito de diferentes fotossensibilizadores no controle de
Acanthamoeba polyphaga in vitro

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadores:

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

SÃO CARLOS

2013

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

C824ed

Corrêa, Thaila Quatrini.

Efeito de diferentes fotossensibilizadores no controle de
Acanthamoeba polyphaga in vitro / Thaila Quatrini Corrêa. --
São Carlos : UFSCar, 2013.

71 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2013.

1. Microbiologia. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Curcumina. 4.
Azul de metileno. 5. Ameba de vida livre. I. Título.

CDD: 576 (20^a)

Thaila Quatrini Corrêa

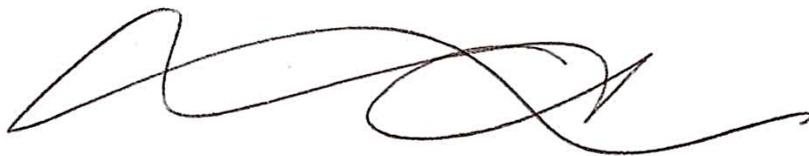
Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Aprovada em: 29/08/2013

BANCA EXAMINADORA



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



Prof.ª Dr.ª Alessandra Nara Souza Rastelli
(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/ Araraquara)



Prof.ª Dr.ª Fernanda de Freitas Aníbal
(Universidade Federal de São Carlos)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fazer acordar todos os dias e permitir a realização dos meus sonhos e objetivos sempre com saúde, fé, força e coragem.

Aos meus pais Dorival e Maria e à minha irmã Thaline, pelo amor, carinho, apoio, confiança e educação dedicados a mim desde sempre! Agradeço por terem trilhado o caminho pelo qual percorri até hoje. Vocês são o meu alicerce!

Ao meu namorado, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando. Agradeço pelo incentivo, paciência e compreensão durante todos os anos de estudo.

Ao Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza (Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar), por ter me acolhido e ter dado a chance de desenvolver este trabalho em seu laboratório, pela orientação, apoio científico e aprendizado que tive durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (Instituto de Física de São Carlos da USP), por me aceitar como aluna de mestrado, pela oportunidade, orientação, apoio científico e incentivo ao crescimento profissional.

À Profa. Dra. Cristina Kurachi (Instituto de Física de São Carlos da USP) e à Dra. Natalia Mayumi Inada (Instituto de Física de São Carlos da USP), pela colaboração, sugestões, ideias e também apoio científico desde o início do mestrado.

À Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo (Faculdade de Odontologia da UNESP Araraquara), ao Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto (Departamento de Fisioterapia da UFSCar) e à Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur (Departamento de Genética e Evolução da UFSCar), pelas importantes colaborações dadas ao trabalho, participando da banca de qualificação.

À Profa. Dra. Alessandra Nara Souza Rastelli (Faculdade de Odontologia da UNESP Araraquara) e à Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar), pelas contribuições à versão final deste trabalho, participando da banca de defesa.

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar), por permitir a utilização do equipamento espectrofotômetro de fluorescência de seu laboratório.

À Dra. Mariana Torres Carvalho (Instituto de Física de São Carlos da USP), por todo apoio dado ao trabalho desenvolvido na microscopia confocal.

À amiga Mariana Carreira Geralde, pela amizade, respeito, incentivo, horas de estudo, dias de experimento, sugestões na escrita da dissertação, enfim, pela vivência durante os anos de mestrado, dividindo os melhores e os piores momentos desta conquista!

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia: Amanda, Danilo, Giovanna, Lidiani, Luis, Lygia, Mariana, Monica, Monize, Patrícia e Paula, com os quais convivi e aprendi durante este período.

À Ivete Palombo e à Zélia Venézio, técnicas do Departamento de Morfologia e Patologia, que sempre com palavras de incentivo, estiveram à disposição para ajudar no que fosse preciso.

À Claudia Pastega, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, que sempre muito gentil e, com um sorriso no rosto, resolveu todos os problemas burocráticos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar, pela oportunidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que, de alguma forma, torceram e contribuíram para que eu conseguisse concluir este trabalho.

Muito obrigada a todos vocês!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

CORRÊA, T. Q. **Efeito de diferentes fotossensibilizadores no controle de *Acanthamoeba polyphaga in vitro***. 2013. 71p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2013.

A inativação fotodinâmica (IFD), utilizada no controle biológico de microrganismos, envolve a ação de um fotossensibilizador (FS), ativado por luz visível, no intuito de oxidar substratos biológicos, resultando em efeito citotóxico. O controle de amebas de vida livre é importante, tanto pela sua patogenicidade quanto pelo fato de abrigarem microrganismos. Além disso, algumas espécies podem desenvolver sérias infecções em humanos. O presente estudo propôs analisar a efetividade *in vitro* da IFD em *Acanthamoeba polyphaga* utilizando sal de curcuminóides, curcumina, azul de metileno e Photogem[®] como FS, além de observar alterações morfológicas causadas pelo sal de curcuminóides neste microrganismo. As amostras foram cultivadas em meio PYG, incubadas a 37°C por 48 a 72 horas. A curcumina foi solubilizada em 1 mL de DMSO e posteriormente diluída em água destilada para obtenção das concentrações finais. Os demais FS foram solubilizados diretamente em água destilada. Para a irradiação, diodos emissores de luz foram utilizados nos comprimentos de onda 460 e 630 nm, nas doses de 30 e 50 J/cm². Após os tratamentos, resazurina foi adicionada para avaliar a viabilidade de *A. polyphaga*, sendo as amostras incubadas a 37°C por 4 horas. A intensidade de fluorescência foi medida em espectrofotômetro de fluorescência. Na IFD com sal de curcuminóides nas concentrações 500, 1000 e 1500 µg/mL, houve redução de 27,7%, 61,4% e 82,5% com 30 J/cm², e de 75,2%, 85,0% e 95,9% com 50 J/cm², respectivamente. Já na IFD com curcumina nas concentrações 35, 70 e 140 µg/mL, houve redução de 16,2%, 24,0% e 25,7% com 30 J/cm², e de 25,4%, 28,3% e 30,5% com 50 J/cm², respectivamente. Na IFD com azul de metileno nas concentrações 24 e 32 µg/mL, houve redução de 14,1% e 28,3% com 30 J/cm², não havendo redução na concentração de 16 µg/mL e de 18,7%, 36,9% e 23,9% com 50 J/cm², respectivamente. Por fim, na IFD com Photogem[®] nas concentrações 50, 100 e 200 µg/mL, houve redução de 20,1%, 37,6% e 53,5% com 30 J/cm², e de 17,1%, 38,9% e 57,3% com 50 J/cm², respectivamente. A retirada do FS antes da irradiação mostrou que o sal de curcuminóides provavelmente não permaneceu no interior das amebas, pois a redução obtida anteriormente não foi observada nesta condição. Os FS apresentaram toxicidade para as amebas, na ausência de luz, nas concentrações testadas e o uso isolado da luz não apresentou efeito fototóxico, exceto a dose 50 J/cm² no comprimento de onda 460 nm. A fototoxicidade proporcionada pelas doses de luz junto aos FS utilizados contribuiu para o efeito de morte das amebas, sendo a IFD eficiente com o sal de curcuminóides. A análise das imagens obtidas pela microscopia confocal mostrou que o sal de curcuminóides causou danos em amebas, confirmando a toxicidade apresentada no escuro. Portanto, conclui-se que apenas o contato com o FS já é capaz de induzir mudanças morfológicas em *A. polyphaga*, levando algumas células à morte.

Palavras-chave: *Acanthamoeba polyphaga*, inativação fotodinâmica, curcumina, azul de metileno, Photogem[®].

ABSTRACT

CORRÊA, T. Q. **Effect of different photosensitizers in control of *Acanthamoeba polyphaga* *in vitro***. 2013. 71p. Thesis (Master of Biotechnology). Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 2013.

The photodynamic inactivation (PDI), used for biological control of microorganisms, involves the action of a photosensitizer (PS), activated by visible light, in order to oxidize organic substrates, resulting in cytotoxic effect. The control of free-living amoebae is important both for its pathogenicity and its microorganisms harboring. Additionally, some species may develop serious infections in humans. The present study evaluated the *in vitro* effectiveness of PDI in *Acanthamoeba polyphaga*. Salt of curcuminoids, curcumin, methylene blue and Photogem[®] were used as FS. Besides, this study intended to observe morphological changes caused by the salt of curcuminoids in the microorganism. The samples were grown at 37 °C in PYG medium for a period of 48 to 72 hours. Curcumin was solubilized in 1 mL DMSO and further diluted in distilled water to obtain final concentrations. The other PS's were directly solubilized in distilled water. The irradiation light-emitting diodes were used at wavelengths 460 and 630 nm at doses of 30 and 50 J/cm². After treatments, resazurin was added to evaluate the respiratory activity of *A. polyphaga* and the samples were incubated at 37 °C for 4 hours. The fluorescence intensity was measured in a fluorescence spectrophotometer. In PDI with salt of curcuminoids at concentrations 500, 1000 and 1500 µg/mL, there was a reduction of 27.7%, 61.4% and 82.5% at 30 J/cm² and 75.2%, 85.0% and 95.9% at 50 J/cm², respectively. In PDI with curcumin at concentrations 35, 70 and 140 µg/mL, there was a reduction of 16.2%, 24.0% and 25.7% at 30 J/cm², and 25.4%, 28.3 % and 30.5% at 50 J/cm², respectively. In PDI with methylene blue at concentrations 24 and 32 µg/mL, there was a reduction of 14.1% and 28.3% at 30 J/cm², with no reduction in the concentration of 16 µg/mL and 18.7%, 36.9% and 23.9% at 50 J/cm², respectively. Finally, in PDI with Photogem[®] at concentrations 50, 100 and 200 µg/mL, there was a reduction of 20.1%, 37.6% and 53.5% at 30 J/cm², and 17.1%, 38.9% and 57.3% at 50 J/cm², respectively. The removal of the PS before irradiation showed that the salt of curcuminoids probably didn't stay inside of amoebas, because the reduction obtained previously was not observed in this condition. The PS was toxic to the amoebae in the absence of light, at the concentrations tested, and the isolated use of light showed no phototoxic effect, except the dose of 50 J/cm² at 460 nm wavelength. The phototoxicity by doses of light together the PS contributed to the death of the amoebae, being more efficient with salt of curcuminoids. The analysis of confocal microscopy images showed that the salt of curcuminoids caused damage in amoebae, confirming its toxicity in the dark. Therefore, it is concluded that contact with only the PS is already able to induce morphological changes in *A. polyphaga*, leading some of them to death.

Keywords: *Acanthamoeba polyphaga*, photodynamic inactivation, curcumin, methylene blue, Photogem[®].

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> visualizados em microscopia confocal. 16	16
Figura 2 – Cistos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> visualizados em microscopia confocal. 17	17
Figura 3 – Ilustração esquemática das reações do tipo I e do tipo II.....21	21
Figura 4 – Estrutura química da molécula de curcumina23	23
Figura 5 – Estrutura química da molécula do sal de curcuminóides25	25
Figura 6 – Estrutura química da molécula de azul de metileno.....25	25
Figura 7 – Estrutura química da molécula de Photogem®27	27
Figura 8 – Imagens da mesa iluminadora BioTable RGB.....32	32
Figura 9 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – sal de curcuminóides e 30J/cm ²37	37
Figura 10 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – sal de curcuminóides e 50J/cm ²38	38
Figura 11 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – retirada do sal de curcuminóides antes da IFD.39	39
Figura 12 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – retirada do sal de curcuminóides após a IFD...40	40
Figura 13 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – curcumina e 30J/cm ²41	41
Figura 14 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – curcumina e 50J/cm ²42	42
Figura 15 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – azul de metileno e 30J/cm ²43	43
Figura 16 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – azul de metileno e 50J/cm ²44	44
Figura 17 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – Photogem® e 30J/cm ²46	46
Figura 18 – Sobrevivência de <i>A. polyphaga</i> – Photogem® e 50J/cm ²47	47
Figura 19 – Trofozoítos de <i>A. polyphaga</i> do grupo controle.47	47
Figura 20 – Imagens do trofozoíto de <i>A. polyphaga</i> com sal de curcuminóides.....49	49
Figura 21 – Imagens do trofozoíto de <i>A. polyphaga</i> com sal de curcuminóides.....50	50
Figura 22 – Imagens do trofozoíto de <i>A. polyphaga</i> com sal de curcuminóides.....51	51
Figura 23 – Imagens do cisto de <i>A. polyphaga</i> com sal de curcuminóides.....52	52
Figura 24 – Mudanças no tamanho dos trofozoítos e cisto de <i>A. polyphaga</i>53	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações dos fotossensibilizadores, doses de luz e grupos de estudo	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
GAE	Encefalite amebiana granulomatosa (do inglês: granulomatous amebic encephalitis)
IFD	Inativação fotodinâmica
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
LED	Diodos emissores de luz (do inglês: light emitting diode)
L(-)FS(-)	Grupo controle
L(-)FS(+)	Grupo controle do fotossensibilizador
L(+)FS(-)	Grupo controle da luz
L(+)FS(+)	Grupo inativação fotodinâmica
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina (do inglês: methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
PDT	Terapia fotodinâmica (do inglês: photodynamic therapy)
PYG	Peptona, extrato de levedura e glicose (do inglês: peptone yeast glucose)
RGB	Vermelho, verde e azul (do inglês: red, green, blue)
RLP068	Ftalocianina tetracatiônica
TFD	Terapia fotodinâmica
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USP	Universidade de São Paulo
°C	Grau Celsius
g	Grama
mg	Miligrama
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
mg/mL	Miligrama por mililitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL/mL	Microlitro por mililitro
mW/cm²	Miliwatt por centímetro quadrado
J/cm²	Joule por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. Amebas de Vida Livre – <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	16
3.2. Inativação Fotodinâmica.....	19
3.3. Fotossensibilizadores	22
3.3.1. Curcumina e Sal de curcuminóides	23
3.3.2. Azul de Metileno	25
3.3.3. Photogem®	26
3.4. Inativação Fotodinâmica em Amebas de Vida Livre	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Preparo de <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	31
4.2. Fotossensibilizadores	31
4.3. Fonte de Luz.....	32
4.4. Grupos de Estudo	33
4.5. Ensaio de Atividade Metabólica utilizando Resazurina	34
4.6. Retirada do Fotossensibilizador	35
4.7. Análise Estatística.....	35
4.8. Microscopia Confocal.....	36
5. RESULTADOS	37
5.1. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> e Sal de curcuminóides	37
5.2. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> e Curcumina.....	41
5.3. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> e Azul de Metileno	43
5.4. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> e Photogem®	45
5.5. Observação de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> em Microscopia Confocal	47
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços conseguidos no tratamento de doenças ocasionadas por bactérias, fungos, vírus e protozoários e, apesar da existência de vários métodos de controle microbiano, os microrganismos, principalmente as bactérias, têm adquirido resistência a estes métodos, sendo um desafio para a área médica o desenvolvimento de novas metodologias para seu controle e tratamento. Há relatos na literatura de muitas cepas bacterianas tornando-se resistentes a vários antibióticos e desinfetantes convencionais (KONEMAN *et al.*, 2001; TORTORA *et al.*, 2005; TRABULSI *et al.*, 2005). Como exemplo, pode-se citar a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), que desafia as terapêuticas, tornando-se um problema de infecções hospitalares (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Além das bactérias resistentes, há também um interesse no controle microbiológico de amebas de vida livre, tanto pela demonstração de sua patogenicidade quanto pelo fato de desempenharem um papel importante como reservatório de muitos microrganismos (GREUB; RAOULT, 2004). Trabalhos descritos na literatura indicam que diversas bactérias podem ser fagocitadas por amebas e podem adaptar-se ao ambiente intracelular, crescer e reproduzir-se dentro destes microrganismos, firmando uma relação de simbiose (BROWN; BARKER, 1999; WINIECKA-KRUSNELL; LINDER, 2001). Além disso, amebas de vida livre podem hospedar bactérias endossimbiontes de interesse para a saúde pública, como *Legionella* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp., entre outros patógenos, sendo que vários dos endossimbiontes encontrados em amebas são também parasitas de macrófagos humanos (NEWSOME *et al.*, 1998; STEINERT *et al.*, 1998; SKRIWAN *et al.*, 2002; GREUB; RAOULT, 2004; PRIMM *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm mostrado que, amebas de vida livre, que vivem no solo e na água, tais como as espécies pertencentes aos gêneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* e *Naegleria* são responsáveis por causar doenças e/ou infecções oportunistas em seres humanos e em outros animais. As principais doenças são as infecções do sistema nervoso central em seres humanos, como a encefalite amebiana granulomatosa (GAE), além das infecções disseminadas da pele, dos pulmões e das córneas (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; VISVESVARA, 2010). Apesar dos progressos realizados no tratamento da GAE, esta doença continua a ter elevada mortalidade devido ao atraso no diagnóstico e à dificuldade no tratamento por falta de terapias adequadas. Além disso, a virulência das amebas, a sua quantidade no local da infecção, a demora no início da intervenção terapêutica

e o estado do sistema imunológico do paciente são alguns dos fatores que podem contribuir para o sucesso ou não do tratamento (VISVESVARA, 2010).

Nesse sentido, é desejável e necessário o desenvolvimento de técnicas alternativas que sejam realmente eficazes no controle de microrganismos potencialmente patogênicos. No intuito de prevenir doenças e de evitar a aquisição de resistência pelos microrganismos, pesquisadores têm testado a terapia fotodinâmica (TFD) em uma abordagem antimicrobiana.

A primeira demonstração da TFD em uma abordagem antimicrobiana ocorreu em 1900 quando Oscar Raab, por um incidente em seu experimento, observou que o corante acridina apresentou toxicidade contra o protozoário *Paramecium caudatum* na presença de luz (MAISCH, 2007). A partir disso ficou conhecida a possibilidade de inativar *in vitro* alguns microrganismos por meio da combinação adequada de corante e luz (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI; BROWN, 2004; MAISCH, 2007). Assim, a TFD é uma técnica que envolve um fotossensibilizador (FS) e uma fonte de luz visível, sendo a luz o meio pelo qual as moléculas do FS são ativadas. Com a ativação destas moléculas, ocorre um processo de troca de energia no qual são geradas as espécies reativas de oxigênio (EROS), capazes de oxidar substratos biológicos, resultando em um efeito citotóxico (O'RIORDAN *et al.*, 2007).

Embora a TFD tenha sido descoberta na área microbiológica há mais de 100 anos, sua aplicação tem ocorrido principalmente no tratamento de câncer, pois com a descoberta dos antibióticos na década de 1940, sua aplicação no tratamento de doenças infecciosas sofreu um grande atraso (KHARKWAL *et al.*, 2011). Muitas são as denominações dadas para esta técnica, no entanto, quando utilizada para o controle microbiológico geralmente passa a ser chamada de inativação fotodinâmica (IFD).

Os estudos de IFD em amebas de vida livre começaram a ser desenvolvidos no início do século XXI, porém os efeitos causados pela ação fotodinâmica nestes microrganismos não têm sido muito relatados, fato comprovado pelos escassos trabalhos encontrados na literatura. Os principais estudos sobre IFD em amebas de vida livre foram realizados por Kassab *et al.* (2003), Ferro *et al.* (2006), Chen *et al.* (2008), Ferro *et al.* (2009) e Mito *et al.* (2012), que se propuseram a avaliar os efeitos de FS associados à luz em espécies do gênero *Acanthamoeba*.

Assim, diante da problemática apresentada e devido ao fato de existirem poucas publicações relacionadas aos efeitos fotodinâmicos em amebas de vida livre, este estudo propôs avaliar o potencial da ação fotodinâmica e os seus efeitos na inativação de *Acanthamoeba polyphaga*, ameba relacionada principalmente às ulcerações córneas agudas e crônicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a eficácia *in vitro* da inativação fotodinâmica utilizando diferentes fotossensibilizadores no controle da ameba de vida livre *Acanthamoeba polyphaga*.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar o efeito fototóxico da luz nos comprimentos de onda 460 nm e 630 nm nas doses de 30 e 50 J/cm².

Verificar o efeito da toxicidade no escuro dos fotossensibilizadores sal de curcuminóides, curcumina, azul de metileno e Photogem[®].

Verificar a eficácia *in vitro* da inativação fotodinâmica utilizando sal de curcuminóides, curcumina, azul de metileno e Photogem[®] como fotossensibilizadores.

Verificar o efeito da retirada do fotossensibilizador sal de curcuminóides antes e após a irradiação das amostras.

Observar as alterações morfológicas causadas pelo fotossensibilizador sal de curcuminóides em células de *Acanthamoeba polyphaga* por meio da microscopia confocal.

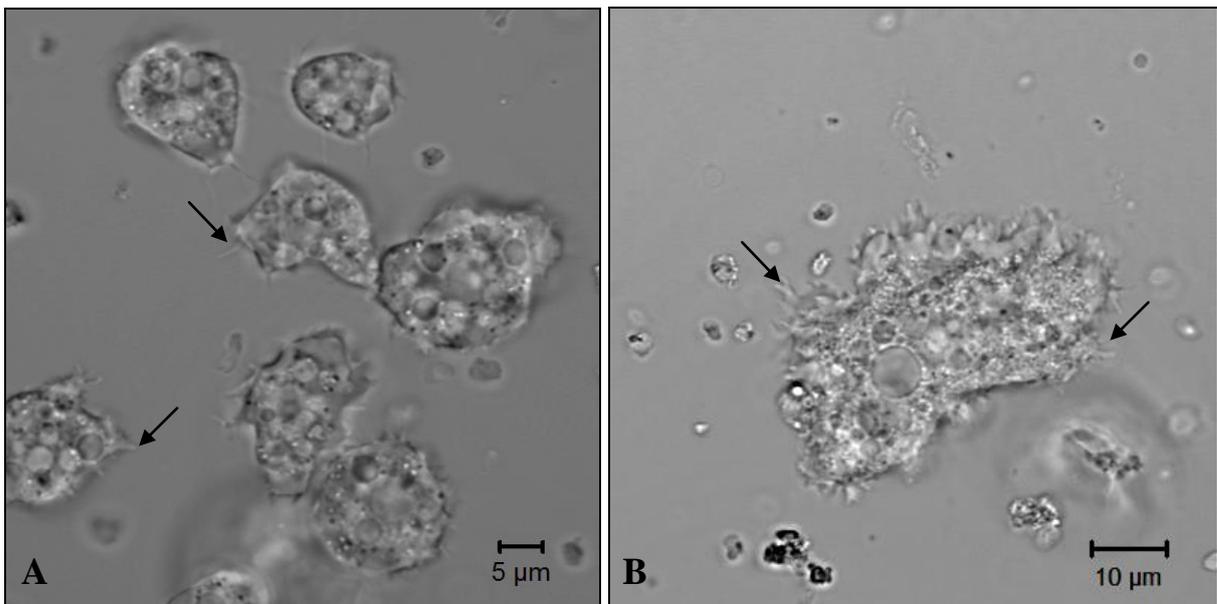
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Amebas de vida livre – *Acanthamoeba polyphaga*

Amebas de vida livre são protozoários, seres eucariontes e unicelulares, caracterizados por apresentarem duas fases durante seu ciclo de vida: a vegetativa ou trofozoítica, na qual apresentam de 8 a 40 μm de diâmetro, e a dormente ou cística, com 10 a 25 μm de diâmetro (WALKER, 2002; BARNES *et al.*, 2005).

A forma trofozoítica é caracterizada pela presença de um único núcleo e finas projeções que se estendem para o exterior da superfície do corpo, os acantopódios (Figura 1). São eles os responsáveis pela aderência das amebas às superfícies, pelos movimentos celulares e alimentação. Assim, os trofozoítos são indivíduos ativos, que se alimentam de bactérias, leveduras, algas ou pequenas partículas orgânicas e dividem-se assexuadamente por fissão binária. Em condições ambientais adversas ou na escassez de água e alimento, os trofozoítos não conseguem sobreviver e adquirem a forma latente, encistando-se (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; GREUB; RAOULT, 2004; KHAN, 2006).

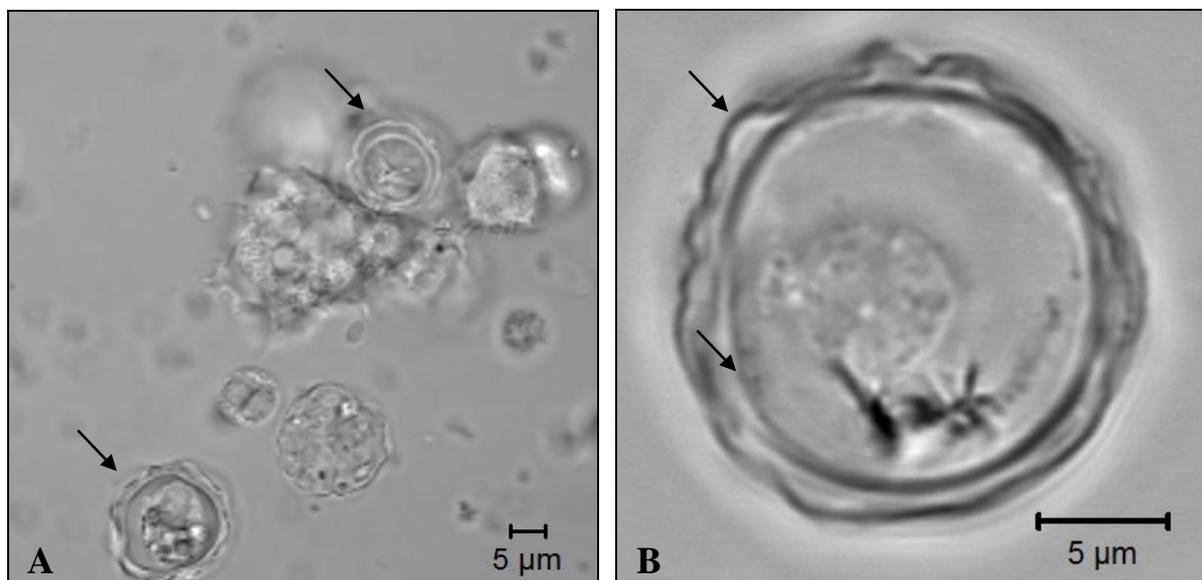
Figura 1 – Trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* visualizados em microscopia confocal.



Fonte própria. Imagem de transmissão de trofozoítos de *A. polyphaga* vistos em microscopia confocal. A: Na imagem é possível observar o núcleo, vários vacúolos e os pseudópodes característicos do tipo acantopódio (setas) (aumento 40x). B: Trofozoíto em destaque (aumento 40x).

Os cistos apresentam parede dupla de celulose composta pelo endocisto e pelo ectocisto, sendo a camada exterior irregular (Figura 2). São mais resistentes e toleram condições extremas, tais como congelamento, dessecação, alterações na osmolaridade, alterações no pH, sendo também resistentes ao cloro, aos agentes químicos antimicrobianos e a outros sistemas de desinfecção (WINIECKA-KRUSNELL; LINDER, 2001; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; GREUB; RAOULT, 2004; THOMAS *et al.*, 2006). Esta forma resistente possui poros, que são utilizados para monitorar as mudanças ambientais (AKSOZEK *et al.*, 2002).

Figura 2 – Cistos de *Acanthamoeba polyphaga* visualizados em microscopia confocal.



Fonte própria. Imagem de transmissão de cistos de *A. polyphaga* vistos em microscopia confocal. A: Na imagem é possível observar cistos (setas) com dupla parede de celulose (aumento 40x). B: Cisto em destaque, com a dupla parede de celulose bem definida, formada pelo ectocisto e pelo endocisto (aumento 63x).

Entre as amebas de vida livre, apenas quatro gêneros são responsáveis por infecções, oportunistas e não oportunistas, em humanos e em outros animais. São eles: *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* e *Sappinia* (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006; VISVESVARA; MAGUIRE, 2006; SALAH *et al.*, 2009; TRABELSI *et al.*, 2012).

O gênero *Acanthamoeba* pertence à família Acanthamoebidae e é caracterizado por apresentar amebas de vida livre com acantopódios na forma de espinhos (WALKER, 2002; BARNES *et al.*, 2005). São encontradas nos mais diversos tipos de ambientes, podendo ser isoladas a partir de água doce, salobra, salgada, aquecida, gelada, solo e ar. Também já foram

detectadas em instrumentos cirúrgicos, materiais de diálise, aparelhos de ar condicionado e lentes de contato (HOFFMANN; MICHEL, 2001; DENDANA *et al.*, 2008; SHOFF *et al.*, 2008; TRABELSI *et al.*, 2010). Em seres humanos, foram isoladas da cavidade nasal, faringe, intestino, cérebro, pulmão, pele e córneas (KHAN, 2006).

Os diversos habitats em que já foram encontradas e a capacidade de encistar dentro dos tecidos humanos sugerem que estas amebas sejam altamente resistentes (AKSOZEK *et al.*, 2002) e causadoras de doenças fatais, como encefalite amebiana granulomatosa (GAE), lesões cutâneas, de nasofaringe, infecções pulmonar e renal, úlceras de mucosas, invasão óssea com subsequente osteomielite e infecção ocular (ceratite). Tais doenças ocorrem com maior frequência em pessoas debilitadas, desnutridas e imunocomprometidas (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2006; TRABELSI *et al.*, 2012).

Morfologicamente, as espécies do gênero *Acanthamoeba* estão distribuídas em três grupos de acordo com as características dos cistos. Mais de 24 espécies já foram identificadas com base no critério morfológico (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; TRABELSI *et al.*, 2012):

Grupo 1: inclui 4 espécies: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* e *A. tubiashi*. Estas espécies são caracterizadas por cistos grandes ($\geq 18 \mu\text{m}$), sendo o ectocisto enrugado e o endocisto estrelado ou liso. Ectocisto e endocisto apresentam-se afastados um do outro;

Grupo 2: inclui 11 espécies: *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritanensis*, *A. paradivionensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. triangularis*. Os cistos são menores ($\leq 18 \mu\text{m}$) e apresentam o ectocisto grosso ou fino e o endocisto poligonal, triangular ou redondo;

Grupo 3: inclui 5 espécies: *A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa*, *A. royreba*. Os cistos, com aproximadamente $19 \mu\text{m}$ de diâmetro, apresentam o ectocisto liso ou ondulado e o endocisto globular ou ovóide.

As espécies mais abundantes na natureza estão classificadas no grupo 2, que também inclui as eventualmente patogênicas, tais como *A. castellanii* e *A. polyphaga* (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; TRABELSI *et al.*, 2012).

A espécie *A. polyphaga* é capaz de causar encefalite em pacientes com imunidade comprometida e ceratite geralmente em indivíduos saudáveis usuários de lentes de contato (WALKER, 2002; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; HEASELGRAVE *et al.*, 2006). A ceratite é uma infecção ocular grave causada pelo uso de lentes de contato contaminadas que acarretam em traumas. A contaminação ocular pode ocorrer por meio da água ou de partículas

do ar que contenham essas amebas, sendo comumente relatados casos de ceratite entre usuários de lentes de contato que não fazem a desinfecção correta das mesmas ou que fazem uso de “salinas caseiras” (BORAZJANI *et al.*, 2000; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; CLARKE; NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006; VISVESVARA; MAGUIRE, 2006).

Ainda, segundo alguns autores, as espécies de *Acanthamoeba* são vistas como reservatórios biológicos para um grande número de agentes patológicos, pois abrigam algumas bactérias endossimbiontes como *Legionella sp*, *Pseudomonas sp*, *Mycobacterium sp*, *Listeria monocytogenes* (NEWSOME *et al.*, 1998; STEINERT *et al.*, 1998; SKRIWAN *et al.*, 2002; GREUB; RAOULT, 2004; PRIMM *et al.*, 2004). Especificamente, *A. polyphaga* tem sido vista como um reservatório potencial de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholera* e *Escherichia coli* O157 (HUWS *et al.*, 2008). Portanto, estas amebas podem tornar-se vetores para a propagação de infecções potencialmente letais, uma vez que os microrganismos instalam-se em localizações intracelulares que os protegem de condições adversas, permitindo aumentar sua virulência (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Desse modo, é essencial estudar, desenvolver e testar possíveis técnicas para o controle de amebas de vida livre, com a finalidade de evitar futuras contaminações da população. *A. polyphaga* foi o microrganismo de escolha neste trabalho, pois a natureza resistente do trofozoíto e do cisto, combinado com a relativa facilidade com que o microrganismo pode ser cultivado e manipulado em laboratório, faz com que seja um modelo ideal para estudar a resistência aos métodos de desinfecção existentes (HUGHES; KILVINGTON, 2001; HEASELGRAVE *et al.*, 2006).

3.2. Inativação Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD ou PDT, do inglês, photodynamic therapy) tem sido comumente utilizada em tratamentos promissores para a cura de diversos tumores (FERREIRA *et al.*, 2004; HAMBLIN; HASAN, 2004). Nesta terapia é necessário utilizar um composto químico denominado fotossensibilizador (FS) juntamente com a aplicação de luz visível que corresponda à banda de absorção do FS escolhido, para que células e/ou tecidos-alvos sejam destruídos pelos compostos tóxicos gerados nesta reação (JORI *et al.*, 2006; BAGNATO, 2008).

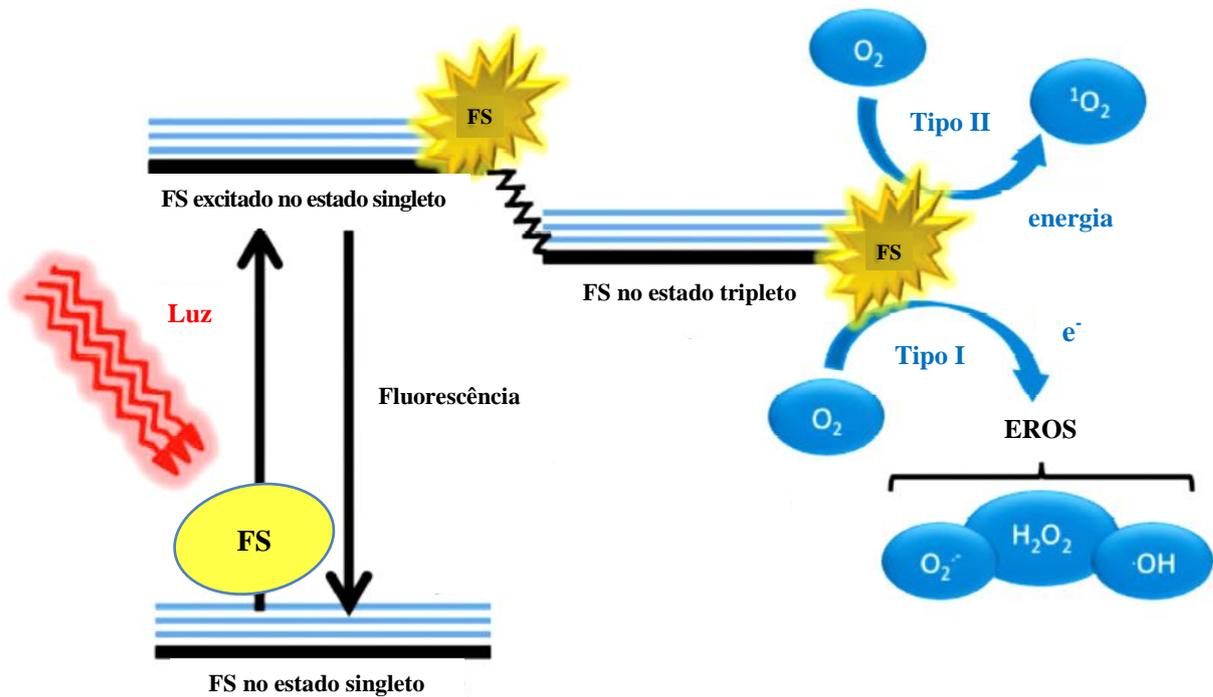
Além da aplicação dessa técnica em tratamento de câncer, a TFD tem mostrado importantes efeitos bactericidas, e por isso o seu uso prático vem aumentando e o seu efeito antimicrobiano cada vez mais reconhecido (MEISEL; KOCHER, 2005; BRAGA, 2007). Segundo alguns autores, a TFD tem atraído a atenção como uma forma de terapia antimicrobiana (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI *et al.*, 2006), pois visa destruir patógenos microbianos no tratamento de infecções localizadas (ZEINA *et al.*, 2001), principalmente quando os tratamentos antimicrobianos tradicionais não são capazes de dar resultados satisfatórios (KASSAB *et al.*, 2003).

São muitos os termos encontrados na literatura para descrever a TFD, porém, quando utilizada no controle biológico e/ou inativação de microrganismos passa a ser denominada inativação fotodinâmica (IFD) (GAD *et al.*, 2004). Assim, a IFD é baseada no conceito de que o FS seja acumulado preferencialmente no interior dos microrganismos para posteriormente ser ativado por baixas doses de luz visível em adequado comprimento de onda. Após a irradiação do FS ocorre um processo de troca de energia com as moléculas de oxigênio, gerando espécies reativas tóxicas, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que são capazes de oxidar os substratos biológicos e induzir efeitos citotóxicos (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI *et al.*, 2006; MAISCH, 2007; DONNELLY *et al.*, 2008).

As espécies reativas tóxicas, derivadas da ativação do FS pela luz, podem ser geradas por meio de duas reações: reação do tipo I e/ou reação do tipo II (Figura 3). Na reação do tipo I, as moléculas do FS, quando ativadas por luz, reagem com as moléculas vizinhas por transferência direta de elétrons ou de hidrogênio, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) na forma de radicais livres, como por exemplo, ânion superóxido, radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio. Já na reação do tipo II, as moléculas do FS, quando ativadas por luz, reagem com as moléculas vizinhas por transferência do excesso de energia ao oxigênio molecular (O_2), transformando-o em oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), reativo e altamente oxidante (MANTAREVA *et al.*, 2011; St. DENIS *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012).

O oxigênio singlete é formado a partir da transformação do oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$) em singlete ($^1\text{O}_2$), conforme descrito acima. O estado tripleto é o estado fundamental do oxigênio, de menor energia, no qual os elétrons estão desemparelhados nos orbitais moleculares. Porém, quando as moléculas desse oxigênio interagem com as moléculas do FS, ativadas por luz, ocorre a inversão do spin de um dos elétrons, gerando o oxigênio singlete, que possui elétrons emparelhados no mesmo orbital ou em orbitais moleculares diferentes (RONSEIN, 2006).

Figura 3 – Ilustração esquemática das reações do tipo I e do tipo II.



Fonte: St. DENIS *et al.* (2011) modificada. As moléculas do FS inicialmente absorvem um fóton e passam para o estado singlete (FS excitado) que, logo em seguida, passam para um estado tripleto mais longo. As moléculas do FS no estado tripleto podem interagir com as moléculas de oxigênio por meio de duas reações, do tipo I e do tipo II, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), respectivamente.

As duas reações, tanto a do tipo I quanto a do tipo II, são responsáveis pela morte celular e destruição do alvo. Por esse motivo é praticamente improvável que microrganismos adquiram resistência à IFD (BAGNATO, 2008). Além disso, os dois tipos de reação podem ocorrer simultaneamente. O que define a proporção em que tais reações ocorrem é o tipo de FS utilizado (HUANG *et al.*, 2012).

Apesar dos mecanismos de geração de EROS já terem sido muito pesquisados, a maneira exata de como afetam os microrganismos alvos na IFD ainda não é totalmente compreendida (HUANG *et al.*, 2012). O que se pode afirmar, no entanto, é que o sucesso da IFD depende fortemente da interação dos três elementos principais – FS, luz e oxigênio –, pois é esta combinação que gera as potentes espécies reativas capazes de induzir o dano oxidativo do microrganismo e, conseqüentemente, sua morte. Portanto, espera-se que na IFD tanto o FS quanto a luz, quando estiverem isolados, não sejam tóxicos e também não tenham a capacidade de produzir efeitos deletérios no microrganismo (St. DENIS *et al.*, 2011).

3.3. Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (FS) são compostos pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz na região do visível (JORI, 2006). São considerados os principais veículos da IFD, pois quando iluminados com comprimentos de onda específicos, são excitados e permitem a transferência de energia para gerar produtos reativos que causam citotoxicidade. Muitos FS têm sido pesquisados para o uso em IFD e vários deles apresentam diferentes estruturas moleculares e distintas propriedades biofísicas. Por isso, o grande desafio na busca por um FS ideal é encontrar o que tenha a habilidade de ser preferencialmente armazenado nos microrganismos, de forma mais ou menos específica, para aumentar o poder de destruição dos mesmos (JORI; BROWN, 2004). Além disso, é fundamental encontrar um FS que não seja decomposto rapidamente pela luz, na tentativa de impedir que seja destruído antes de causar o dano fotodinâmico (SIBATA *et al.*, 2001; ALISSON *et al.*, 2004).

Em geral, para um FS ser eficaz deve apresentar algumas propriedades, tais como: alta estabilidade, facilidade de solubilização (sendo preferencialmente solúvel em água), absorção seletiva na estrutura alvo, boa permeabilidade em membrana citoplasmática, longo tempo de vida no estado excitado para permitir a transferência de elétrons e/ou energia para as moléculas de oxigênio, elevado rendimento na produção de EROS e de oxigênio singleto para ter eficiência fotoquímica satisfatória, baixa toxicidade no escuro, facilidade de obtenção em escala industrial e baixo custo de síntese (WILSON; PATTERSON, 2008).

No entanto, alguns problemas podem prejudicar o desempenho dos FS no processo de IFD e na produção de EROS. Dentre tais problemas, destacam-se a formação de agregados e a fotodegradação do FS. A formação de agregados entre as moléculas do FS pode prejudicar o processo de geração de EROS, uma vez que o FS na forma agregada é pouco ativo, dificultando a transferência de energia para gerar oxigênio singleto. Estes agregados formam-se à medida que se aumenta a concentração do FS ou quando o mesmo, de caráter hidrofóbico, estiver presente em meio aquoso, não se solubilizando de forma adequada. A fotodegradação do FS corresponde à modificação da sua estrutura, geralmente ocasionada pelas espécies reativas tóxicas (principalmente o oxigênio singleto) produzidas durante a IFD pelo próprio FS. Tal modificação reduz a quantidade de FS intacto no meio de reação, provocando uma queda na produção de EROS. Este evento causa perda na eficiência do dano fotodinâmico, tornando a destruição do microrganismo incompleta (MacDONALD; DOUGHERTY, 2001). O conhecimento sobre a formação de agregados e a fotodegradação

do FS pode facilitar o desenvolvimento de novos FS que contribuam significativamente para melhorar a eficácia da IFD.

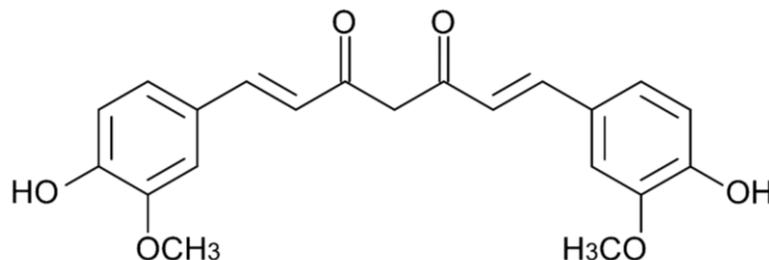
Neste trabalho foram utilizados como FS o sal de curcuminóides, a curcumina, o azul de metileno e o Photogem[®], por não haver relatos na literatura sobre seu uso em *A. polyphaga*.

3.3.1. Curcumina e Sal de curcuminóides

A cúrcuma, conhecida como açafrão, é a planta de nome científico *Curcuma longa* L., pertencente à família Zingiberaceae, amplamente cultivada em países asiáticos, principalmente na Índia e na China. O seu uso como um componente da medicina indiana, para tratar diversos tipos de doenças, tem sido muito relatado na literatura (MIGUEL *et al.*, 2002; BRUZELL *et al.*, 2005; CAMPBELL; COLLETT, 2005; AGGARWAL *et al.*, 2007). Pesquisas identificaram a curcumina como sendo a principal responsável pela atividade biológica desta planta (AGGARWAL *et al.*, 2007).

A curcumina (Figura 4) é um pigmento de cor amarela presente nos rizomas da cúrcuma. Este composto natural, quando extraído dos rizomas, apresenta-se na forma de pó é muito utilizado como tempero, agente aromatizante, corante e medicamento (MIGUEL *et al.*, 2002; CAMPBELL; COLLETT, 2005; EPSTEIN *et al.*, 2010). É pertencente à classe dos polifenóis, substâncias que possuem hidroxilas ligadas a anéis aromáticos (KOLEV *et al.*, 2005; PÉRET-ALMEIDA, 2005).

Figura 4 – Estrutura química da molécula de curcumina.



Fonte: PÉRET-ALMEIDA (2005). Estrutura química da molécula de curcumina.

Estudos comprovam que a curcumina possui várias propriedades biológicas tais como imunomodulatória, anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena, sendo um potencial em aplicações terapêuticas (MIGUEL *et al.*, 2002; BRUZELL *et al.*, 2005; PRIYADARSINI, 2009). A curcumina também apresenta efeitos antibacterianos. Usando a IFD como um tratamento antibiótico alternativo, a curcumina pode ser usada como FS e atuar em infecções superficiais localizadas (HAUKVIK *et al.*, 2009). Há relatos do seu uso como FS na inativação de cepas meticilina resistentes de *Staphylococcus aureus* (RIBEIRO *et al.*, 2012), na inativação de espécies do fungo *Candida* (DOVIGO *et al.*, 2011a; DOVIGO *et al.*, 2011b), na investigação da atividade antibacteriana em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (KAUR *et al.*, 2010), no estudo de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (HAUKVIK *et al.*, 2009). Contudo, seu potencial antimicrobiano não foi testado na inativação de amebas de vida livre.

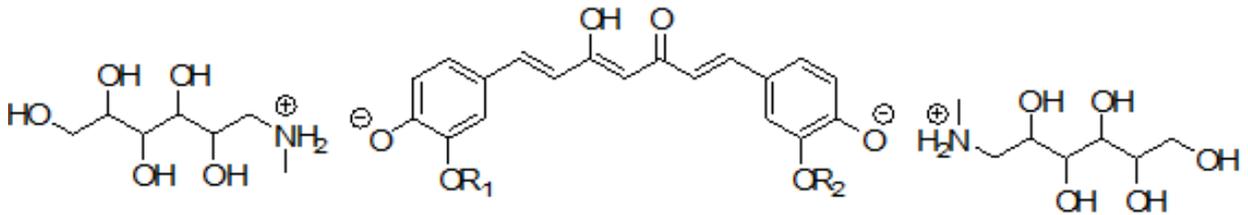
A curcumina possui seu pico de absorção máximo em 430 nm, espectro de fluorescência de excitação em 434 nm e de emissão em 520 nm. É um composto praticamente insolúvel em água com pH ácido ou neutro, sendo a melhor solubilidade em água com pH acima do neutro. Mas, mesmo em pH alcalino sofre uma rápida degradação (PÉRET-ALMEIDA, 2005). Nesse sentido, o avanço clínico da curcumina tem sofrido dificuldades pela fraca solubilidade apresentada em água e pelo tempo de meia-vida curto, o que resulta em baixa biodisponibilidade (HEGGE *et al.*, 2010; TEITEN *et al.*, 2010).

Pesquisas têm sido realizadas para encontrar a melhor forma de diluição da curcumina em solução aquosa com estabilidade e solubilidade aceitáveis. Entretanto, desenvolver uma formulação otimizada, que apresente pH estável e solubilidade aceitável, tem sido um desafio, pois tal formulação deve ser estável não só durante sua produção e estocagem, mas também durante todo o processo de irradiação da IFD (HEGGE *et al.*, 2010; TEITEN *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a PDT Pharma LTDA (Cravinhos, SP) desenvolveu o sal de curcuminóides (Figura 5), um novo FS no qual curcumina e outros curcuminóides apresentam-se diluídos em solução de N-metil-D-glucuminato e água destilada a 31,8%.

Segundo a PDT Pharma LTDA, o princípio ativo do sal de curcuminóides é caracterizado pela curcumina, demetoxi-curcumina e bis-demetoxi-curcumina. Esta nova formulação da curcumina possui boa solubilidade em água devido à carga negativa presente no oxigênio, porém, seu poder de penetração em células é diminuído, pois o composto apresenta-se como íon, e o transporte desta molécula, por difusão, para dentro das células torna-se dificultado.

Figura 5 – Estrutura química da molécula do sal de curcuminóides.

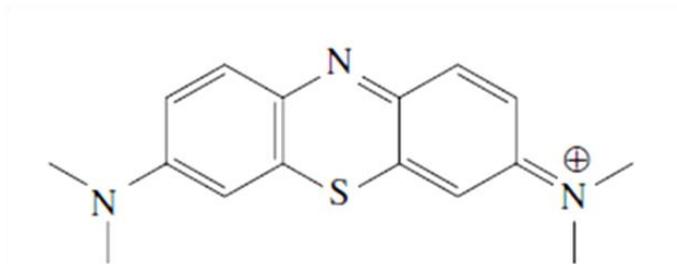


Fonte: PDT Pharma LTDA. Estrutura química da molécula do sal de curcuminóides. Radicais R_1 e R_2 na curcumina $R_1 = R_2 = CH_3$, na demetoxi-curcumina $R_1 = CH_3$ e $R_2 = H$, na bis-demetoxi-curcumina $R_1 = R_2 = H$.

3.3.2. Azul de Metileno

O azul de metileno (Figura 6) é um corante orgânico, básico, com propriedade fluorescente e fotossensibilizadora, pertencente à classe das fenotiazinas. Os corantes fenotiazínicos são representados por moléculas catiônicas constituídas por um sistema de anel aromático tricíclico (KONAN *et al.*, 2002; PHOENIX, *et al.*, 2003; HUSSAIN *et al.*, 2006).

Figura 6 – Estrutura química da molécula de azul de metileno.



Fonte: FEESE; GHILADI (2009). Estrutura química da molécula de azul de metileno, molécula catiônica constituída por anel aromático tricíclico.

Este composto é muito utilizado como corante citológico e indicador de oxido-redução, mas tem se mostrado efetivo no uso como agente fotossensibilizante, pois a carga positiva presente em sua molécula, juntamente com o baixo peso molecular, promovem sua melhor interação com células e/ou microrganismos (KONAN *et al.*, 2002).

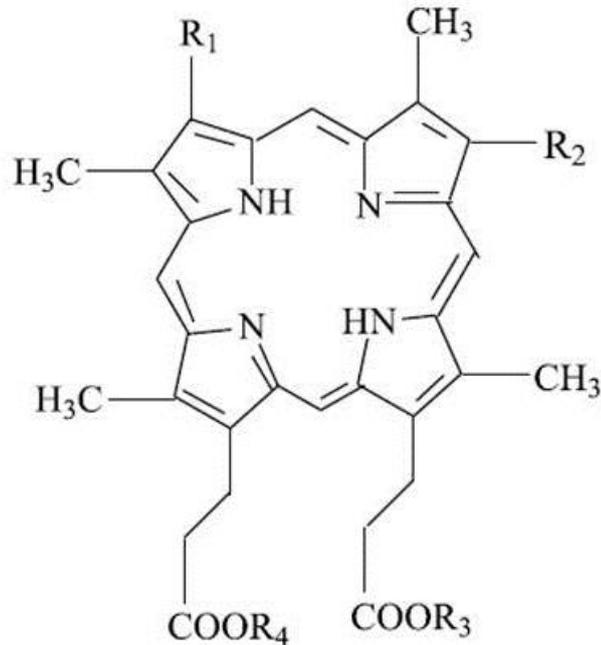
Estudos comprovam que o azul de metileno tem sido utilizado clinicamente no tratamento de infecções de pele, psoríase e de diversos tipos de câncer (ORTH *et al.*, 1995), induzindo a destruição de células tumorais (MELLISH *et al.*, 2002). Um estudo realizado com azul de metileno em IFD mostrou que o mesmo causa diminuição da viabilidade do parasita da leishmaniose, sendo um forte potencial no tratamento de lesões (SONG *et al.*, 2011). Além disso, este corante tem sido empregado como FS em vários tipos de desinfecção devido à efetividade fotodinâmica que apresenta sobre microrganismos patogênicos, incluindo bactérias (WAINWRIGHT *et al.*, 1997; USACHEVA *et al.*, 2001; PHOENIX, *et al.*, 2003; HUSSAIN *et al.*, 2006), fungos (TEICHERT *et al.*, 2002) e vírus (USACHEVA *et al.*, 2001).

O azul de metileno possui intensa absorção entre 620-660 nm, apresentando absorção na região vermelha do espectro eletromagnético (PHOENIX, *et al.*, 2003; SEVERINO *et al.*, 2003; HUSSAIN *et al.*, 2006). É solúvel em água e apresenta baixa toxicidade quando utilizado em baixas concentrações (SEVERINO *et al.*, 2003). Contudo, tanto em TFD de câncer como na IFD de microrganismos, os corantes fenotiazínicos, como o azul de metileno, podem mostrar alguma toxicidade no escuro, o que representa uma desvantagem ao seu uso devido à queda provocada em sua eficiência fotodinâmica (TARDIVO *et al.*, 2005).

3.3.3. Photogem[®]

O Photogem[®] (Figura 7) é um composto derivado da hematoporfirina. A hematoporfirina, composto isolado da hemoglobina, é uma substância muito utilizada como FS em TFD de câncer, pois exibe propriedades de localização tumoral. Sua purificação levou à produção de derivados de hematoporfirina, ou seja, substâncias com misturas complexas de componentes que apresentam melhor localização tumoral do que a própria hematoporfirina (MIRONOV *et al.*, 1990). O Photogem[®] é uma destas substâncias derivadas da hematoporfirina. Não é quimicamente definido, pois é uma mistura complexa de porfirinas, monômeros, dímeros e oligômeros (MIRONOV *et al.*, 1990; MENEZES, 2006).

Figura 7 – Estrutura química da molécula de Photogem[®].



Fonte: RÚSSIA (1999) *apud* MENEZES (2006). A estrutura química monomérica do Photogem[®] tem a fórmula representada por $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$. Nos radicais R1 e R2 ligam-se $CH(OH)CH_3$, $CH=CH_2$ ou a própria estrutura monomérica da porfirina. Nos ligantes R3 e R4 ligam-se H ou a própria estrutura monomérica da porfirina, podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros.

O Photogem[®] foi um dos primeiros FS a serem sistematicamente estudados para a aplicação clínica em TFD e, portanto, é considerado um FS de primeira geração (MIRONOV *et al.*, 1990; MELO *et al.*, 2004). É produzido pelo Instituto de Química Fina de Moscou, na Rússia (MELO *et al.*, 2004) e apresenta-se na forma de um pó violeta escuro. O espectro de absorção de luz do Photogem[®] possui um pico em 630 nm (MENEZES, 2006).

Além de ser largamente utilizado como FS em TFD de câncer, pois tem regulamentação aprovada para uso clínico em humanos, o Photogem[®] tem tido boas respostas na IFD de microrganismos. Há relatos de seu uso, com significativas reduções, em IFD de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* em dentina cariada (GIUSTI *et al.*, 2008), *Candida albicans* e *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol (DOVIGO *et al.*, 2009) e em *Staphylococcus aureus* (GOIS *et al.*, 2010).

3.4. Inativação Fotodinâmica em Amebas de Vida Livre

Muitos trabalhos são encontrados na literatura quanto ao uso da IFD para controle microbiológico de bactérias e fungos, entretanto, são poucos os estudos realizados com amebas de vida livre. Nesta sessão, os trabalhos de IFD em *Acanthamoeba* foram descritos.

Kassab *et al.* (2003) estudaram o efeito da ftalocianina tetracatiônica (RLP068) em um possível patógeno de ameba de vida livre do gênero *Acanthamoeba*. O estudo foi realizado com trofozoítos de *A. palestinensis*, que foram incubados no escuro com concentrações de 0,2; 0,5 e 1 μM de RLP068 por diferentes intervalos de tempo (0,5; 1; 3 horas). Após a incubação, os trofozoítos foram irradiados, no comprimento de onda 600-700 nm, com doses de luz de 6, 15 e 30 J/cm^2 e potência de 50 mW/cm^2 . Como resultado, a RLP068 exibiu certo grau de toxicidade no escuro na concentração de 1 μM , pois induziu queda de 25% na sobrevivência dos trofozoítos após 1 hora de incubação. Um decréscimo de 50% na sobrevivência dos trofozoítos foi verificado após a incubação com 0,2 μM de RLP068 seguida por irradiação com dose de luz de 30 J/cm^2 ou após incubação com 1 μM de RLP068 seguida por irradiação com dose de luz de 6 J/cm^2 . A inativação quase completa da viabilidade foi induzida com exposição dos trofozoítos à concentração de 1 μM de RLP068 e irradiação com doses de luz de 15 e 30 J/cm^2 . A incubação no escuro por 1 hora com 1 μM de RLP068 induziu algumas mudanças na morfologia geral dos trofozoítos, que apareceram em formato arredondado. Os autores observaram a existência de dois principais sítios de ligação para RLP068 em *A. palestinensis*, os vacúolos e o núcleo. A localização da RLP068 nos vacúolos resultou em alteração significativa na morfologia dos trofozoítos, além de alterações na função osmorregulatória. Como consequência do acúmulo da RLP068, os vacúolos sofreram alargamentos com eventuais rupturas. Assim, os autores concluíram que os trofozoítos de *A. palestinensis* foram muito sensíveis à ação fotossensibilizante da RLP068.

Ferro *et al.* (2006) continuaram as pesquisas com a RLP068 estudando seu efeito na IFD de cistos de *A. palestinensis*. Os cistos foram incubados no escuro com concentrações de 0,5 a 5 μM de RLP068 por 1 hora. Após a incubação, os trofozoítos foram irradiados, no comprimento de onda 600-700 nm, com doses de luz de 15, 30, 45 e 60 J/cm^2 e potência de 50 mW/cm^2 . Os resultados mostraram que a RLP068 possuiu alta afinidade pelos cistos de *A. palestinensis*, evidenciada pela sua localização em vários sítios subcelulares, como a dupla parede cística e algumas organelas. A quantidade da RLP068 armazenada nos cistos aumentou continuamente com o aumento da sua concentração, não havendo toxicidade no escuro para os cistos, mesmo na concentração mais elevada. Um decréscimo de 50% na

sobrevivência dos cistos, comparado ao controle, foi verificado após a incubação com 0,5 μM de RLP068 seguida por irradiação com dose de luz de 60 J/cm^2 . Um decréscimo semelhante foi obtido com 1 μM de RLP068 seguida por irradiação com dose de luz de 30 J/cm^2 . Com 5 μM de RLP068 foi observada grande inibição do desencistamento e a inativação quase completa ocorreu nesta concentração aumentando-se a dose de luz até 60 J/cm^2 . De acordo com os autores, os resultados indicaram que a RLP068 possui afinidade por *A. palestinensis* mesmo quando o microrganismo está na fase cística e, o decréscimo na sobrevivência dos cistos está relacionado à perda da capacidade de desencistamento, ocasionada pelo dano fotodinâmico.

Para melhorar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na IFD de *A. palestinensis* com a RLP068, Ferro *et al.* (2009) desenvolveram outro estudo, no qual identificaram os fotoprocessos nos compartimentos citossólico e mitocondrial por meio do acompanhamento das atividades enzimáticas, além de investigar alterações induzidas na estrutura dos compartimentos celulares por meio de microscopia de fluorescência. De acordo com os resultados, a incubação dos trofozoítos com várias concentrações da RLP068, por 1 hora, promoveu acúmulo do FS preferencialmente no vacúolo contrátil, mesmo em doses baixas, pois a aparência modificada dos vacúolos e a turgidez dos trofozoítos foram observadas após a IFD. A fluorescência foi evidente no vacúolo contrátil de trofozoítos não irradiados e tornou-se menos intensa e mais difusa nos trofozoítos irradiados no comprimento de onda 600-700 nm, por 10 minutos. As alterações na atividade enzimática foram avaliadas após 20 minutos de incubação com 2 μM da RLP068 e irradiação por 10 minutos. As atividades de algumas enzimas mitocondriais não sofreram diminuição, enquanto que a atividade de uma enzima citoplasmática típica, como a lactato desidrogenase, foi inibida até 35% comparada com o controle. Segundo os autores, este decréscimo pode ser uma consequência direta da fotossensibilização, que refletiu o dano induzido pela RLP068, ou pode ser uma alteração no microambiente enzimático como um efeito secundário causado pelo fotoprocessos.

Chen *et al.* (2008) avaliaram a eficácia da hipocrelina B como FS na IFD de trofozoítos e cistos de um isolado clínico de *Acanthamoeba*, além do seu potencial citotóxico sobre células epiteliais e estromais de córnea. O estudo foi realizado *in vitro*, sendo os trofozoítos incubados nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e os cistos nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hipocrelina B por 0,5, 3 e 24 horas no escuro. Após a incubação, os trofozoítos e cistos foram irradiados, em comprimento de onda maior que 470 nm, com dose de luz de 90 J/cm^2 e potência de 50 mW/cm^2 . Os

resultados mostraram que a concentração de 100% de inibição para os trofozoítos foi de 1,0 µg/mL, e para os cistos foi de 20 µg/mL, mostrando que os trofozoítos foram significativamente mais suscetíveis à IFD do que os cistos. Segundo os autores, a hipocrelina B foi distribuída principalmente no citoplasma dos trofozoítos, permanecendo em algumas organelas citoplasmáticas, e na dupla parede de celulose dos cistos. Além disso, não exibiu citotoxicidade no escuro para trofozoítos e cistos, evidenciando que tal FS apresenta propriedade amebicida no uso conjugado com luz, sendo tóxico apenas quando ativado por comprimento de onda adequado. Quanto às células epiteliais e estromais de córnea, o FS demonstrou citotoxicidade na concentração mais baixa na presença de luz, sendo a IFD dose dependente na inibição destas células.

Mito *et al.* (2012) avaliaram o efeito do azul de metileno como FS na IFD de *A. castellanii* e se esse efeito foi mantido ou aumentado quando realizada em combinação com agentes antiamebianos convencionais, como polihexametileno biguanida, anfotericina B e voriconazol. Para isso, trofozoítos e cistos foram incubados no escuro, por 10 minutos, nas concentrações de 50; 100; 250 e 500 µM de azul de metileno. Após o período de incubação, foram irradiados, no comprimento de onda 660 nm, nas doses de luz de 1,8; 3,6; 7,2 e 10,8 J/cm². Os resultados mostraram que a IFD não foi eficaz nas concentrações 50 e 100 µM de azul de metileno. No entanto, nas maiores concentrações foi observada baixa atividade respiratória dos trofozoítos quando comparada com o controle, sendo a eficácia da IFD dependente da concentração testada. Quando os trofozoítos foram incubados na concentração de 500 µM e irradiados por 1,8; 3,6; 7,2 ou 10,8 J/cm², a atividade respiratória foi significativamente menor do que a do grupo controle. Quanto aos cistos, uma diferença significativa foi observada na atividade respiratória entre o grupo controle e o grupo tratado. Além disso, a IFD com azul de metileno apresentou um efeito sinérgico quando utilizada em combinação com os agentes antiamebianos polihexametileno biguanida e anfotericina B, mas não com voriconazol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo de *Acanthamoeba polyphaga*

Os experimentos foram realizados com o microrganismo *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461), obtido a partir de amostras da córnea de um paciente com ceratite, cedido pelo Prof. Dr. Fernando Costa e Silva-Filho da UFRJ. Trofozoítos de *A. polyphaga* foram cultivados em frascos de cultura celular em meio PYG (10 g protease de peptona, 7,5 g extrato de levedura, 15 g glicose em 1 L de salina de Page), incubados em estufa a 37°C por um período de 48 a 72 horas (SCHUSTER, 2002). Após esse período, os frascos de cultura celular contendo os trofozoítos foram agitados em agitador automático para o desprendimento das amebas. Posteriormente, os trofozoítos foram concentrados por centrifugação (1000 g por 10 minutos – Centrífuga Excelsa II, Modelo 206-BL, FANEM), resuspendidos com meio PYG e contados em câmara de Neubauer para obtenção de densidade de 10^6 amebas/mL. Para a contagem em câmara de Neubauer, 10 μ L da suspensão amebiana foram misturados com 10 μ L de azul de tripan (Sigma-Aldrich), corante de exclusão utilizado para observar a viabilidade celular, sendo incorporado apenas pelas células inviáveis, que passam a apresentar o núcleo corado em azul. Células viáveis apresentam-se incolores.

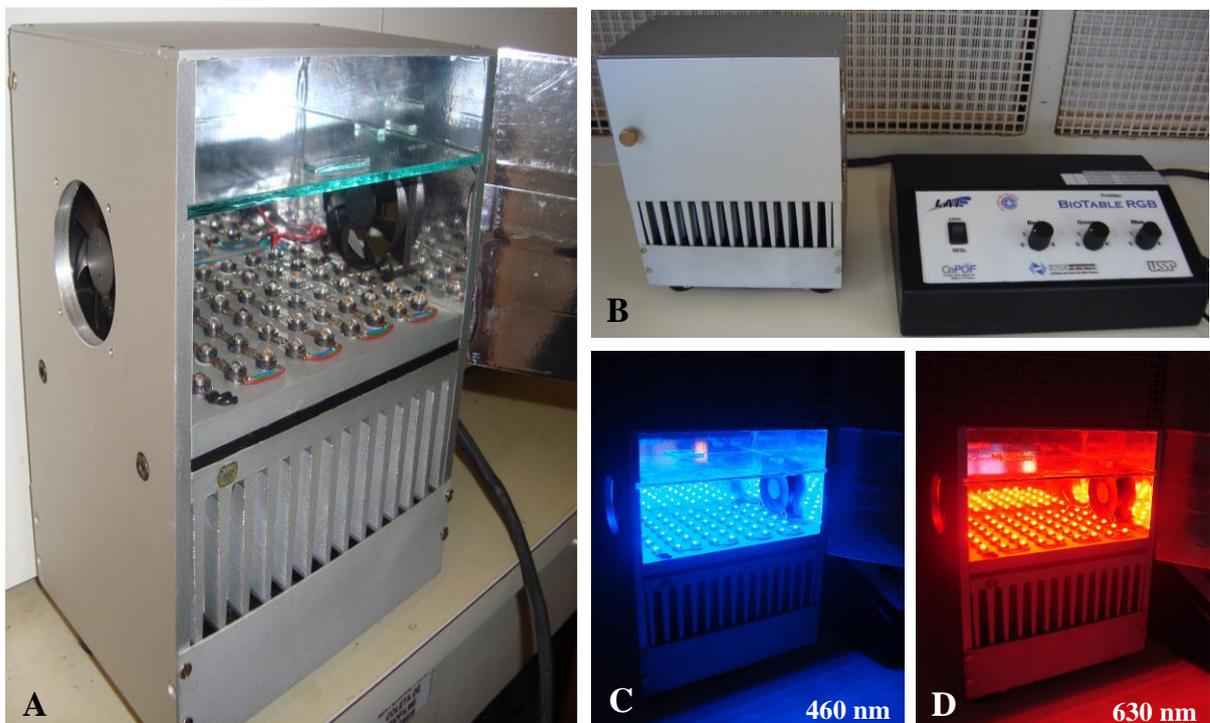
4.2. Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores utilizados neste trabalho foram sal de curcuminóides (PDT Pharma, Brasil), curcumina (Sigma-Aldrich, EUA), azul de metileno (QHEMIS, Brasil) e Photogem[®] (Moscou, Rússia). Imediatamente antes do uso e em ambiente protegido de luz, a curcumina foi solubilizada em 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido). A partir desta solução, foram realizadas diluições em salina de Page contendo 5% de DMSO para obtenção das concentrações desejadas. Já os demais FS foram diluídos diretamente em água destilada para obtenção das concentrações desejadas. As soluções dos FS foram preparadas em dupla concentração, pois ao serem adicionadas às amostras com *A. polyphaga*, as concentrações foram reduzidas pela metade, obtendo-se as concentrações finais especificadas na Tabela 1 do item 4.4. Os tubos contendo as soluções foram envolvidos em papel alumínio para manter os FS sem exposição à luz durante a realização dos experimentos. O tempo de incubação de todas as soluções dos FS com as amostras de *A. polyphaga*, no escuro, antes da irradiação, foi de 1 hora.

4.3. Fonte de luz

Para realizar a inativação fotodinâmica em *A. polyphaga* foi utilizada uma mesa iluminadora intitulada BioTable RGB (Figura 8). Este aparelho é um protótipo constituído de LED (do inglês, light-emitting diode) e foi desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP São Carlos). É revestido internamente com material refletor e as lâmpadas do tipo LED estão distribuídas uniformemente para permitir a emissão constante de luz. Sobre as lâmpadas, está acoplada uma placa de vidro que permite a difusão da luz por toda a sua superfície. Neste sistema, a potência pode ser variada ajustando o tempo e a intensidade para produzir a dose desejada. Em relação aos comprimentos de onda, a BioTable RGB opera nos valores de 460, 530 e 630 nm. As amostras de *A. polyphaga* foram irradiadas no comprimento de onda 460 nm e na potência de $36,1 \text{ mW/cm}^2$ com os FS sal de curcuminóides e curcumina e no comprimento de onda 630 nm e na potência de $27,5 \text{ mW/cm}^2$ com os FS azul de metileno e Photogem[®]. As doses de luz empregadas estão especificadas na Tabela 1 do item 4.4.

Figura 8 – Imagens da mesa iluminadora BioTable RGB.



Fonte própria. Imagens da mesa iluminadora BioTable RGB. A: Visualização interna da BioTable. B: Visualização externa da BioTable. C: BioTable operando no comprimento de onda 460 nm. D: BioTable operando no comprimento de onda 630 nm.

4.4. Grupos de Estudo

Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, de acordo com as concentrações de FS e doses de luz apresentadas na Tabela 1. Os grupos estudados foram: controle L0FS0, controle do fotossensibilizador L0FS(concentração do fotossensibilizador), controle da luz L(dose de luz)FS0 e inativação fotodinâmica L(dose de luz)FS(concentração do fotossensibilizador, em que 0 (zero) representa ausência.

Os experimentos foram realizados em placas de 96 orifícios, nos quais foram colocadas alíquotas de 50 μL de suspensão amebiana e alíquotas de 50 μL da solução do FS testado ou salina, no caso dos grupos controle e controle da luz. As amostras permaneceram nas placas por 1 hora no escuro e, após esse período de incubação, foram irradiadas na dose de escolha. Para simular as mesmas condições, o grupo controle, que não foi exposto à luz nem ao FS, também foi colocado nos poços da placa de 96 orifícios, em temperatura ambiente, pelo mesmo tempo utilizado na incubação e irradiação dos outros grupos. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata e em dois experimentos independentes.

Tabela 1 – Concentrações dos fotossensibilizadores, doses de luz e grupos de estudo.

	Concentrações dos Fotossensibilizadores	Doses de Luz		
		0	30	50
	0	L0FS0	L30FS0	L50FS0
Sal de curcuminóides	500	L0FS500	L30FS500	L50FS500
	1000	L0FS1000	L30FS1000	L50FS1000
	1500	L0FS1500	L30FS1500	L50FS1500
Curcumina	35	L0FS35	L30FS35	L50FS35
	70	L0FS70	L30FS70	L50FS70
	140	L0FS140	L30FS140	L50FS140
Azul de metileno	16	L0FS16	L30FS16	L50FS16
	24	L0FS24	L30FS24	L50FS24
	32	L0FS32	L30FS32	L50FS32
Photogem [®]	50	L0FS50	L30FS50	L50FS50
	100	L0FS100	L30FS100	L50FS100
	200	L0FS200	L30FS200	L50FS200

Concentrações dos fotossensibilizadores em $\mu\text{g/mL}$. Doses de luz em J/cm^2 . Grupos de estudo: L representa a dose de luz e FS representa a concentração dos fotossensibilizadores.

4.5. Ensaio de Atividade Metabólica utilizando Resazurina

Realizou-se um ensaio com o composto resazurina (Sigma-Aldrich) para avaliar a viabilidade de *A. polyphaga*, por meio da atividade metabólica, após os tratamentos com IFD. Após a incubação e irradiação das amostras, foram adicionadas alíquotas de 10 µL da solução de resazurina, na concentração de 0,01%, em cada amostra. A placa foi envolta por papel alumínio e levada para a estufa a 37°C por 4 horas de incubação. Ao término desse período, a intensidade de fluorescência foi medida em espectrofotômetro de fluorescência (SpectraMax M5, Molecular Devices) nos comprimentos de onda de excitação 560 nm e de emissão 590 nm.

A resazurina é um composto atóxico para as células. Apresenta-se na coloração azul e, nesta condição, não é fluorescente. Quando está na presença de células, as viáveis convertem a resazurina em resofurina, composto rosa e altamente fluorescente, sendo a quantidade de fluorescência produzida proporcional ao número de células viáveis (PROMEGA, 2009). A redução da resazurina em resofurina ocorre pela transferência de elétrons provenientes da enzima mitocondrial NADPH desidrogenase. Assim, é dependente do metabolismo de células viáveis.

Este ensaio é muito simples, rápido, sensível e preciso para medir o metabolismo celular, pois a resazurina é um indicador de oxidação-redução (O'BRIEN *et al.*, 2000). Além disso, é compatível com a contagem manual pela câmara de Neubauer e oferece vantagens, já que é menos trabalhoso e os resultados são lidos de maneira não subjetiva (McBRIDE *et al.*, 2005). Portanto, o ensaio de atividade metabólica utilizando resazurina pode substituir os métodos tradicionais de contagem de placas por ser uma das melhores alternativas para a quantificação de células planctônicas (PEETERS *et al.*, 2008).

A viabilidade das amebas foi calculada, como porcentagem de sobrevivência, utilizando-se o valor médio de fluorescência do grupo controle (L0FS0) como viabilidade máxima, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{\text{Valor de fluorescência individual de cada orifício}}{\text{Valor médio de fluorescência do controle}} \times 100$$

4.6. Retirada do Fotossensibilizador

Para verificar se os fotossensibilizadores utilizados permaneceram no interior das amebas durante a IFD, alguns experimentos foram realizados para sua retirada antes da irradiação das amostras. Para isso, o fotossensibilizador de escolha foi o sal de curcuminóides, nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$. O FS foi incubado com as amebas no escuro pelo mesmo tempo de incubação descrito anteriormente (1 hora) e, após esse tempo, as amostras foram centrifugadas (1000 g por 10 minutos – Centrífuga Eppendorf, Modelo 5418) e resuspendidas com meio PYG para posterior irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 e adição da resazurina. Esse experimento foi realizado para verificar se o efeito causado pela IFD nos experimentos iniciais permaneceria o mesmo após a retirada do FS, dando indícios da localização do mesmo, ou no interior ou ao redor dos microrganismos.

Para verificar se os fotossensibilizadores utilizados permaneceram agindo e provocaram algum efeito após a irradiação das amostras, durante o período de incubação com a resazurina, novos experimentos foram realizados. O fotossensibilizador de escolha também foi o sal de curcuminóides, nas mesmas concentrações citadas acima, e sua retirada foi feita após a irradiação das amostras, na dose de luz de 30 J/cm^2 . O FS foi incubado com as amebas no escuro pelo mesmo tempo de incubação descrito anteriormente (1 hora) e, após esse período, as amostras foram irradiadas. Depois da IFD, as amostras foram centrifugadas (1000 g por 10 minutos – Centrífuga Eppendorf, Modelo 5418) e resuspendidas com meio PYG para adição da resazurina. Esse experimento foi realizado para evitar o contato do FS com as amebas por mais 4 horas, referentes ao tempo de incubação com a resazurina.

4.7. Análise Estatística

Para a análise estatística foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade de variância de Levene. A comparação entre os diferentes tratamentos foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, foi aplicado o teste de Tukey para analisar a existência de diferença significativa entre os grupos estudados. O nível de significância foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.8. Microscopia Confocal

A microscopia confocal, realizada na Universidade de São Paulo (USP São Carlos), foi utilizada neste trabalho com o objetivo de observar o comportamento de células individuais de *A. polyphaga* durante o contato com o FS. O FS escolhido para realizar esta análise foi o sal de curcuminóides. Assim, antes e depois da realização dos experimentos com sal de curcuminóides, amostras contendo amebas foram analisadas em microscópio confocal, modelo LSM 780 (Zeiss, Alemanha).

Para esta análise, alíquotas de 50 μL da suspensão amebiana em meio PYG foram transferidas para lâminas de microscópio, e a morfologia das amebas foi observada minutos antes do contato com o FS. Após esta primeira observação, alíquotas de 50 μL da solução do sal de curcuminóides, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, foram adicionadas às lâminas contendo as amebas, e o seu comportamento foi observado.

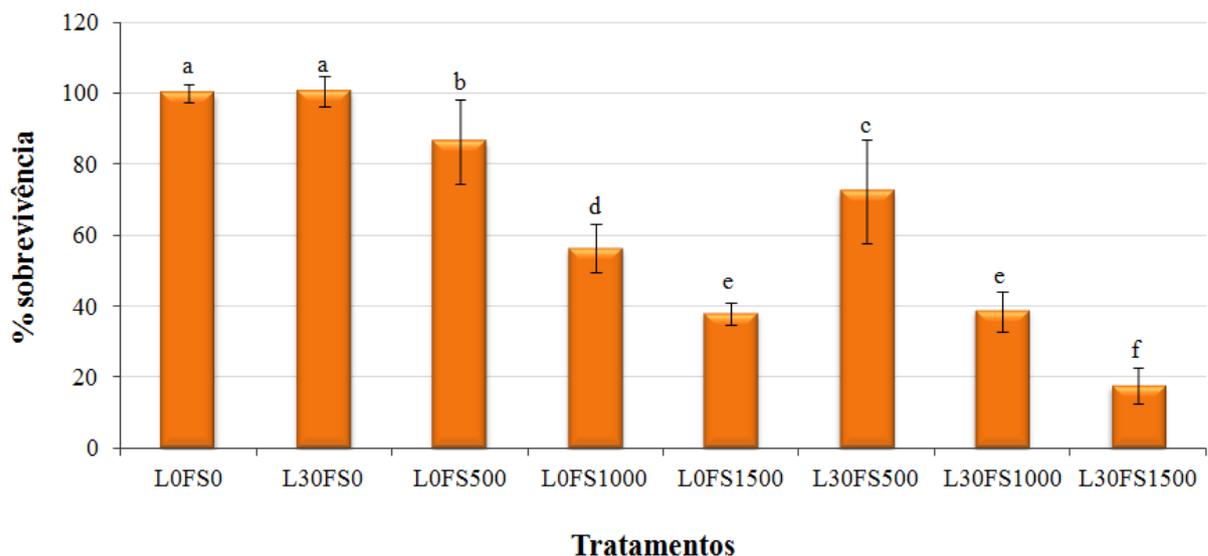
As imagens foram geradas através da observação em microscópio confocal invertido (ZEISS – LSM780) com excitação em comprimento de onda de 405 nm. As imagens foram registradas a cada minuto durante 2 horas. A análise das imagens foi realizada utilizando o software ZEN 2010 (Lançamento da Versão 6.0).

5. RESULTADOS

5.1. *Acanthamoeba polyphaga* e Sal de curcuminóides

Os resultados da eficácia da IFD em *A. polyphaga* utilizando sal de curcuminóides como FS nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e irradiação nas doses de luz de 30 e 50 J/cm^2 , no comprimento de onda 460 nm, estão representados nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – sal de curcuminóides e 30 J/cm^2 .

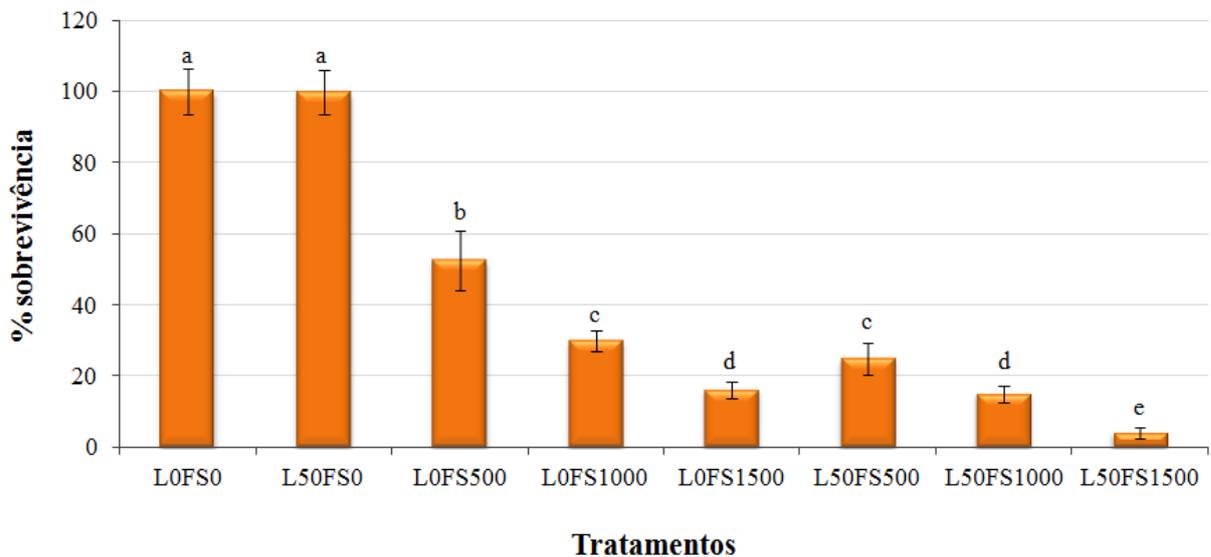


Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando sal de curcuminóides como FS nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 . Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L30FS0), controle do FS (L0FS500 / L0FS1000 / L0FS1500) e inativação fotodinâmica (L30FS500 / L30FS1000 / L30FS1500). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O efeito da luz foi avaliado isoladamente no grupo controle da luz. Ao analisar o gráfico (Figura 9), observa-se que não houve redução na sobrevivência de amebas com irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 , sendo 100,5% o total de amebas sobreviventes. O efeito do sal de curcuminóides foi avaliado isoladamente nos grupos controle do FS, nos quais se observa redução na sobrevivência de amebas nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo 86,5%, 56,2% e 37,8% o total de amebas sobreviventes, respectivamente. Ao irradiar as amebas do grupo IFD na dose de luz de 30 J/cm^2 , observa-se redução na sobrevivência de amebas, sendo 72,3%, 38,6% e 17,5% o total de amebas sobreviventes nas respectivas

concentrações 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com estes resultados, nota-se que o FS apresentou toxicidade para as amebas, no escuro, nas concentrações testadas, mas observa-se que a irradiação acentuou o efeito de morte causado pelo sal de curcuminóides reduzindo pela metade a sobrevivência das amebas do grupo controle do FS na concentração de 1500 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 10 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – sal de curcuminóides e 50 J/cm^2 .



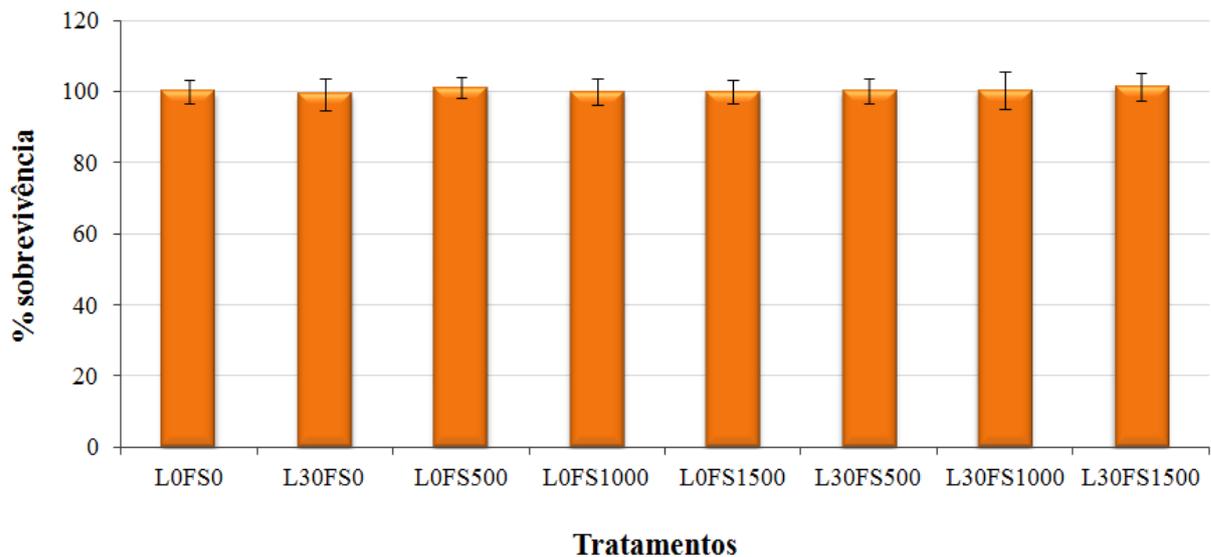
Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando sal de curcuminóides como FS nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ e irradiação na dose de luz de 50 J/cm^2 . Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L50FS0), controle do FS (L0FS500 / L0FS1000 / L0FS1500) e inativação fotodinâmica (L50FS500 / L50FS1000 / L50FS1500). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação aos experimentos com sal de curcuminóides e dose de luz de 50 J/cm^2 , ao analisar o gráfico (Figura 10) observa-se que o efeito da luz também não reduziu a sobrevivência de amebas no grupo controle da luz, sendo 99,8% o total de amebas sobreviventes. Quanto ao efeito do sal de curcuminóides, quando avaliado isoladamente nos grupos controle do FS, observa-se redução na sobrevivência de amebas nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$, sendo 52,5%, 29,9% e 16,1% o total de amebas sobreviventes, respectivamente. Já ao irradiar as amebas do grupo IFD na dose de luz de 50 J/cm^2 , observa-se redução acentuada na sobrevivência de amebas, sendo 24,8%, 15,0% e 4,1% o total de amebas sobreviventes nas respectivas concentrações 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com a análise do gráfico, nota-se um efeito de morte acentuado nos grupos inativação

fotodinâmica com sal de curcuminóides, sendo que a luz azul, na dose de 50 J/cm^2 , potencializou a ação do FS, reduzindo pela metade a porcentagem de amebas dos grupos IFD comparado aos grupos controle do FS. Entretanto, neste experimento o FS também apresentou toxicidade para as amebas, no escuro, nas concentrações testadas.

Em relação à retirada do FS antes e após a irradiação das amostras, os experimentos foram realizados com o sal de curcuminóides por ser o FS que apresentou maior toxicidade para as amebas. Os resultados da eficácia da IFD em *A. polyphaga* com a retirada do sal de curcuminóides antes da irradiação e após a irradiação das amebas estão representados, respectivamente, nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – retirada do sal de curcuminóides antes da IFD.

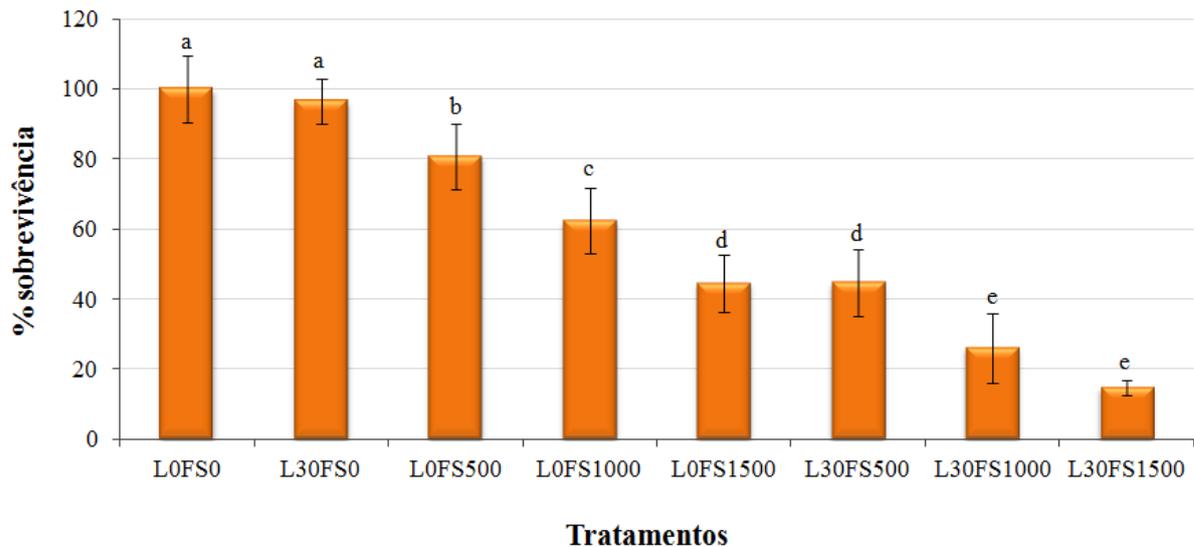


Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando sal de curcuminóides como FS nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ e irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 . O FS foi retirado antes da irradiação. Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L30FS0), controle do FS (L0FS500 / L0FS1000 / L0FS1500) e inativação fotodinâmica (L30FS500 / L30FS1000 / L30FS1500). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão.

Ao analisar o gráfico (Figura 11), observa-se que não houve redução na sobrevivência das amebas nos grupos testados, não existindo, portanto, diferença significativa entre os tratamentos. De acordo com estes resultados, observa-se que o sal de curcuminóides, provavelmente, não permaneceu no interior das amebas durante o processo de irradiação, pois

o efeito de morte encontrado anteriormente nos grupos controle do FS e IFD, com dose de luz de 30 J/cm^2 , não foi mais observado.

Figura 12 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – retirada do sal de curcuminóides após a IFD.



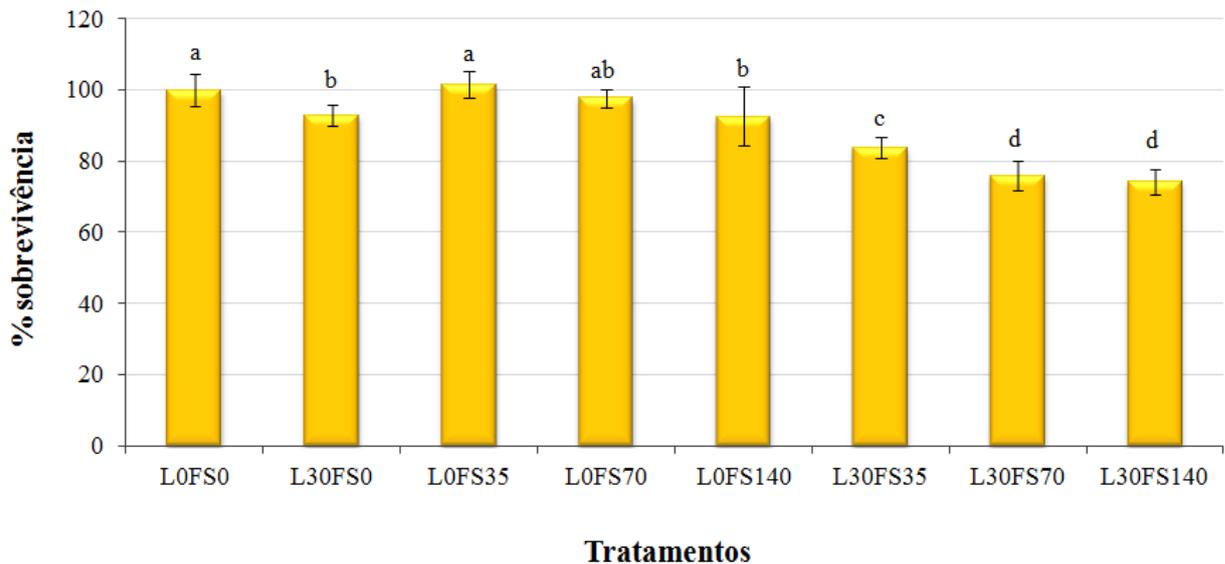
Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando sal de curcuminóides como FS nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ e irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 . O FS foi retirado após a irradiação. Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L30FS0), controle do FS (L0FS500 / L0FS1000 / L0FS1500) e inativação fotodinâmica (L30FS500 / L30FS1000 / L30FS1500). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A Figura 12 mostra os resultados da retirada do sal de curcuminóides após a irradiação das amostras, ou seja, ao final do experimento. Ao analisar o gráfico (Figura 12), observa-se um efeito muito próximo ao verificado no gráfico da Figura 9, pois não houve redução na sobrevivência de amebas com irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 , sendo 96,5% o total de amebas sobreviventes. Além disso, o sal de curcuminóides, quando avaliado isoladamente nos grupos controle do FS, reduziu a sobrevivência de amebas nas concentrações de 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$, sendo 80,7%, 62,4% e 44,6% o total de amebas sobreviventes, respectivamente. E nos grupos IFD observa-se também redução na sobrevivência de amebas, sendo 44,7%, 26,0% e 14,8% o total de amebas sobreviventes nas respectivas concentrações 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ com irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 . Estes resultados mostram um efeito acentuado de morte nos grupos IFD.

5.2. *Acanthamoeba polyphaga* e Curcumina

Os resultados da eficácia da IFD em *A. polyphaga* utilizando curcumina como FS nas concentrações de 35, 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$ e irradiação nas doses de luz de 30 e 50 J/cm^2 , no comprimento de onda 460 nm, estão representados nas Figuras 13 e 14.

Figura 13 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – curcumina e 30 J/cm^2 .



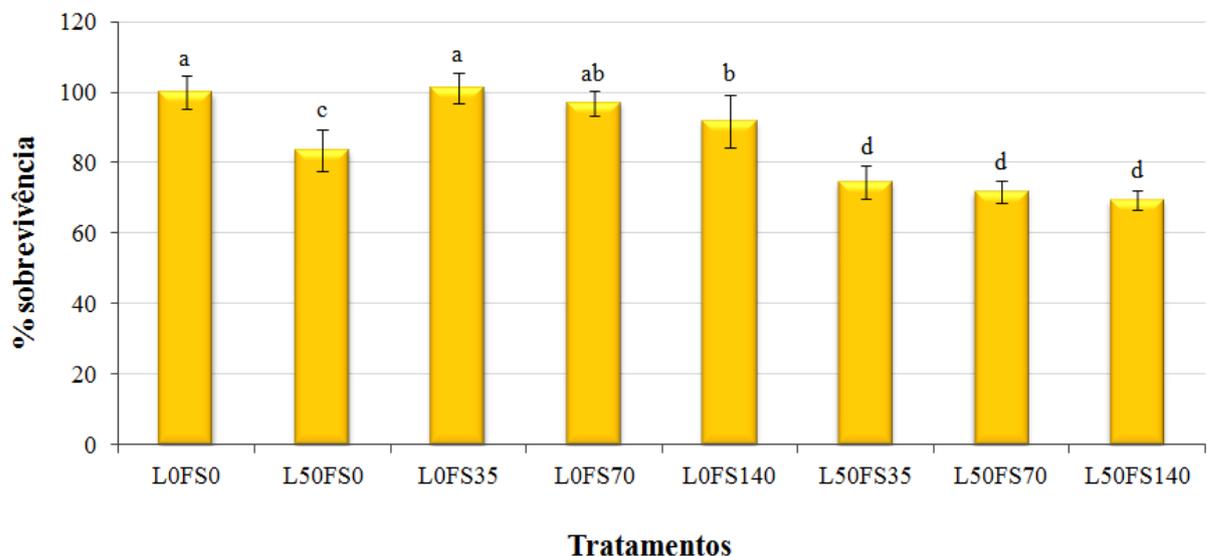
Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando curcumina como FS nas concentrações de 35, 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$ e irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 . Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L30FS0) controle do FS (L0FS35 / L0FS70 / L0FS140) e inativação fotodinâmica (L30FS35 / L30FS70 / L30FS140). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O efeito da luz foi avaliado isoladamente no grupo controle da luz. Ao analisar o gráfico (Figura 13), observa-se que houve pequena redução na sobrevivência de amebas com irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 , sendo 92,9% a porcentagem de amebas sobreviventes. O efeito da curcumina foi avaliado isoladamente nos grupos controle do FS, nos quais se observa que não houve redução na sobrevivência de amebas nas concentrações de 35 e 70 $\mu\text{g/mL}$, sendo 101,7% e 97,8% o total de amebas sobreviventes, respectivamente. Já na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$ houve pequena redução na sobrevivência de amebas, sendo 92,6% o total de amebas sobreviventes. Estes resultados indicam que a curcumina não apresentou toxicidade no escuro para as amebas, nas concentrações testadas.

Ao irradiar as amebas do grupo IFD com dose de luz de 30 J/cm^2 , observa-se redução na sobrevivência de amebas, sendo 83,8%, 76,0% e 74,3% o total de amebas sobreviventes

nas respectivas concentrações 35, 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com os resultados e a análise estatística, os grupos IFD apresentam diferença significativa do grupo controle e dos grupos controle do FS, sendo a porcentagem de redução nos grupos IFD resultado da ação fotodinâmica entre curcumina e luz. Entretanto, não foi observada diferença significativa dentro do grupo IFD nas concentrações de 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$. Apesar de serem notadas reduções na sobrevivência das amebas na IFD com a curcumina, tais reduções foram inferiores às obtidas na IFD com o sal de curcuminóides. Desse modo, nota-se um baixo efeito de morte causado pela inativação fotodinâmica com curcumina em *A. polyphaga* nas condições testadas.

Figura 14 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – curcumina e 50 J/cm^2 .



Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando curcumina como FS nas concentrações de 35, 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$ e irradiação nas doses de luz de 50 J/cm^2 . Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L50FS0), controle do FS (L0FS35 / L0FS70 / L0FS140) e inativação fotodinâmica (L50FS35 / L50FS70 / L50FS140). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação aos experimentos com curcumina e dose de luz de 50 J/cm^2 , ao analisar o gráfico (Figura 14) observa-se que o efeito da luz reduziu significativamente a sobrevivência de amebas no grupo controle da luz, sendo 83,6% o total de amebas sobreviventes. Quanto ao efeito da curcumina, quando avaliada isoladamente nos grupos controle do FS, observa-se que não houve redução na sobrevivência de amebas nas concentrações de 35 e 70 $\mu\text{g/mL}$, sendo 101,2% e 97,0% o total de amebas sobreviventes, respectivamente. Já na concentração de 140 $\mu\text{g/mL}$, houve pequena redução na sobrevivência de amebas, sendo 91,9% o total de amebas

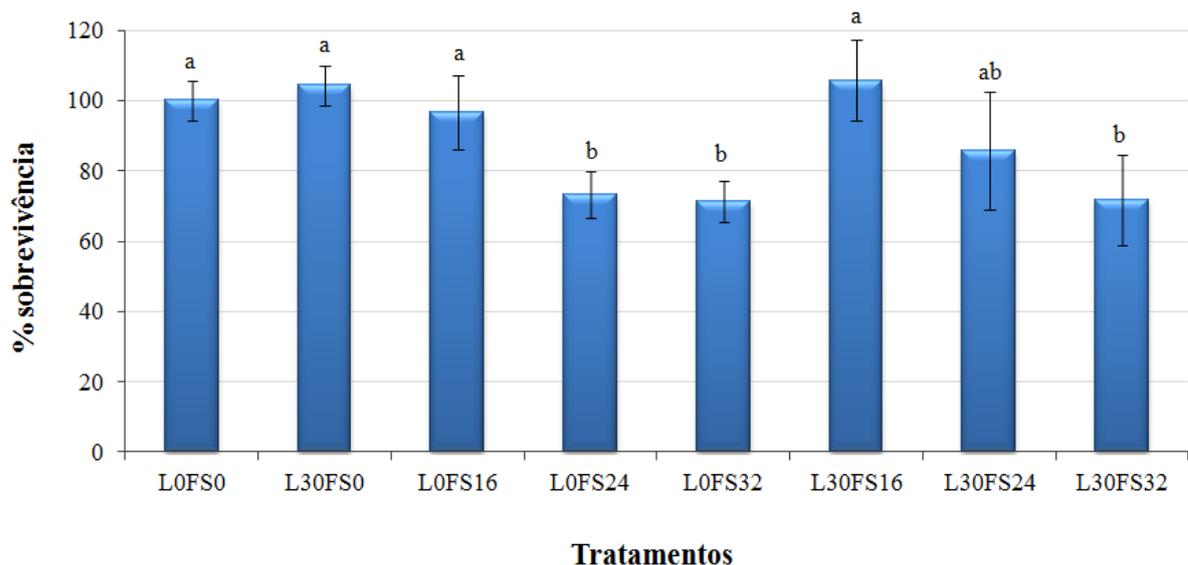
sobreviventes. Estes resultados indicam que a curcumina não apresentou toxicidade no escuro para as amebas, nas concentrações testadas.

Ao irradiar as amebas do grupo IFD na dose de luz de 50 J/cm^2 , observa-se redução na sobrevivência de amebas, sendo 74,6%, 71,7% e 69,5% o total de amebas sobreviventes nas respectivas concentrações 35, 70 e $140 \mu\text{g/mL}$. De acordo com estes resultados e a análise estatística, os grupos IFD apresentam diferença significativa do grupo controle e dos grupos controle do FS, sendo a porcentagem de redução nos grupos IFD resultado da ação fotodinâmica entre curcumina e luz. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre as diferentes concentrações de curcumina dentro do grupo IFD, sendo baixo o efeito de morte causado pela inativação fotodinâmica com curcumina em *A. polyphaga* nas condições testadas.

5.3. *Acanthamoeba polyphaga* e Azul de Metileno

Os resultados da eficácia da IFD em *A. polyphaga* utilizando azul de metileno como FS nas concentrações de 16, 24 e $32 \mu\text{g/mL}$ e irradiação nas doses de luz de 30 e 50 J/cm^2 , no comprimento de onda 630 nm, estão representados nas Figuras 15 e 16.

Figura 15 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – azul de metileno e 30 J/cm^2 .

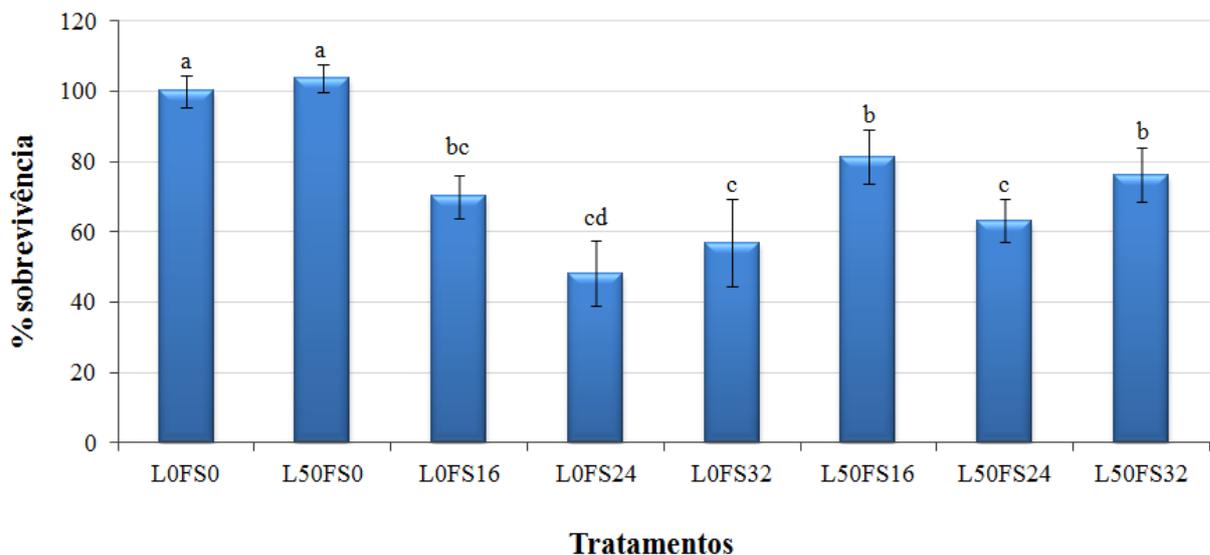


Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando azul de metileno como FS nas concentrações de 16, 24 e $32 \mu\text{g/mL}$ e irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 . Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L30FS0), controle do FS (L0FS16 / L0FS24 / L0FS32) e inativação fotodinâmica (L30FS16 / L30FS24 / L30FS32). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O efeito da luz foi avaliado isoladamente no grupo controle da luz. Ao analisar o gráfico (Figura 15), observa-se que não houve redução na sobrevivência de amebas com irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 , sendo 104,4% o total de amebas sobreviventes. O efeito do azul de metileno foi avaliado isoladamente nos grupos controle do FS, nos quais se observa redução na sobrevivência de amebas nas concentrações de 16, 24 e $32 \text{ }\mu\text{g/mL}$, sendo 96,7%, 73,4% e 71,4% o total de amebas sobreviventes, respectivamente. Estes resultados mostram que o azul de metileno apresentou toxicidade para as amebas, no escuro, nas concentrações de 24 e $32 \text{ }\mu\text{g/mL}$. E, apesar da maior redução ocorrer nestas concentrações, não se observa diferença significativa entre estes grupos.

Ao irradiar as amebas do grupo IFD na dose de luz de 30 J/cm^2 , observa-se redução na sobrevivência de amebas apenas nos grupos de maiores concentrações, sendo 85,9% e 71,7% o total de amebas sobreviventes nas respectivas concentrações 24 e $32 \text{ }\mu\text{g/mL}$. De acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa entre o grupo IFD com maior concentração e os grupos controle do FS nas concentrações de 24 e $32 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Assim, nota-se um baixo efeito de morte causado pela inativação fotodinâmica com azul de metileno em *A. polyphaga* nas condições testadas.

Figura 16 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – azul de metileno e 50 J/cm^2 .



Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando azul de metileno como FS nas concentrações de 16, 24 e $32 \text{ }\mu\text{g/mL}$ e irradiação na dose de luz de 50 J/cm^2 . Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L50FS0), controle do FS (L0FS16 / L0FS24 / L0FS32) e inativação fotodinâmica (L50FS16 / L50FS24 / L50FS32). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação aos experimentos com azul de metileno e dose de luz de 50 J/cm^2 , ao analisar o gráfico (Figura 16) observa-se que o efeito da luz não reduziu a sobrevivência de amebas no grupo controle da luz, sendo 103,6% o total de amebas sobreviventes. Quanto ao efeito do azul de metileno, quando avaliado isoladamente nos grupos controle do FS, observa-se redução mais acentuada na sobrevivência de amebas nas concentrações de 16, 24 e $32 \text{ } \mu\text{g/mL}$, sendo 70,0%, 48,1% e 56,9% o total de amebas sobreviventes, respectivamente.

Já ao irradiar as amebas do grupo IFD na dose de luz de 50 J/cm^2 , observa-se redução na sobrevivência de amebas, não tão acentuada como verificado com o FS isolado, sendo 81,3%, 63,1% e 76,1% o total de amebas sobreviventes nas respectivas concentrações 16, 24 e $32 \text{ } \mu\text{g/mL}$. De acordo com estes resultados, o azul de metileno exibiu toxicidade para as amebas, no escuro, nas concentrações testadas, mas quando associado à luz não apresentou efeito fotodinâmico desejado. Assim, nota-se um baixo efeito de morte causado pela inativação fotodinâmica com azul de metileno em *A. polyphaga*.

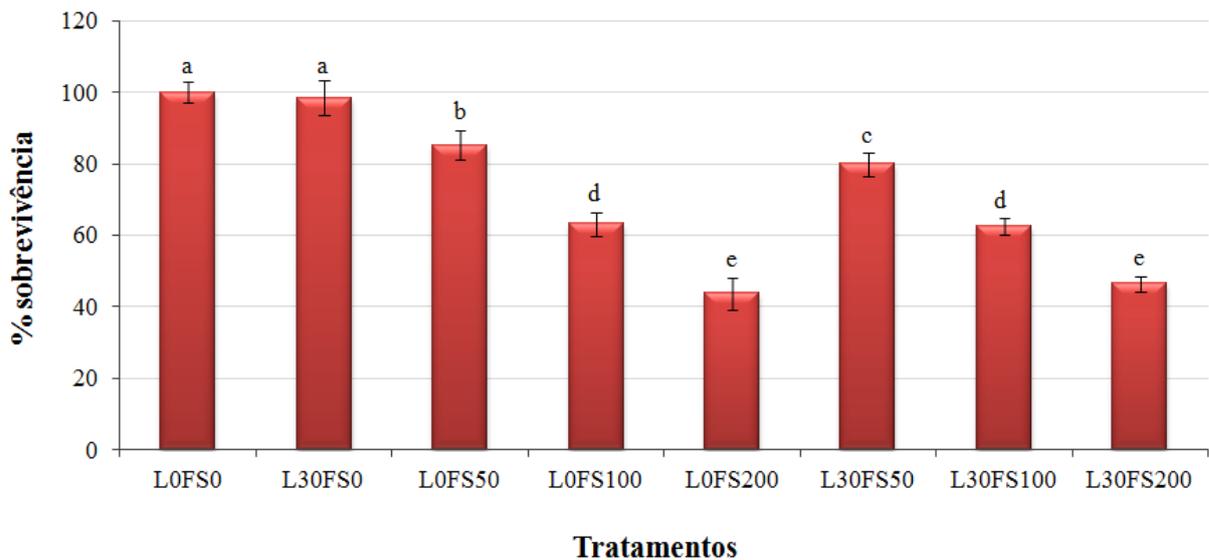
5.4. *Acanthamoeba polyphaga* e Photogem[®]

Os resultados da eficácia da IFD em *A. polyphaga* utilizando Photogem[®] como FS nas concentrações de 50, 100 e $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e irradiação nas doses de luz de 30 e 50 J/cm^2 , no comprimento de onda 630 nm, estão representados nas Figuras 17 e 18.

O efeito da luz foi avaliado isoladamente no grupo controle da luz. Ao analisar o gráfico (Figura 17), observa-se que não houve redução na sobrevivência de amebas com irradiação na dose de luz de 30 J/cm^2 , sendo 98,5% a porcentagem de amebas sobreviventes. O efeito do Photogem[®] foi avaliado isoladamente nos grupos controle do FS, nos quais se observa redução na sobrevivência de amebas nas concentrações de 50, 100 e $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$, sendo 85,2%, 63,2% e 43,7% o total de amebas sobreviventes, respectivamente. Estes resultados indicam que o Photogem[®] apresentou toxicidade no escuro para as amebas, nas concentrações testadas. Ao irradiar as amebas do grupo IFD com dose de luz de 30 J/cm^2 , observa-se redução na sobrevivência de amebas, sendo 79,9%, 62,4% e 46,5% o total de amebas sobreviventes nas respectivas concentrações 50, 100 e $200 \text{ } \mu\text{g/mL}$. De acordo com os resultados, os grupos IFD apresentam diferença significativa do grupo controle, mas não diferem dos grupos controle do FS nas respectivas concentrações, exceto o grupo IFD na

concentração 50 µg/mL. Apesar de serem notadas reduções na sobrevivência das amebas na IFD com o Photogem[®], tais reduções não ultrapassam 50% na viabilidade das amebas na maior concentração, sendo este um baixo efeito da inativação fotodinâmica em *A. polyphaga* nas condições testadas.

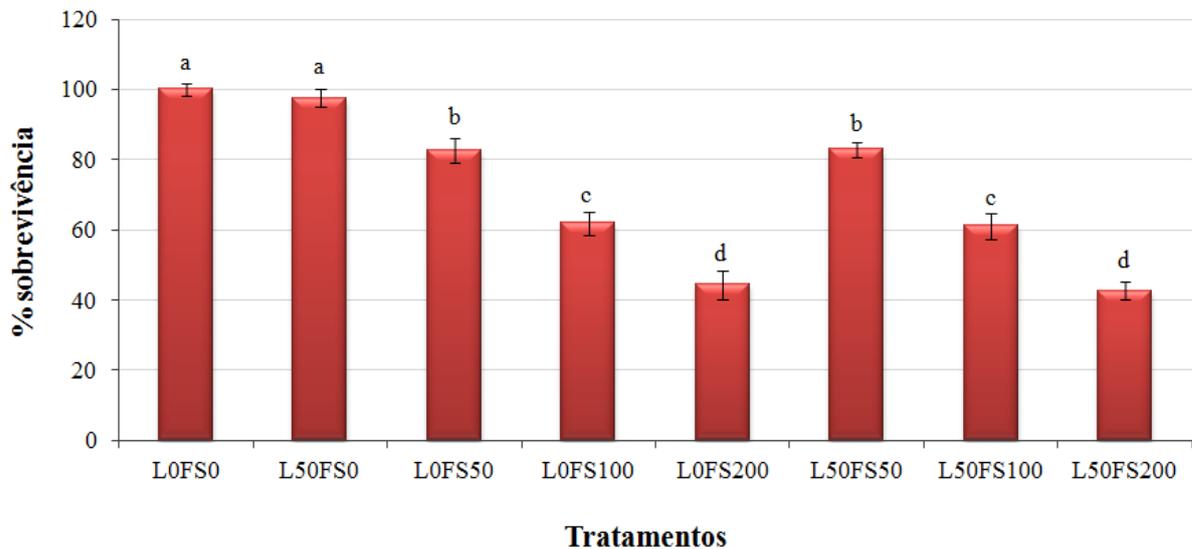
Figura 17 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – Photogem[®] e 30 J/cm².



Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando Photogem[®] como FS nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL e irradiação na dose de luz de 30 J/cm². Grupos: controle (LOFS0), controle da luz (L30FS0), controle do FS (LOFS50 / LOFS100 / LOFS200) e inativação fotodinâmica (L30FS50 / L30FS100 / L30FS200). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto aos experimentos com Photogem[®] e dose de luz de 50 J/cm², ao analisar o gráfico (Figura 18) observa-se que o efeito da luz não reduziu a sobrevivência de amebas no grupo controle da luz, sendo 97,5% o total de amebas sobreviventes. Quanto ao efeito do Photogem[®], quando avaliado isoladamente nos grupos controle do FS, observa-se redução na sobrevivência de amebas nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, sendo 82,8%, 61,9% e 44,4% o total de amebas sobreviventes, respectivamente. Já ao irradiar as amebas do grupo IFD na dose de luz de 50 J/cm², observa-se redução na sobrevivência de amebas, sendo 82,9%, 61,1% e 42,7% o total de amebas sobreviventes nas respectivas concentrações 50, 100 e 200 µg/mL. Entretanto, não há diferença significativa entre os grupos IFD e os grupos controle do FS nas concentrações equivalentes. De acordo com estes resultados, o Photogem[®] por si só apresentou toxicidade para as amebas, no escuro, nas concentrações testadas, e o efeito da luz, quando associado a este FS não apresentou efeito fotodinâmico desejado.

Figura 18 – Sobrevivência de *A. polyphaga* – Photogem[®] e 50 J/cm².

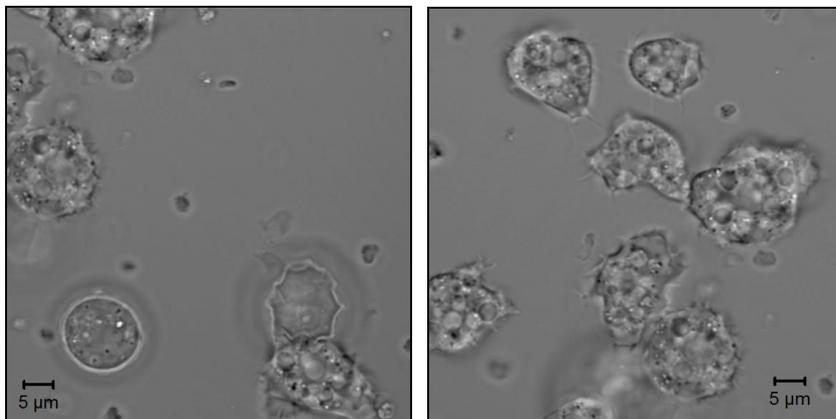


Porcentagem de sobrevivência de *A. polyphaga* utilizando Photogem[®] como FS nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL e irradiação na dose de luz de 50 J/cm². Grupos: controle (L0FS0), controle da luz (L50FS0), controle do FS (L0FS50 / L0FS100 / L0FS200) e inativação fotodinâmica (L50FS50 / L50FS100 / L50FS200). Os valores mostrados no gráfico são a média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.5. Observação de *Acanthamoeba polyphaga* em Microscopia Confocal

De acordo com a observação das imagens obtidas em microscopia confocal, as amebas apresentaram comportamentos variados, desde a não resposta por alguns organismos até a total resposta por outros. A Figura 19 mostra a condição dos trofozoítos antes da incubação com o sal de curcuminóides, sendo amebas do grupo controle. Neste grupo observou-se trofozoítos com 8 a 40 µm de diâmetro, com acantopódios, núcleo esférico e vacúolos no citoplasma, não sendo observadas mudanças morfológicas nos trofozoítos ao longo do tempo nesta condição.

Figura 19 – Trofozoítos de *A. polyphaga* do grupo controle.



Fonte própria. Imagem de transmissão de trofozoítos de *A. polyphaga* vistos em microscopia confocal. É possível observar trofozoítos com pseudópodos característicos do tipo acantopódio (aumento 40x).

Já no grupo correspondente às amebas incubadas com o sal de curcuminóides, observou-se mudança no comportamento e na morfologia dos trofozoítos, que se mostraram mais arredondados. Para melhor análise quanto ao efeito do sal de curcuminóides em *A. polyphaga*, quatro células individuais foram analisadas, sendo três na forma de trofozoíto (Figuras 20 a 22) e uma na forma de cisto (Figura 23).

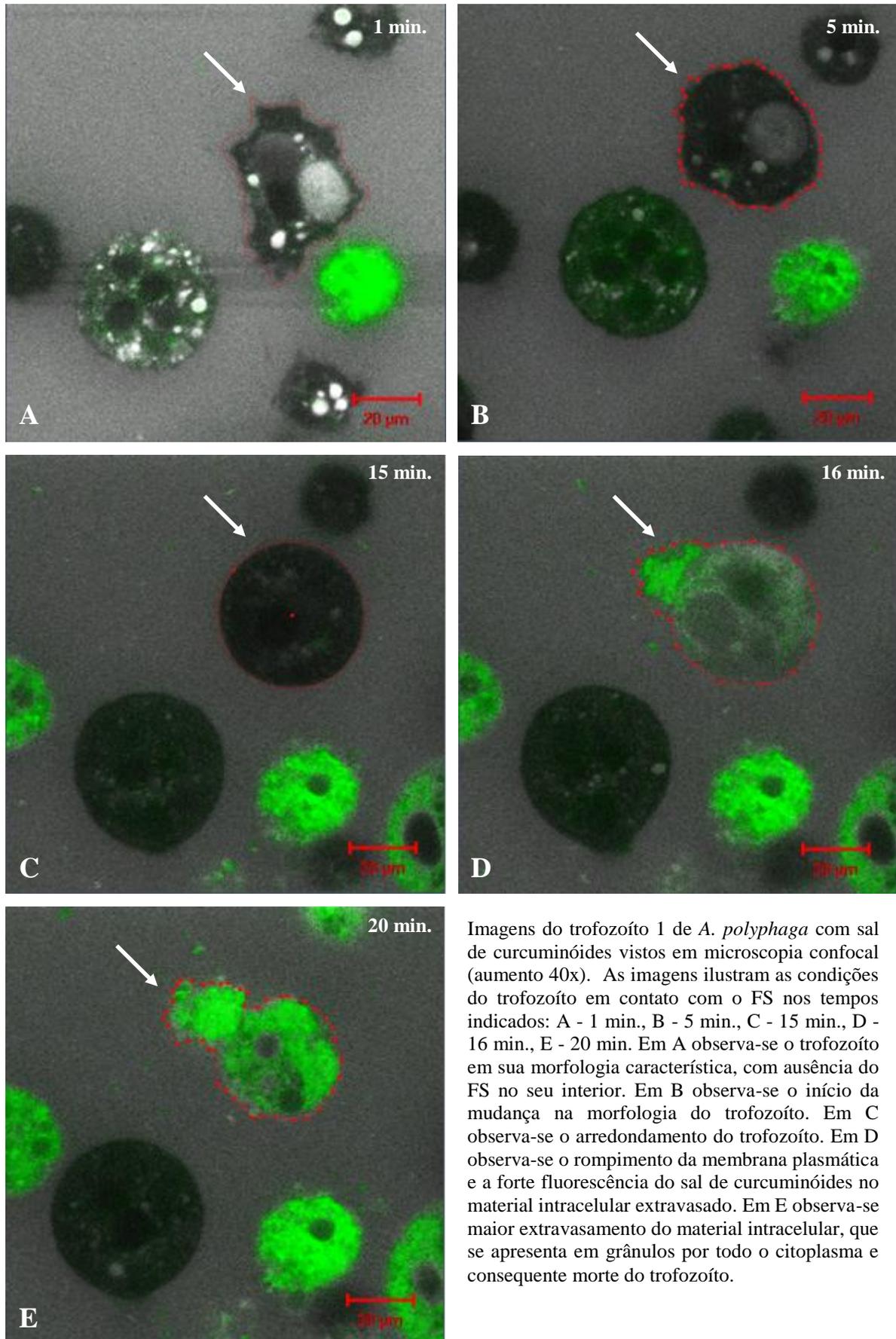
De maneira geral, a presença do FS induziu alterações na morfologia das células amebianas. Tais alterações variaram de ameba para ameba, pois diversos efeitos e comportamentos foram observados ao longo do tempo e em diferentes tempos. Dentre os eventos observados durante o período de contato das amebas com o FS, observou-se dano na membrana plasmática dos trofozoítos, entrada do FS nas células, extravasamento do conteúdo intracelular e, conseqüente morte em alguns indivíduos. Estas alterações estão apresentadas nas sequências de imagens das Figuras 20 a 22.

Ao analisar estas sequências de imagens das Figuras 20 a 22, correspondentes aos trofozoítos, observou-se a fluorescência verde do sal de curcuminóides a partir do momento em que houve entrada e acúmulo do FS nos trofozoítos. Este acúmulo do FS causou mudanças morfológicas nos trofozoítos, que passaram a ser observados em formato arredondado, exibindo diminuição e perda dos acantopódios. A partir disso, e somente após determinado tempo em contato com o FS, foram observadas alterações na membrana plasmática, com o seu posterior rompimento e permanência do FS no interior dos trofozoítos. Os últimos efeitos observados foram a granulação e o extravasamento do material intracelular.

Em relação ao cisto, ao analisar a sequência de imagens da Figura 23, também se observou o acúmulo do FS, entretanto, esse acúmulo ocorreu primeiramente entre a parede dupla de celulose. A partir disso, observou-se que o FS passou a ocupar todo o interior do cisto, concentrando-se cada vez mais com o passar do tempo.

Além destas observações, outra muito importante está relacionada ao tempo de penetração do FS nos trofozoítos. Ao analisar as imagens das Figuras 20 a 22, constatou-se que esse tempo variou de um trofozoíto para outro, sendo que cada um teve sua membrana rompida em um determinado momento, o que evidencia a grande variabilidade de comportamento dos trofozoítos em relação ao FS. O cisto apresentou comportamento diferente, pois com apenas um minuto de contato com o FS foi possível observar seu acúmulo entre a dupla parede cística. Esse efeito do tempo de penetração do FS nas amebas pode ser uma explicação para a baixa eficiência da IFD encontrada nestes microrganismos. Outra explicação pode ser a falta de ligação específica entre o FS e as células amebianas, fato observado no processo de retirada do FS, no qual não houve morte dos microrganismos.

Figura 20 – Imagens do trofozoíto de *A. polyphaga* com sal de curcuminóides.



Imagens do trofozoíto 1 de *A. polyphaga* com sal de curcuminóides vistos em microscopia confocal (aumento 40x). As imagens ilustram as condições do trofozoíto em contato com o FS nos tempos indicados: A - 1 min., B - 5 min., C - 15 min., D - 16 min., E - 20 min. Em A observa-se o trofozoíto em sua morfologia característica, com ausência do FS no seu interior. Em B observa-se o início da mudança na morfologia do trofozoíto. Em C observa-se o arredondamento do trofozoíto. Em D observa-se o rompimento da membrana plasmática e a forte fluorescência do sal de curcuminóides no material intracelular extravasado. Em E observa-se maior extravasamento do material intracelular, que se apresenta em grânulos por todo o citoplasma e consequente morte do trofozoíto.

Figura 21 – Imagens do trofozoíto de *A. polyphaga* com sal de curcuminóides.

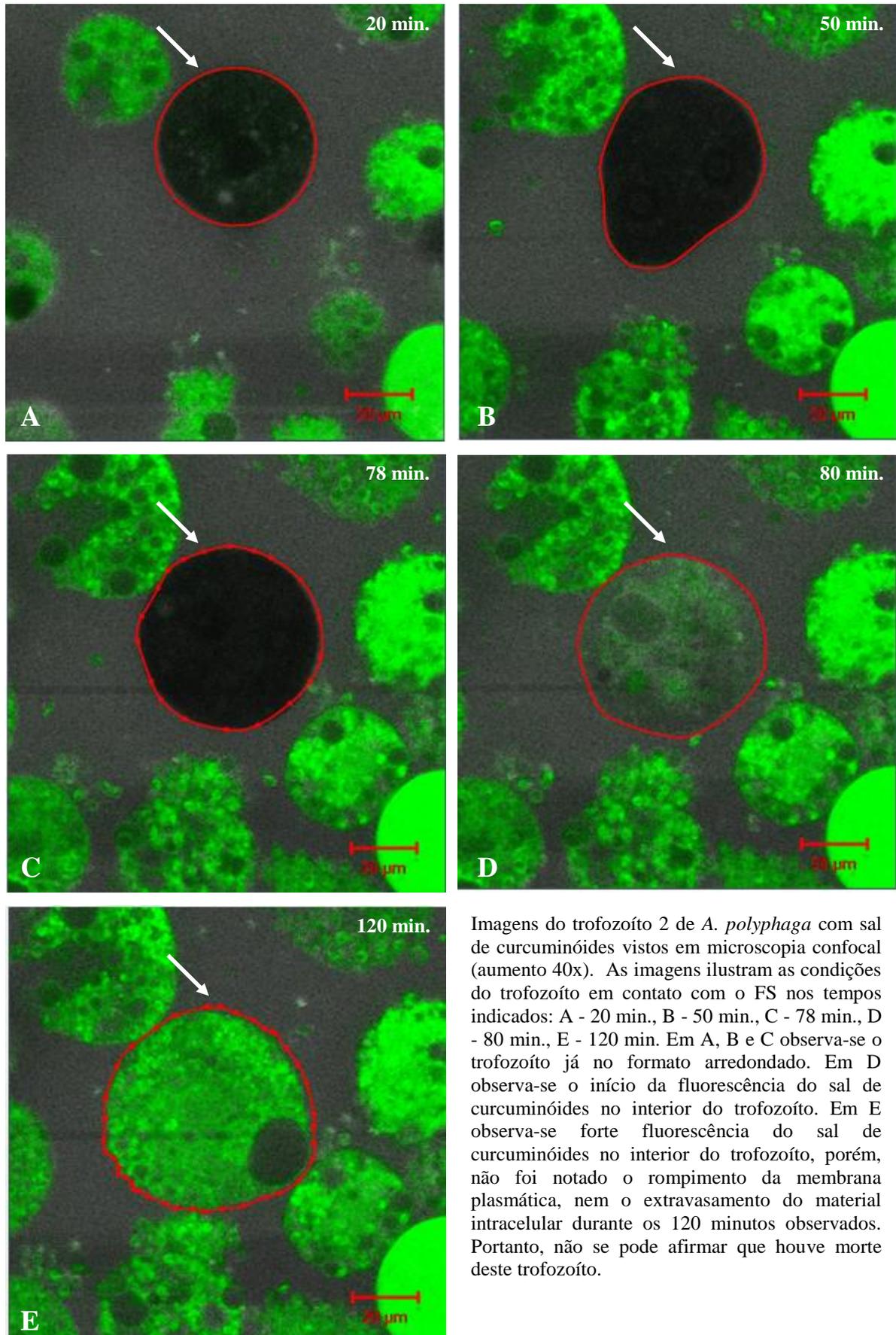
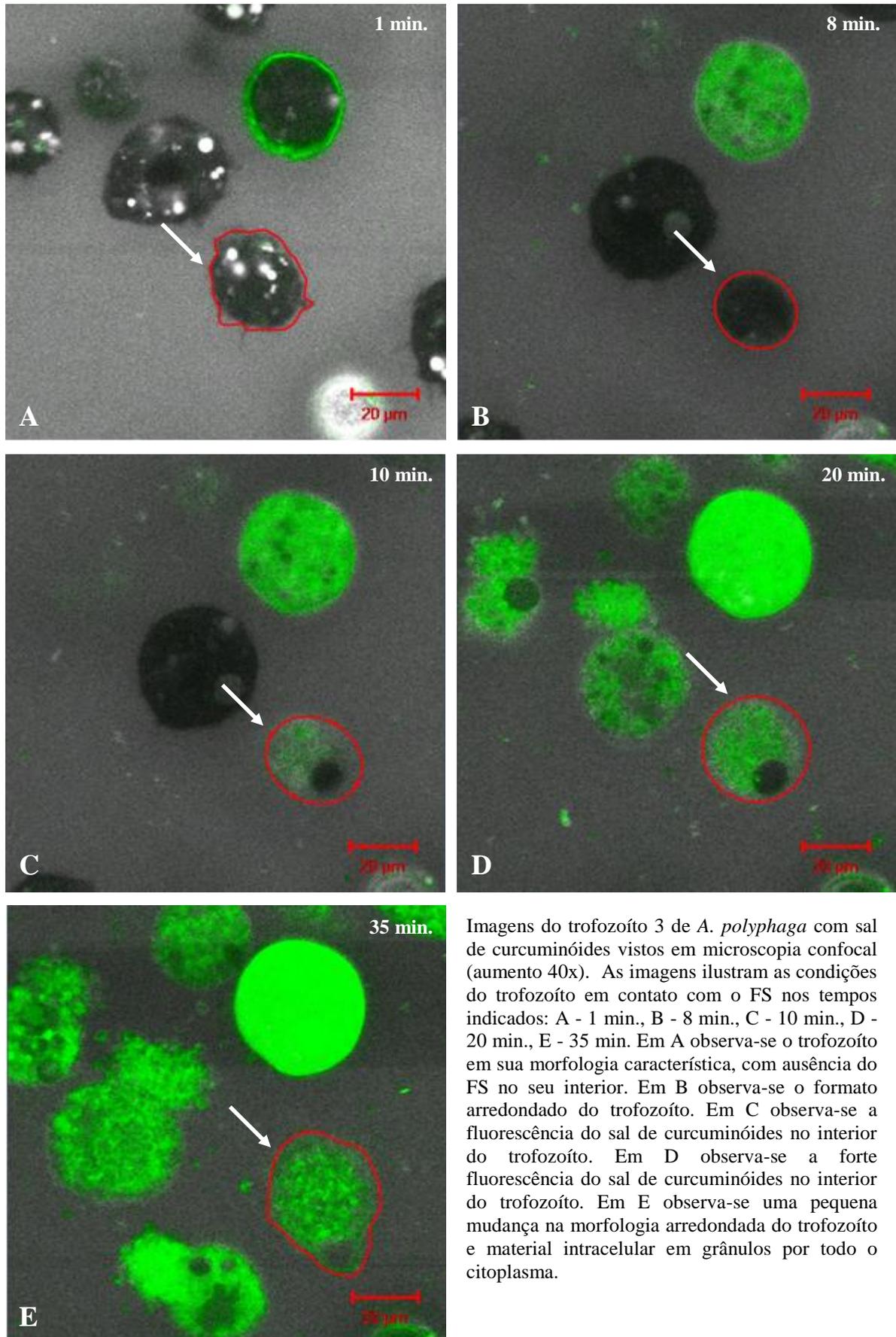
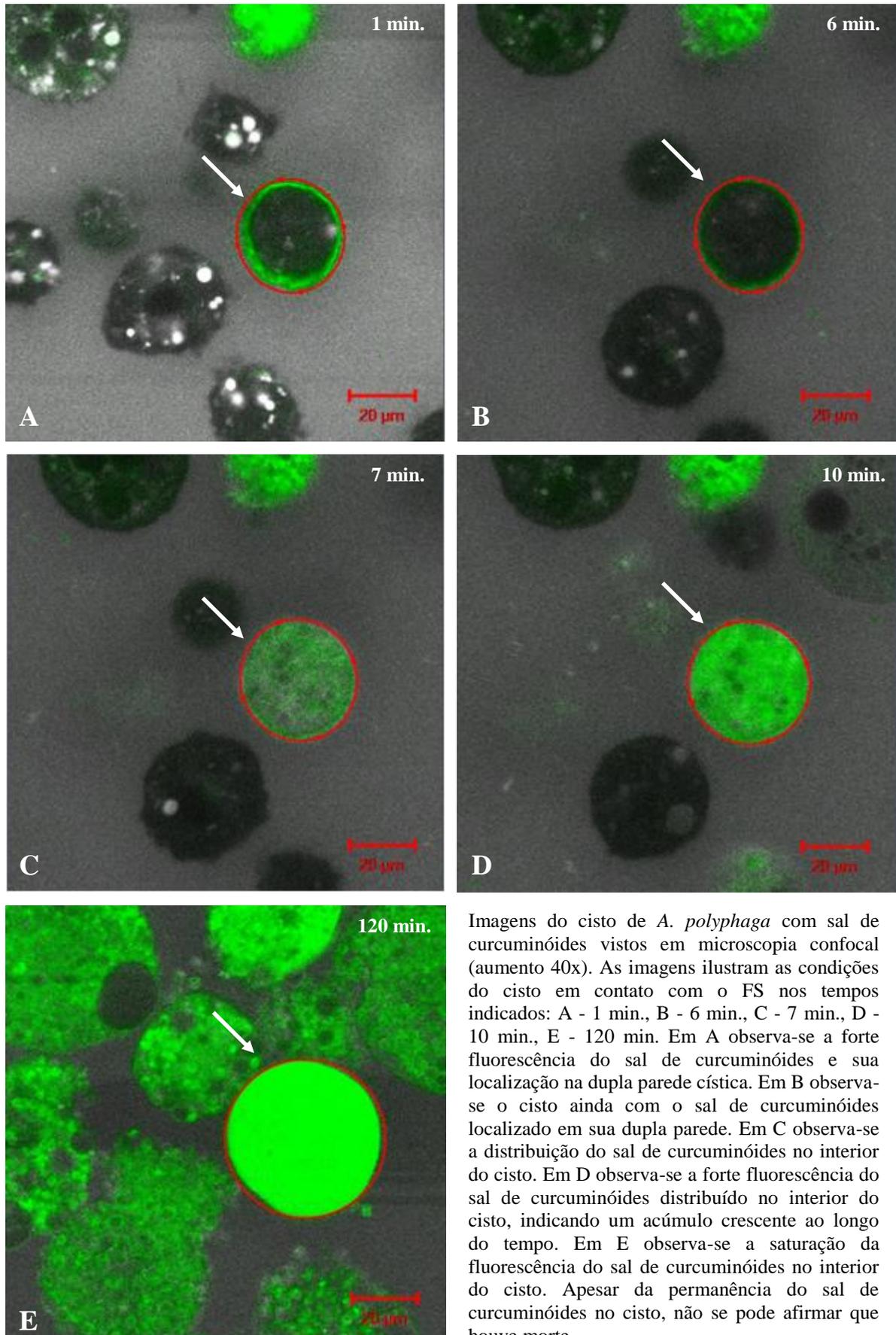


Figura 22 – Imagens do trofozoíto de *A. polyphaga* com sal de curcuminóides.



Imagens do trofozoíto 3 de *A. polyphaga* com sal de curcuminóides vistos em microscopia confocal (aumento 40x). As imagens ilustram as condições do trofozoíto em contato com o FS nos tempos indicados: A - 1 min., B - 8 min., C - 10 min., D - 20 min., E - 35 min. Em A observa-se o trofozoíto em sua morfologia característica, com ausência do FS no seu interior. Em B observa-se o formato arredondado do trofozoíto. Em C observa-se a fluorescência do sal de curcuminóides no interior do trofozoíto. Em D observa-se a forte fluorescência do sal de curcuminóides no interior do trofozoíto. Em E observa-se uma pequena mudança na morfologia arredondada do trofozoíto e material intracelular em grânulos por todo o citoplasma.

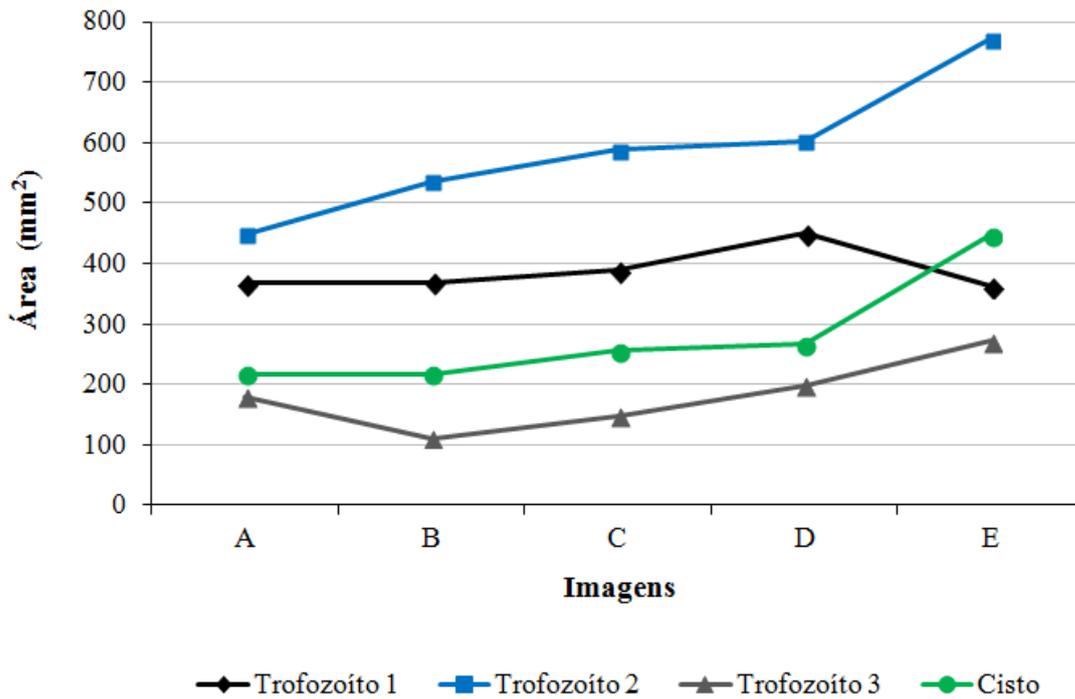
Figura 23 – Imagens do cisto de *A. polyphaga* com sal de curcuminóides.



Imagens do cisto de *A. polyphaga* com sal de curcuminóides vistos em microscopia confocal (aumento 40x). As imagens ilustram as condições do cisto em contato com o FS nos tempos indicados: A - 1 min., B - 6 min., C - 7 min., D - 10 min., E - 120 min. Em A observa-se a forte fluorescência do sal de curcuminóides e sua localização na dupla parede cística. Em B observa-se o cisto ainda com o sal de curcuminóides localizado em sua dupla parede. Em C observa-se a distribuição do sal de curcuminóides no interior do cisto. Em D observa-se a forte fluorescência do sal de curcuminóides distribuído no interior do cisto, indicando um acúmulo crescente ao longo do tempo. Em E observa-se a saturação da fluorescência do sal de curcuminóides no interior do cisto. Apesar da permanência do sal de curcuminóides no cisto, não se pode afirmar que houve morte.

Quanto à mudança na morfologia dos trofozoítos, além da observação do arredondamento, foi notado ainda um aumento no tamanho de suas células. O cisto também apresentou aumento no seu tamanho celular, conforme representado na Figura 24. Isso está relacionado, provavelmente, à entrada do FS nestes microrganismos.

Figura 24 – Mudanças no tamanho dos trofozoítos e cisto de *A. polyphaga*.



Os pontos do gráfico representam as mudanças nos tamanhos dos trofozoítos e do cisto observados nas Figuras 20 a 23, durante o contato com o sal de curcuminóides. Os valores indicam a área (mm²) de cada trofozoíto e cisto nos respectivos tempos das imagens A, B, C, D e E de cada figura (Figuras 20 a 23).

6. DISCUSSÃO

A inativação fotodinâmica como técnica para controle microbiano, embora promissora, encontra-se ainda em fase de desenvolvimento e o entendimento sobre os mecanismos que levam à inativação dos microrganismos encontra-se também em fase inicial de estudo. Poucos trabalhos são encontrados na literatura sobre a avaliação da ação fotodinâmica no controle de amebas de vida livre. Por isso, o presente estudo teve como objetivo geral analisar a eficácia da inativação fotodinâmica em *A. polyphaga* utilizando sal de curcuminóides, curcumina, azul de metileno e Photogem[®] como fotossensibilizadores.

De acordo com a análise dos resultados, diferentes respostas foram apresentadas pelos FS estudados, isto é, cada classe de FS, quando associada à luz aplicada, exibiu um efeito diferente sobre o microrganismo, uns com maior porcentagem de inativação do que outros. O sal de curcuminóides associado à luz dobrou o efeito de redução na viabilidade das amebas, sendo assim, foi o FS que apresentou melhores resultados na IFD. De modo geral, espera-se que os FS sejam pouco tóxicos em seu estado fundamental devendo ser ativados apenas quando iluminados por luz no comprimento de onda específico (JORI *et al.*, 2006; St. DENIS *et al.*, 2011). No entanto, os utilizados neste trabalho mostraram-se tóxicos no escuro nas concentrações testadas.

O sal de curcuminóides, por exemplo, mostrou a maior toxicidade no escuro e instabilidade após o preparo das soluções. No entanto, exibiu boa solubilidade em água, o que permitiu escolher elevadas concentrações, sendo mais eficaz do que a curcumina. Esta diferença na eficácia pode ser explicada pelas concentrações escolhidas. A curcumina limitou-se a uma concentração máxima de 140 µg/mL, respeitando a diluição em DMSO a 5%, não sendo possível aumentá-la devido à formação de agregados.

Estes agregados formam-se à medida que se aumenta a concentração do FS ou quando o mesmo apresenta caráter hidrofóbico, não se solubilizando de forma adequada em meio aquoso. A formação de agregados entre as moléculas do FS faz com que sejam poucos ativos, prejudicando a transferência de energia e a geração de oxigênio singleto (MacDONALD; DOUGHERTY, 2001). Outro problema observado em relação à curcumina foi o aumento da sua opacidade nas soluções mais concentradas, o que pode ter causado interferência na passagem da luz, resultando em reduções insatisfatórias. Tanto a formação de agregados quanto a opacidade das soluções podem ter prejudicado o desempenho da curcumina.

Ao analisar os resultados referentes aos experimentos de IFD com o sal de curcuminóides, observou-se redução gradual na sobrevivência das amebas conforme o

aumento da concentração do FS. Já ao analisar os resultados referentes aos experimentos de IFD com a curcumina, não se obteve o mesmo comportamento na sobrevivência das amebas de acordo com o aumento da concentração do FS. Os resultados mostraram que o sal de curcuminóides foi altamente tóxico para as amebas, no escuro, enquanto que a curcumina não apresentou esta toxicidade, sendo o efeito de morte conseguido por meio da ação fotodinâmica. Mas, mesmo havendo um efeito de morte, este foi considerado baixo nas concentrações e doses de luz escolhidas.

A diferença na eficácia dos resultados entre sal de curcuminóides e curcumina também pode ser explicada pelo princípio ativo presente em cada um dos FS. O princípio ativo do sal de curcuminóides é caracterizado por apresentar três compostos: curcumina, demetoxi-curcumina e bis-demetoxi-curcumina. Péret-Almeida *et al.* (2008) estudaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da planta *Curcuma longa* e seus resultados indicaram que o princípio ativo bis-demetoxi-curcumina é um agente antimicrobiano em potencial. Desse modo, o sal de curcuminóides atua mais fortemente como droga antimicrobiana do que a curcumina.

Apesar do sal de curcuminóides ter apresentado toxicidade para amebas e a curcumina não ter mostrado efeito fotodinâmico satisfatório, ambos foram utilizados neste trabalho devido às boas respostas obtidas em estudos publicados na literatura. Haukviki *et al.* (2009) mostraram que a curcumina em combinação com luz azul, no comprimento de onda 430 nm, foi eficaz na redução de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Streptococcus intermedius*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*). Segundo os autores, este efeito foi dependente da concentração utilizada da curcumina (2,5 a 25 μM , correspondente a 0,92 a 9,2 $\mu\text{g/mL}$) e da dose de luz empregada (0,5 a 30 J/cm^2), não sendo encontrados efeitos de toxicidade deste FS no escuro para as bactérias estudadas.

Os resultados do presente estudo também diferem dos encontrados por Dovigo *et al.* (2011a), que estudaram o efeito da curcumina associada a doses de luz no comprimento de onda 455 nm para inativar *Candida albicans*. Os autores conseguiram inativar a forma planctônica do fungo com baixas concentrações do FS e baixas doses de luz. Além deste estudo, Dovigo *et al.* (2011b) testaram a curcumina no intuito de avaliar seu efeito fotodinâmico em isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, e obtiveram 4 logs de redução ao utilizar baixas concentrações de curcumina associadas à baixas doses de luz.

Em um estudo mais recente, Ribeiro *et al.* (2012) avaliaram a eficácia da IFD com curcumina e luz no comprimento de onda 455 nm sobre *Staphylococcus aureus* resistente à

metecilina (MRSA). A concentração de 5 μM (correspondente a 1,84 $\mu\text{g/mL}$) combinada com baixa dose de luz (18 J/cm^2) foi suficiente para matar cepas suscetíveis à metecilina. No entanto, a maior concentração de curcumina (20 μM , correspondente a 7,84 $\mu\text{g/mL}$) combinada com dose de luz de 37,5 J/cm^2 foi necessária para inativar os MRSA. Assim, os resultados de morte foram causados exclusivamente pela ação da IFD, uma vez que tanto FS quanto luz, isoladamente, não apresentou efeitos tóxicos para as bactérias.

Quanto ao efeito isolado da luz azul (comprimento de onda 460 nm), não se observou redução na sobrevivência de amebas na dose de 30 J/cm^2 . Entretanto, doses de luz mais elevadas podem provocar redução nos microrganismos, apresentando um efeito fototóxico acentuado, como foi observado com a dose de 50 J/cm^2 para as amebas. Os baixos níveis de irradiação devem apresentar um comportamento atóxico para os microrganismos quando utilizados em IFD. Dadras *et al.* (2006) avaliaram os efeitos das baixas doses de irradiação em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e mostraram que, além de não terem sido tóxicas, estimularam o crescimento destas bactérias. Assim, os baixos níveis de irradiação podem causar a proliferação de certos microrganismos em determinadas condições, fenômeno conhecido como bioestimulação.

Em relação ao azul de metileno, os resultados apresentados mostraram que este FS não foi satisfatório na IFD de *A. polyphaga*, provavelmente devido às baixas concentrações utilizadas e dose de luz empregada. Além disso, o azul de metileno, quando incubado com as amebas nas concentrações de 24 e 32 $\mu\text{g/mL}$, apresentou toxicidade.

A toxicidade no escuro do azul de metileno também foi encontrada por Fontana (2007), que analisou os efeitos da IFD em microrganismos da placa dental em fase planctônica. Baixas concentrações deste FS (12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizadas seguidas de exposição à luz com doses de 30 e 60 J/cm^2 , no comprimento de onda 665 nm. A autora observou alta toxicidade do azul de metileno, no escuro, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, encontrando redução de 60% após 10 minutos de incubação. No presente estudo, a toxicidade do azul de metileno na concentração de 24 $\mu\text{g/mL}$ foi menor do que a encontrada por Fontana (2007) na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, sendo 51,9% a redução máxima obtida com este FS, no escuro, para as amebas.

Ao analisar os resultados referentes ao experimento de IFD com o azul de metileno, observou-se uma redução gradual na sobrevivência das amebas conforme o aumento da concentração do FS. Porém esta redução foi inferior à apresentada pelo sal de curcuminóides. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos controle do FS e os grupos IFD

dentro da mesma concentração, pois mesmo após a irradiação, não foram observadas reduções notáveis, mostrando que o azul de metileno, nas concentrações utilizadas, não apresentou efeito fotodinâmico eficaz para as amebas.

Apesar do azul de metileno não ter sido muito eficiente neste estudo e ter apresentado toxicidade, no escuro, para as amebas, outros trabalhos têm mostrado sua eficácia e pouca toxicidade quando utilizado em baixas concentrações. Usacheva *et al.* (2001), por exemplo, avaliaram o efeito do azul de metileno na redução bacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As concentrações do FS (1 a 200 μM , correspondente a 0,32 a 64 $\mu\text{g/mL}$) juntamente com a irradiação no comprimento de onda 630 nm nas doses de luz de 10 a 60 J/cm^2 mostraram que o azul de metileno foi eficiente na redução destas espécies, sendo mínima a sua toxicidade no escuro.

Song *et al.* (2011) estudaram a eficiência da ação fotodinâmica do azul de metileno com luz em *Leishmania amazonensis*. Após incubação do FS, no escuro, por 1 hora, as amostras foram iluminadas na dose de luz de 9 J/cm^2 , no comprimento de onda 650 nm. A resposta dose dependente do parasita ao azul de metileno com e sem iluminação mostrou que a toxicidade aumenta com o aumento das concentrações (5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 80 e 100 μM). De acordo com os autores, a concentração de 100 μM reduziu em 50% a viabilidade dos parasitas na ausência de luz, sendo o azul de metileno tóxico nesta concentração. Já as concentrações de 50 e 100 μM na presença da luz (9 J/cm^2) reduziram aproximadamente 90% a viabilidade dos parasitas, sendo a IFD eficaz no controle de *Leishmania amazonensis* e promissora para o tratamento de leishmaniose cutânea. Estes resultados diferem dos obtidos no presente estudo, pois quando a IFD foi realizada com 32 $\mu\text{g/mL}$ e dose de luz de 30 J/cm^2 a redução foi de apenas 28,3% para as amebas, e de 23,9% com irradiação na dose de 50 J/cm^2 .

Quanto ao estudo de IFD em amebas de vida livre, Mito *et al.* (2012) avaliaram o efeito do azul de metileno como FS em *A. castellanii*. Os autores não observaram toxicidade deste FS no escuro na maior concentração testada (500 μM , correspondente a 160 $\mu\text{g/mL}$). Quando esta concentração foi associada com baixa dose de luz (10,8 J/cm^2), no comprimento de onda 660 nm, os resultados mostraram efetividade na IFD, sendo a atividade respiratória significativamente menor (11,6%) quando comparada ao grupo controle. Este foi o único trabalho encontrado até o momento sobre IFD em amebas de vida livre, com o uso do azul de metileno associado à luz. Os resultados apresentados pelos autores diferem dos obtidos no presente estudo, pois concentrações de azul de metileno inferiores a 500 μM já apresentaram

toxicidade no escuro para *A. polyphaga* e, além disso, a associação com luz não resultou em redução satisfatória. Uma explicação para esta diferença de resultados na IFD utilizando azul de metileno como FS pode ser a espécie de ameba estudada. Como as espécies são distintas, as respostas aos tratamentos também podem diferenciar. Outro fator é que a cepa de *A. polyphaga* utilizada trata-se de um isolado clínico.

Em relação ao Photogem[®], os resultados apresentados mostraram que este FS também apresentou toxicidade no escuro para as amebas nas concentrações utilizadas. Quando as amebas incubadas com Photogem[®] foram iluminadas nas doses de luz de 30 e 50 J/cm², não foram observadas maiores reduções comparado aos grupos controle do FS nas respectivas concentrações. Assim, ao analisar os resultados referentes ao experimento de IFD com o FS Photogem[®], observou-se uma redução gradual na sobrevivência das amebas conforme o aumento da concentração do FS, sendo a resposta dose-dependente neste caso. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos controle do FS e os grupos IFD dentro de cada concentração testada, indicando que as doses de luz empregadas não acentuaram o efeito causado pelo FS.

Apesar da toxicidade apresentada no escuro e da pouca eficiência do Photogem[®] na IFD de *A. polyphaga*, outros trabalhos têm mostrado boas respostas quando utilizado em baixas concentrações. Giusti *et al.* (2008) avaliaram o Photogem[®] na descontaminação de dentina bovina cariada com *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus mutans*. As concentrações testadas (1, 2 e 3 mg/mL) e as doses de luz empregadas (24 e 48 J/cm²), no comprimento de onda 630 nm, mostraram redução efetiva das bactérias, mas o Photogem[®] apresentou toxicidade no escuro nas maiores concentrações. Em outro estudo, Gois *et al.* (2010) também observaram toxicidade do Photogem[®], no escuro, ao avaliar seu efeito na IFD de *Staphylococcus aureus*. Concentrações de 12, 25 e 50 µL/mL e doses de luz de 20, 40 e 60 J/cm², irradiadas no comprimento de onda 628 nm, foram testadas. Os resultados indicaram que a melhor resposta de inativação foi conseguida com 25 e 50 µL/mL e dose de luz de 60 J/cm².

Quanto ao efeito isolado da luz vermelha (comprimento de onda 630 nm), não se observou redução na sobrevivência de amebas, não sendo tóxica para estes microrganismos nas doses de luz empregadas. Este resultado está de acordo com os estudos de Kassab *et al.* (2003), Ferro *et al.* (2006) e Mito *et al.* (2012), que mostraram a ausência de toxicidade da luz vermelha, no comprimento de onda 600-700 nm, sobre amebas.

Os resultados dos experimentos da retirada do sal de curcuminóides mostraram que, provavelmente, este FS não permaneceu ligado em qualquer estrutura no interior das amebas ou na superfície, pois os efeitos de morte apresentados não foram mais observados após este

procedimento. Talvez este fato possa ser explicado pela ausência de ligação específica entre o FS testado e as estruturas celulares das amebas. Segundo Hamblin e Hasan (2004), para que haja efeito fotodinâmico eficaz, é desejável que o FS entre no microrganismo e permaneça em seu interior por meio de alguma ligação, mais ou menos específica, com suas estruturas. No entanto, acredita-se que ao garantir a entrada e internalização do FS nos microrganismos já seja o suficiente para gerar reações que os levam à morte, não sendo necessário haver ligação específica com alguma estrutura celular. De acordo com Jori *et al.* (2006), a entrada do FS no microrganismo pode ser facilitada pelo aumento na permeabilidade da membrana, sendo esta permeabilidade um fator importante durante os processos fotoquímicos iniciais para acentuar o efeito da IFD.

Quanto à observação das alterações morfológicas causadas pelo sal de curcuminóides em células individuais de *A. polyphaga*, as análises das imagens obtidas pela microscopia confocal mostraram que o sal de curcuminóides entrou em algumas amebas, mesmo quando estas estavam na fase cística. De acordo com as imagens, e apesar de aparentemente não haver ligação específica entre o FS e as estruturas amebianas, a fluorescência do sal de curcuminóides apareceu na membrana plasmática e nos vacúolos dos trofozoítos e na dupla parede dos cistos.

A análise microscópica mostrou claramente a mudança na morfologia dos trofozoítos, que passaram a apresentar-se em formato arredondado, sem os pseudópodes característicos. A turgidez provocada nos trofozoítos sugere a perda das funções dos vacúolos devido ao aumento da pressão interna provocada pela entrada do sal de curcuminóides. Esse comprometimento das funções dos vacúolos, os principais locais da osmorregulação, pode ter causado a morte nos trofozoítos. Além disso, os trofozoítos foram vistos com alto grau de granulosidade por todo o citoplasma.

De acordo com Kassab *et al.* (2003), o dano celular ocorrido em amebas pode ser resultado do alargamento dos vacúolos decorrido, provavelmente, das alterações de equilíbrio osmótico que estes microrganismos sofreram. Este conjunto de fatores leva à redução da viabilidade celular. Tais efeitos também foram analisados por Ferro *et al.* (2009), que observaram a formação de um grande vacúolo pela fusão de diversas vesículas pequenas, o que evidenciou um estado de insuficiência do controle osmótico pelas amebas. Também observaram o aumento no tamanho dos trofozoítos e perda dos acantopódios.

As mudanças morfológicas também foram observadas no cisto, que sofreu aumento no seu tamanho. Uma explicação para isso pode ser a ruptura da membrana interna, ocasionando acúmulo do sal de curcuminóides em seu interior e aumento da pressão interna. Esse aumento

no tamanho, tanto dos trofozoítos quanto do cisto, pode estar associado ao início da morte celular em *A. polyphaga*. De acordo com Fabris *et al.* (2012), que estudaram o efeito de uma porfirina tetracatiônica em cistos de *Colpoda inflata*, as análises microscópicas mostraram que os cistos exibiram morfologia danificada e extensa vacuolização após a IFD. Além disso, os autores observaram que a fluorescência do FS foi amplamente difundida nos cistos do protozoário, mesmo sendo observada em maior quantidade na parede celular e na membrana plasmática. Esta observação está de acordo com o acúmulo de sal de curcuminóides verificado no cisto de *A. polyphaga* do presente estudo.

Entretanto, mesmo observando tais alterações morfológicas, não se pode afirmar que houve morte, pois quando o FS não é bem distribuído nas células do microrganismo, o efeito fotodinâmico não é homogêneo, sendo que algumas células de *A. polyphaga* podem ser inativadas, enquanto outras não passam pelo processo de inativação. Assim, mesmo que haja inativação de algumas células amebianas durante o período de contato com o FS, o grau em que ela ocorre não é determinado e o microrganismo pode recuperar seu crescimento devido às células íntegras que restaram e também devido à distribuição não uniforme do FS.

Apesar da eficiente redução causada pela IFD em diversos microrganismos, esta técnica apresentou alguns problemas quando aplicada em *A. polyphaga* com os FS escolhidos. Sabe-se que a eficácia da IFD depende da escolha dos FS mais apropriados e também de estudos que determinam os melhores parâmetros a serem utilizados, como por exemplo, concentrações dos FS, doses e fontes de luz mais adequadas (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI *et al.*, 2006). No caso das bactérias, que são os microrganismos mais estudados em IFD, a inativação acontece principalmente devido às modificações na membrana plasmática (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI *et al.*, 2006), porém em amebas os mecanismos que levam à morte ainda não são bem conhecidos.

Embora os estudos com IFD em amebas de vida livre sejam promissores, conforme mostraram os trabalhos de Kassab *et al.* (2003), Ferro *et al.* (2006), Chen *et al.* (2008), Ferro *et al.* (2009) e Mito *et al.* (2012), a carência no número de estudos bem delineados e a variabilidade nas metodologias encontradas dificultam a sua realização. Nesse sentido, novas pesquisas são necessárias para compreender o comportamento destes microrganismos e o motivo de alguns terem apresentado resposta positiva enquanto outros se mostraram indiferentes à IFD.

7. CONCLUSÕES

Apesar da variabilidade dos resultados apresentados, conclui-se que os FS utilizados neste trabalho, sal de curcuminóides, curcumina, azul de metileno e Photogem[®], apresentaram toxicidade para as amebas, na ausência de luz, nas concentrações estudadas. O uso isolado da luz não apresentou efeito fototóxico para as amebas nas doses empregadas, exceto a dose de 50 J/cm², no comprimento de onda 460 nm, que foi tóxica na condição testada.

Em relação à IFD, a fototoxicidade proporcionada pelas doses de luz empregadas junto aos FS utilizados contribuiu para o efeito de morte das amebas quando utilizado o sal de curcuminóides como FS. Já para os demais FS, a técnica mostrou-se pouco eficiente para este microrganismo nas condições testadas.

A retirada do FS sal de curcuminóides, após o período de incubação, influenciou diretamente a efetividade da IFD, pois a irradiação das amostras após a retirada do FS do meio não causou redução na sobrevivência de amebas, indicando que provavelmente o FS não se ligou às estruturas amebianas.

Por fim, a visualização das amebas em microscopia confocal mostrou que a presença do sal de curcuminóides causou danos em algumas amebas, confirmando a toxicidade no escuro deste FS para tais microrganismos, nas concentrações estudadas. Portanto, com base nos resultados obtidos, conclui-se que apenas o contato com o FS já é capaz de induzir mudanças morfológicas drásticas em trofozoítos de *A. polyphaga*, além de causar sérios danos na membrana celular, levando alguns indivíduos à morte.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGGARWAL, B.B.; SUNDARAM, C.; MALANI, N.; ICHIKAWA, H. Curcumin: the Indian solid gold. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.595, p.1-75, 2007.
2. AKSOZEK, A.; McCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. **J. Parasitol.**, v.88, p.621-623, 2002.
3. ALLISON, R.R.; BOWIE, G.H.; CUENCA, R.; HU, X.H.; CHILDS, C.J.H.; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, v.1, p.27-42, 2004.
4. BAGNATO, V.S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. 1ª edição. São Paulo: Livraria da Física, 2008. 239p.
5. BARNES, R.D.; RUPPERT, E.E.; FOX, R.S. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª edição. São Paulo: Roca, 2005. 1145 p.
6. BORAZJANI, R.N.; MAY, L.L.; NOBLE, J.A.; AVERY, S.V.; AHEARN, D.G. Flow cytometry for determination of the efficacy of contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.1057-1061, 2000.
7. BRAGA, F.M.P. **Influência da terapia fotodinâmica sobre a interação *Yersinia enterocolitica*- célula hospedeira**. 52 f. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2007.
8. BROWN, M.R.; BARKER, J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. **Trends in Microbiol.**, p.46-50, 1999.
9. 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.**, v. 4, p. 523-530, 2005.
10. CAMPBELL, F.C.; COLLETT, P.G. Chemopreventive properties of curcumin. **Fut. Oncol.**, v.1, p.405-414, 2005.

11. CHEN, Z.; XUGUANG, S.; ZHIQUN, W.; RAN, L. In vitro amoebacidal activity of photodynamic therapy on *Acanthamoeba*. **Br. J. Ophthalmol.**, v.92, p.1283-1286, 2008.
12. CLARKE, D.W.; NIEDERKORN, J.Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba keratitis*. **Trends Parasitol.**, v.22, p.175-80, 2006.
13. DADRAS, S.; MOHAJERANI, E.; EFTEKHAR, F.; HOSSEINI, M. Different photoresponses of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to 514, 532, and 633 nm low level lasers in vitro. **Current Microbiol.**, v.53, p.282-286, 2006.
14. DENDANA, F.; SELLAMI, H.; JARRAYA, F.; SELLAMI, A.; MAKNI, F.; CHEIKHROUHOU, F. Free-living amoebae: detection, morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* genus in the hydraulic system of an hemodialysis unit in Tunisia. **Parasite**, v.15, p.137-42, 2008.
15. DONNELLY, R.F.; McCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiol. Res.**, v.163, p.1-12, 2008.
16. DOVIGO, L.; PAVARINA, A.C.; MIMA, E.G.; GIAMPAOLO, E.T.; VERGANI, C.E.; BAGNATO, V.S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v.54, p.123-130, 2009.
17. DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, A.P.D.; 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*. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.87, p.895-903, 2011a.
18. 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. **Lasers Surg. Med.**, v.43, p.927-934, 2011b.
19. EPSTEIN, J.; SANDERSON, I.R.; MacDONALD, T.T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. **Br. J. Nutr.**, v.103, p.1545-1557, 2010.
20. FEESE, E.; GHILADI, R.A. Highly efficient in vitro photodynamic inactivation of *Mycobacterium smegmatis*. **J. Antimicrobiol. Chemother.**, v.64, p.782-785, 2009.

21. FABRIS, C.; SONCIN, M.; JORI, G.; HABLUETZEL, A.; LUCANTONI, L.; SAWADOGO, S.; GUIDOLIN, L.; COPPELLOTTI, O. Effects of a new photoactivatable cationic porphyrin on ciliated protozoa and branchiopod crustaceans, potential components of freshwater ecosystems polluted by pathogenic agents and their vectors. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.11, p.294-301, 2012.

22. FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C.; SOUSA G.; ZÂNGARO, R.A.; SILVA, N.S.; PACHECO, M.T.T.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament after PDT with AIPsS4. **Lasers Med. Sci.**, v.18, p.207-212, 2004.

23. FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; RONCUCCI, G.; BEN AMOR, T.; JORI, G. Photosensitized inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* in the cystic stage. **J. Appl. Microbiol.**, v.101, p.206-212, 2006.

24. FERRO, S.; GUIDOLIN, L.; TOGNON, G.; JORI, G.; COPPELLOTTI, O. Mechanisms involved in the photosensitized inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* trophozoites. **J. Appl. Microbiol.**, v.107, p.1615-1623, 2009.

25. FONTANA, C.R. **Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em bactérias periodontopatogênicas em fase planctônica e em biofilme de múltiplas espécies.** 221 f. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

26. 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.**, v.48, n.6, p.2173-2178, 2004.

27. GIUSTI, J.S.M.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A.C.; HELMERSON, K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomed. Laser Surg.**, v.26, p.281-287, 2008.

28. 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. **Lasers Med. Sci.**, v.25, p.391-395, 2010.

29. GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, p.413-433, 2004.

30. HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.3, no.5, p.436-450, 2004.
31. HAUKVIK, T.; BRUZELL, E.; KRISTENSEN, S.; TØNNESEN, H.H. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v.64, p.666-673, 2009.
32. HEASELGRAVE, W.; PATEL, N.; KILVINGTON, S.; KEHOE, S. C.; MCGUIGAN, K.G. Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water – a laboratory study using simulated sunlight. **Letters Appl. Microbiol.**, v.43, p.125-130, 2006.
33. HEGGE, A.B.; ANDERSEN, T.; MELVIK, J.E.; KRISTENSEN, S.; TØNNESEN, H.H. Evaluation of novel alginate foams as drug delivery systems in antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) of infected wounds - an in vitro study: studies on curcumin and curcuminoids XL. **J. Pharm. Sci.**, v.99, n.8, p.3499-3513, 2010.
34. HOFFMANN, R.; MICHEL, R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v.203, p.215-219, 2001.
35. HUANG, L.; XUAN, Y.; KOIDE, Y.; ZHIYENTAYEV, T.; TANAKA, M.; HAMBLIN, M.R. Type I and type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Lasers in Surg. Med.**, v.44, p.490-499, 2012.
36. HUGHES, R.; KILVINGTON, S. Comparison of hydrogen peroxide contact lens disinfection systems and solutions against *A. polyphaga*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.45, p.2038-2043, 2001.
37. HUSSAIN, S.; HARRIS, F.; PHOENIX, D.A. The phototoxicity of phenothiazinium-based photosensitizers to bacterial membranes. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v.46, p.124-130, 2006.
38. HUWS, S.A.; MORLEY, R.J.; JONES, M.V.; BROWN, M.R.W.; SMITH, A.W. Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. **FEMS Microbiol. Letters**, v.282, p.258-265, 2008.
39. JORI, G.; BROWN, S.B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.3, p.403-405, 2004.

40. JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.25, p.505-519, 2006.
41. JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg. Med.**, v.38, p.468-481, 2006.
42. KASSAB, K.; DEI, D.; RONCUCCI, G.; JORI, G.; COPPELLOTTI, O. Phthalocyanine-photosensitized inactivation of a pathogenic protozoan, *Acanthamoeba palestinensis*. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.2, p.668-672, 2003.
43. KAUR, S.; MODI, N.H.; PANDA, D.; ROY, N. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ – A structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. **Eur. J. Med. Chem.**, v.45, p.4209-4214, 2010.
44. KHAN, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.30, p.564-595, 2006.
45. KHARKWAL, G.B.; SHARMA, S.K.; HUANG, Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers Surg. Med.**, v.43, p.755-767, 2011.
46. KOLEV, T.M.; VELCHEVA, E.A.; STAMBOLIYSKA, B.A.; SPITETTER, M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. **Int. J. Quantum Chem.**, v.102, p.1069-1079, 2005.
47. KONAN, Y.N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol.**, v.66, p.89-106, 2002.
48. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5ª edição. Rio de Janeiro: MESDI Editora Médica e Científica Ltda, 2001.
49. MacDONALD, I.J.; DOUGHERTY, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **J. Porphyr. Phthalocyanines**, v.5, p.105-129, 2001.
50. MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med. Sci.** v.22, p.83-91, 2007.

51. MANTAREVA, V.; KUSSOVSKI, V.; ANGELOV, I.; WHÖRLE, D.; DIMITROV, R.; POPOVA, E.; DIMITROV, S. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.10, p.91-102, 2011.
52. MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, p.273-307, 2003.
53. McBRIDE, J.; INGRAM, P.R.; HENRIQUEZ, F.L.; ROBERTS, C.W. Development of colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against *Acanthamoeba*. **J. Clin. Microbiol.** v.43, n.2, p.629-634, 2005.
54. MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v.79, p.159-170, 2005.
55. MELLISH, K.J.; COX, R.D.; VERNON, D.I.; GRIFFITHS, J.; BROWN, S.B. *In vitro* photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. **Photochem. Photobiol.**, v.75, p.392-397, 2002.
56. MELO, C.A.; KURACHI, C.; GRECCO, C.; SIBATA, C.H.; CASTRO-E-SILVA, O.; BAGNATO, V.S. Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. **J. Photochem. Photobiol.**, v.73, p.183-188, 2004.
57. MENEZES, P.F.C. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser.** 182 f. Tese de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
58. MIGUEL, J.; BERND, A.; SEMPERE, J.M.; DÍAZ-ALPERI, J.; RAMÍREZ, A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, v.34, p.37-46, 2002.
59. MIRONOV, A.F.; NIZHNIK, A.N.; NOCKEL, A.Y. Hematoporphyrin derivatives: na oligomeric composition study. **J. Photochem. Photobiol.**, v.4, p.297-306, 1990.
60. MITO, T.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, T.; ZHENG, X.; HAYASHI, Y.; SHIRAISHI, A.; OHASHI, Y. Effect of photodynamic therapy with methylene blue on *Acanthamoeba in vitro*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.53; p.6305-6313, 2012.

61. NEWSOME, A.L.; SCOTT, T.M.; BENSON, R.F.; FIELDS, B.S. Isolation of an amoebae naturally harboring a distinctive *Legionella* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p.1688-1693, 1998.
62. O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.5421-5426, 2000.
63. 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 vitro* and *in vivo* models of localized infection. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.6, p.1117-1123, 2007.
64. ORTH, K.; RUCK, A.; BECK, G.; STANESCU, A.; BEGER, H.G. Photodynamic therapy of small adenocarcinomas with methylene blue. **Chirurg.**, v.66, p.1254-1257, 1995.
65. PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J. Microbiol. Methods**, v.72, p.157-165, 2008.
66. PÉRET-ALMEIDA, L.; CHERUBINO, A.P.F.; ALVES, R.J.; DUFOSSE, L.; GLÓRIA, M.B.A. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Research International**, v.38, p.1039-1044, 2005.
67. PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C.C.; NUNAN, E.A.; JUNQUEIRA, R.G.; GLÓRIA, M.B.A. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos e dos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, 2008.
68. PHOENIX, D.A.; SAYED, Z.; HUSSAIN, S.; HARRIS, F.; WAINWRIGHT, M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v.39, p.17-22, 2003.
69. PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, p.98-106, 2004.
70. PRIYADARSINI, K.I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, biomimetics and living cells. **J. Photochem. Photobiol.**, v.10, p.81-95, 2009.

71. PROMEGA. CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB317. Promega Corporation, 2009. Disponível em: <http://www.promega.com.br/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/CellTiter-Blue%20Cell%20Viability%20Assay%20Protocol.pdf>. Acessado em 01/04/2013.
72. RIBEIRO, A.P.D.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N.; BRUNETTI, I.L.; BAGNATO, V.S.; VERGANI, C.E; COSTA, C.A.S. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. **Lasers Med. Sci.**, DOI 10.1007/s10103-012-1064-9, 2012.
73. RONSEIN, G. E. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Quím. Nova**, v.29, no.3, São Paulo, 2006.
74. SCHUSTER, F.L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.15, p.342-354, 2002.
75. SALAH, B.; GHIGO, E.; DRANCOURT, M. Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. **Eur. Society Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.15, p.894-905, 2009.
76. SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Int. J. Parasitol.**, v.34, p.1001-27, 2004.
77. SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H.C.; GABRIELLI, D.S., GUGLIOTTI, M., BAPTISTA, M.S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **J. Photochem.Photobiol.**, v.77, p.459-468, 2003.
78. SHOFF, M.E.; ROGERSON, K.; KESSLER, K.; SCHATZ, S.; SEAL, D.V. Prevalence of Acanthamoeba and other naked amoebae in south Florida domestic water. **J. Water Health**, v.6, p.99-104, 2008.
79. 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.
80. SKRIWAN, C.; FAJARDO, M.; HÄGELE, S.; HORN, M.; WAGNER, M.; MICHEL, R.; KROHNE, G.; SCHLEICHER, M.; HACKER, J.; STEINERT, M. Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.291, p.615-624, 2002.

81. SONG, D.; LINDOSO, J.A.L.; OYAFUSO, L.K.; KANASHIRO, E.H.Y.; CARDOSO, J.L.; UCHOA, A.F.; TARDIVO, J.P.; BAPTISTA, M.S. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. **Photomed. Laser Surg.**, p.1-5, 2011.
82. St. DENIS, T.G.; DAI, T.; IZIKSON, L.; ASTRAKAS, C.; ANDERSON, R.R.; HAMBLIN, M.; TEGOS, G.P. Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v.2, no.6, p.509-520, 2011.
83. STEINERT, M.; BIRKNESS, K.; WHITE, E.; FIELDS, B.; QUINN, F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p.2256-2261, 1998.
84. TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.D.; OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.; JUNQUEIRA, H.C.; TADA, D.B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R.F.; BAPTISTA, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v.2, p.175-191, 2005.
85. TEICHERT, M.C.; JONES, J.W.; USACHEVA, M.N.; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficiente murine model. **Oral Surg. Med. Phatol.**, v.93, p.155-160, 2002.
86. TEITEN, M.H.; EIFES, S.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Curcumin – The paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. **Toxins**, v.2, p.128-162, 2010.
87. THOMAS, V.; HERRERA-RIMANN, K.; BLANC, D.S.; GREUB, G. Biodiversity of amoeba and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p.2428-2438, 2006.
88. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.
89. TRABELSI, H.; SELLAMI, A.; DENDANA, F.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; MAKNI, F. Free-living amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water. **Parasite**, v.17, p.67-70, 2010.

90. TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathol. Biol.**, 2012. doi:10.1016/j.patbio.2012.03.002
91. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
92. USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, v.29, p.165-173, 2001.
93. VISVESVARA, G.S.; MAGUIRE, J.H. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **Trop. Infect. Dis.**, v.2, p.1114-1125, 2006.
94. VISVESVARA, G.S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F.L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol. Microbiol.**, v.50, p.1-26, 2007.
95. VISVESVARA, G.S. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. **Current Opin. Infect. Dis.**, v.23, p.590-594, 2010.
96. WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A.; MARLAND, J.; WAREING, D.R.A.; BOLTON, F.J. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v.19, p.75-82, 1997.
97. WALKER, T. S. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2002.
98. WILSON, B.C.; PATTERSON, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys. Med. Biol.**, v.53, p.61-109, 2008.
99. WINIECKA-KRUSNELL, J.; LINDER, E. Bacterial infections of free-living amoebae, **Res. Microbiol.**, v.152, p.613-619, 2001.
100. ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W.M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **Br. J. Dermatol.**, v.144, p.274-278, 2001.