

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Fernanda Baldissera Piasentin**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE COMPOSTOS  
PORFIRÍNICOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2018**

**Fernanda Baldissera Piasentin**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE COMPOSTOS  
PORFIRÍNICOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na área de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requerimento parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência Farmacêuticas**.

**Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2018**

Piasentin, Fernanda Baldissera  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE COMPOSTOS  
PORFIRÍNICOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS /  
Fernanda Baldissera Piasentin.- 2018.  
68 p.; 30 cm

Orientadora: Sydney Hartz Alves  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Terapia Fotodinâmica 2. Ferrocenoporfirina 3.  
Bactérias 4. Fungos 5. Prothoteca I. Hartz Alves, Sydney  
II. Título.

**Fernanda Baldissera Piasentin**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE COMPOSTOS  
PORFIRÍNICOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na área de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requerimento parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência Farmacêuticas**.

**Aprovado em 22 de Março de 2018:**

---

**Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Débora Alves Nunes Mario, Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)**  
(Parecer)

---

**Roberto Christ Vianna dos Santos, Dr. (UFSM)**

---

**Daniele Carvalho de Oliveira, Dr<sup>a</sup>. (Sobresp)**  
(Suplente)

**Santa Maria, RS, Brasil**  
**2018**

Aos meus pais e meu irmão, Vani Baldissera  
Piasentin, Clênio Piasentin e Paulo Ricardo  
Baldissera Piasentin, por seu amor, incentivo e apoio,  
compartilho esta conquista com vocês

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Vani e Clênio, pelo amor incondicional, pela compreensão, pela dedicação, pela paciência, pela confiança depositada em mim, pelo incentivo e principalmente pelo exemplo de honestidade e humildade, para assim lutar pelos meus objetivos . Amos Vocês!

Ao meu Irmão Paulo Ricardo, por todo sua amizade, cumplicidade e incentivo nesta caminhada. Agradeço pelo exemplo de amor e pela presença continua em minha vida. Te amo!

Ao meus tios e primos, por todo seu amor, apoio e compreensão diante de tantas horas de ausência, e por estarem presentes ao meu lado nas escolhas mais importantes. Obrigada!

Ao meu orientador, prof. Sydney Hartz Alves, que em 2012, me recebeu em seu laboratório como aluna de iniciação científica, pelos ensinamentos, pela paciência e confiança em meu trabalho. Agradeço pela compreensão, amizade e carinho demonstrados, e pelas oportunidades que me foram oferecidas. Muito Obrigada!

Às minhas amigas, Jessica Keller e Vanessa Oliveira, pelo companheirismo, amizade e carinho constante, por sempre ouvirem minhas lamentações, por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis e principalmente por todos as risadas e alegrias que pudemos compartilhar. Obrigada Gurias!

Aos meus colegas do LAPEMI, pela receptividade, pelo coleguismo, pelo apoio, pela amizade, e descontração, que me proporcionaram momentos inesquecíveis e que contribuíram para a conclusão deste trabalho. Em especial, agradeço à Tarcieli Venturini e Francieli Chassot, com que pude aprender a ser um pessoa e profissional melhor, pela profunda admiração pela honestidade, integridade e dedicação que vocês possuem. Muito Obrigada!

À Sandra, nossa técnica do laboratório, por todo seu auxílio, carinho, companheirismo e amizade, e principalmente pela sua paciência e força frente às dificuldades que a vida lhe impôs, quero expressar minha admiração e agradecer pelo convívio diário.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado durante este período me dando força, carinho, apoio e incentivo.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento de minha pesquisa, que torceram e acreditaram em mim e na minha capacidade. Obrigada!

“As estrelas dependem da luz do sol, de onde extraem o seu brilho. É necessário que assim seja para que se preserve a harmonia cósmica e universal arquitetada pelo Criador. Algumas pessoas são como estrelas que só brilham quando próximas de alguns sóis. Mas, por não entenderem o ciclo universal da vida tentam apagar o brilho das outras, achando que, eliminando-o, adquirirão luz própria. Não entendem que sua sobrevivência depende desses sóis.”

Francisco Assis Melo

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE COMPOSTOS PORFIRÍNICOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

AUTORA: Fernanda Baldissera Piasentin

ORIENTADOR: Dr. Sydney Hartz Alves

**Introdução:** O aumento da resistência microbiana aos tratamentos convencionais e surgimento cada vez mais frequente de micro-organismos multirresistentes, tem impulsionado estudos para o desenvolvimento de novas técnicas capazes de conter o avanço desse problema. Por isso nos últimos anos a terapia fotodinâmica tem despontado como uma alternativa eficiente na inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como com fungos e vírus. Esta técnica combina um fotossensibilizador, com luz e oxigênio, levando à formação de espécies citotóxicas (oxigênio atômico e os radicais livres) que agem na membrana celular desses micro-organismos e assim causam a inativação microbiológica. **Objetivos:** Avaliar, *in vitro*, a atividade fotodinâmica antimicrobiana promovida por compostos derivados de ferrocenoporfirinas sobre os micro-organismos patogênicos. **Material e métodos:** Foram utilizadas cepas de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. epidermidis* ATCC 1228, *S. wernicke*, *B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 19559, cinco cepas de *S. aureus* metilicina sensível e seis cepas *S. aureus* metilicina resistente, *C. albicans* ATCC 14057, *A. fumigatus* CBS 133-61 e *Prototheca spp.* que foram expostos aos fotossensibilizadores: TPP, TFcP, ZnTFcP, nas concentrações de 6,0  $\mu\text{M}$ , 3,0  $\mu\text{M}$  e 1,5  $\mu\text{M}$ . Após o ajuste do inoculo, 100 $\mu\text{L}$  da suspensão de células e 100 $\mu\text{L}$  dos fotossensibilizador, foram colocadas em microplacas de 96 poços, incubadas no escuro por 30 min, a 30°C ( $\pm$  2°C), sob agitação e, após, expostas à luz durante 1 minuto e 50 segundos. Alíquota de 10 $\mu\text{L}$  foram removidas e semeadas, a 35°C até o crescimento e após o número de colônias em desenvolvimento foi determinado. **Resultados e discussão:** A atividade fotodinâmica do TPP, TFcP e ZnTFcP nas três concentrações testadas foi capaz de inibir o crescimento bacteriano somente das espécies: *S. aureus* ATCC 25922, *S. wernicke*, *S. epidermidis*, *B. cereus* ATCC 14579, em nas cepas MRSA, enquanto que para as cepas MSSA, a melhor combinação ocorreu quando utilizou-se a luz com TFcP na concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ , e para *B. subtilis* ATCC 19559 a TFD foi eficaz somente TPP nas concentrações de 1,5  $\mu\text{M}$  e 3,0  $\mu\text{M}$ . Para as bactérias Gram-negativas, fungos e *Prototheca spp.*, não houveram resultados que mostram-se satisfatórios. Acredita-se que esses resultados ocorra devido a estrutura da membrana celular das bactérias Gram-negativas, fungos e algas serem mais complexas, dificultando a penetração dos fotossensibilizadores no interior das células, bem como a desestruturação da membrana citoplasmática. Outro fator que contribuiu em não haver uma redução significativa no crescimento dos micro-organismos, é a ausência de carga dos fotossensibilizadores, pois a presença de carga facilita a penetração celular do fotossensibilizador e também o acúmulo dessas moléculas no interior celular. **Conclusão:** A partir deste estudo, verificamos que a inativação fotodinâmica de micro-organismos pode se tornar um tratamento alternativo, no entanto, é necessário realizar estudos complementares.

**Palavras Chaves:** Terapia Fotodinâmica. Ferrocenoporfirina. Bactérias. Fungos. Prothoteca.



## ABSTRAT

### PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF PORPHYRINES COMPOUNDS AGAINST PATHOGENIC MICROORGANISMS

AUTHOR: Fernanda Baldissera Piasentin

ADVISIOR: Dr. Sydney Hartz Alves

**Introduction:** The increase of microbial resistance to conventional treatments and the increasingly frequent appearance of multiresistant microorganisms has encouraged studies to develop new techniques able to overcome the advance of this problem. Therefore in recent years photodynamic therapy has emerged as an efficient alternative in the inactivation of Gram-positive and gram-negative bacteria, as well as with fungi and viruses. This technique combines a photosensitizer, with light and oxygen, leading to the formation of cytotoxic species (atomic oxygen and free radicals) that damage the cell membrane of these microorganisms causing microbiological inactivation. **Objectives:** Evaluate, *in vitro*, the photodynamic activity antimicrobial promoted by compounds derived from ferrocene-porphyrins against pathogenic microorganisms. **Material and methods:** Strains of *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. epidermidis* ATCC 1228, *S. wernicke*, *B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 19559, five strains of MSSA and six strain MSSA, *C. albicans* ATCC 14057, *A. fumigatus* CBS 133-61 and *Prototheca* spp which were exposed to photosensitizers: TPP, TFcP, ZnTFcP, at concentrations of 6.0  $\mu\text{M}$ , 3.0  $\mu\text{M}$  and 1, 5  $\mu\text{M}$ . After adjusting the inoculum, 100 $\mu\text{L}$  of the cell suspension and 100 $\mu\text{L}$  of the photosensitizer were placed in 96-well microplates, incubated in the dark for 30 min at 30°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), under agitation and then exposed to light for 1 minute and 50 seconds. Aliquots of 10 $\mu\text{L}$  were removed and seeded at 35°C until growth and after the number of developing colonies was determined. **Results and discussion:** The photodynamic activity of TPP, TFcP and ZnTFcP in the three concentrations tested was able to inhibit bacteria growth only of *S. aureus* species ATCC 25922, *S. wernicke*, *S. epidermidis*, *B. cereus* ATCC 14579, in the MRSA strains, whereas for the MSSA strains, the best combination occurred when the light was used with TFcP at the concentration of 3.0  $\mu\text{M}$ , and for *B. subtilis* ATCC 19559, PDT was effective only TPP at concentrations of 1.5  $\mu\text{M}$  and 3.0  $\mu\text{M}$ . For gram-negative bacteria, fungi and *Prototheca* spp, there were no results classified as satisfactory. Possibility this is due to the structure of the cell membrane of gram-negative bacteria, fungi and algae being more complex, turning difficult the entrance of photosensitizers into the cells, as well as the disruption of the cytoplasmic membrane. Another factor that contributed to the absence of a significant reduction in the growth of microorganisms is the absence of charge of the photosensitizers, because the presence of charge facilitates the cellular penetration as well as its accumulation inside the cell. **Conclusion:** The photodynamic inactivation of microorganisms may become an alternative treatment, however, the investigations focused on photosensitizers deserve attention in order to obtain better results.

**Keywords:** Photodynamic Therapy. Ferrocene Porphyrin. Bacteria. Fungi. Prototheca.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	Ácido aminolevulínico
AM	Azul de metileno
AT	Azul de toluidina
ATP	Adenosina trifosfato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTX-M	Cefotaximases Munich
DHE	Dihematoporfirina éter
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESBL	β-lactamases de largo espectro
FS	Fotossensibilizador
He-Ne	Hélio-Neônio
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivado de hematoporfirina
HSV	Vírus herpes simples 1
InGaAlP	índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
IMP	Imipenemases
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina sensível
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MTHPC	Meso-tetra-hidroxi-fenol-clorina
mTHPP	Meso-tetrahidroxifenil
Nd-YAG	Neodímio-ítrio-alumínio-granada
S <sub>0</sub>	Estado fundamental
S <sub>1</sub>	Estado excitado singlete
S <sub>3</sub>	Estado excitado triplete
SHV	Sulfhydryl variable

SNC	Sistema nervo central
TEM	Serina temoniera
TFD	Terapia fotodinâmica
TFDA	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TFcP	5,10,15,20-Tetra-ferrocenil-porpirina
TMPyP	Tetra (N-metil-4-piridil) porfina
TPP	Tetra-fenil-porfirina
TPPH <sub>2</sub>	5,10,15,20-tetraquis (fenil) porfirina
VIM	Verona integron-encoded metallo- $\beta$ lactamases
ZnTFcP	Zinco-5,10,15,20-meso-Tetra-ferrocenil-porfirina

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1:** Diagrama de Jablonski mostrando o mecanismo fotoquímicos da TFD. O FS no estado fundamental ( $^1PS$ ) absorve um fóton para formar o estado excitado singlete ( $^1PS^*$ ), que sofre passagem cruzada (IC) para formar o estado triplete ( $^3PS^*$ ). Esta espécie de longa vida pode sofrer transferência de energia (Tipo II) para formação de oxigênio singleto ou elétrons (tipo II), para a formação íons radicalares, como peróxido de hidrogênio. As EROs são capazes de matar um amplo espectro de agentes patogênicos. .... 18
- Figura 2.2:** Estrutura das porfirinas. (A) Tetra-fenil-porfirina (TPP); (B) 5,10,15,20-Tetra-ferrocenil-porpirina (TFcP); (C) 5,10,15,20-Tetra-ferrocenil-porpirina (TFcP) ..... 21
- Figura 2.3:** Estrutura química da hematoporfirina ..... 23
- Figura 2.4:** Estrutura química do princípio ativo do Photofrin II ..... 26
- Figure 1:** Evaluation of photodynamic therapy of (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (B) *Escherichia coli* ATCC 25922, (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. .... 40
- Figure 2:** Evaluation of photodynamic therapy of (A) *Candida albicans* ATCC 15057, (B) *Prototheca* spp. and (C) *Aspergillus fumigatus* CBS13361. .... 41
- Figure 3:** Mean (+ standard error of the mean) of *S. aureus* MSSA treated with TPP, TFcP and ZnTFcP at concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu$ M together with  $\lambda$ : 660 nm laser light during 1 minute and 50 seconds. .... 42
- Figure 4:** Mean (+ standard error of the mean) of *S. aureus* MRSA treated with TPP, TFcP and ZnTFcP at concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu$ M ;  $\lambda$ : 660 nm laser light during 1 minute and 50 seconds. .... 43
- Figure 5:** Mean (+ standard error of the media) of (A) *B. subtilis* ATCC 19559 and (B) *B. cereus* ATCC 14579 treated with TPP, TFcP and ZnTFcP at the concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu$ M and laser light with  $\lambda$ : 660 nm for 1 minute and 50 seconds. .... 44
- Figure 6:** Mean (+ standard error of the media) of (A) *S. warneri* ATCC 19559 and (B) *S. epidermidis* ATCC 14579 treated with TPP, TFcP and ZnTFcP at concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu$ M along with the laser light with  $\lambda$ : 660 nm for 1 minute and 50 seconds. .... 45

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA .....	16
2.1.1 Mecanismo de ação .....	17
2.1.2 Laser .....	19
2.2 FERROCENO .....	20
2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA COM PORFIRINAS .....	23
2.4 TERAPIA FOTODINÂMICA E MICRO-ORGANISMOS .....	27
2.5 RESISTENCIA MICROBIANA .....	32
<b>3. PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
3.1 PROPOSIÇÕES .....	36
3.2 OBJETIVO GERAL .....	36
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>4.MANUSCRITO – Evaluation of photodynamic activity ferrocene - porphyrin compounds on pathogenic microorganisms .....</b>	<b>37</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da resistência antimicrobiana aos tratamentos convencionais e o surgimento cada vez mais frequente de micro-organismos multirresistentes, têm estimulado o desenvolvimento de novos fármacos,- relatos de resistência a uma nova fármaco antimicrobiana ocorrem cerca de dois anos após o início do uso disseminado-, bem como o de novas técnicas terapêuticas para conter o avanço desse problema (ARIAS E MURRAY, 2009, MAISCH et al, 2004).

Entre as novas técnicas utilizadas para conter processos infecciosos dispõe-se da terapia fotodinâmica (TFD) a qual tem despontado como uma alternativa eficiente na inativação de bactérias gram-positivas e Gram-negativas, bem como frente a fungos e vírus. Esta técnica combina um fotossensibilizador (FS), tipicamente uma fenotiazina ou um derivado de ftalocianina, com um feixe de laser e oxigênio, levando à formação de espécies citotóxicas (oxigênio atômico e os radicais livres) as quais são capazes de destruir micro-organismos (ALVES, 2009).

Diversos agentes FS tem sido utilizados na TFD, como as fenotiazinas, ftalocianininas, clorinas, protoporfirina IX e porfirinas. Entretanto para ser considerado um bom FS, ele deve possuir a capacidade de absorver energia da luz e transferi-la à outra molécula, ser solúvel em água, possuir mínima toxicidade, baixo poder mutagênico e ser quimicamente estável. O FS mais empregado em estudos tem sido o azul de metileno (AM), pois já foi comprovada clinicamente sua capacidade de causar danos à estrutura da membrana de fungos e bactérias (BALTAZAR, 2015). Da mesma forma, a porfirina [Tri -Py + -Me- PF] que é capaz de destruir de forma eficiente bactérias Gram negativas, após o tratamento fotodinâmico, sem a recuperação da viabilidade bacteriana (TAVARES, 2010).

O desenvolvimento e maior eficiência dos tratamentos fotodinâmicos requerem investigações de novos agentes FS. As porfirinas são consideradas uma alternativa promissora para o tratamento de diversas patologias, pois seu desempenho fotodinâmico tem sido avaliado sob várias formas incluindo seus efeitos exógenos e endógenos assim como os danos citotóxicos estudados em diferentes meios biológicos (BERTOLONI, et al., 1993; BLISS, et al., 2004; ITO, 1981).

Devido a grande funcionalidade e versatilidade dos compostos porfirínicos, o presente estudo foi objetivado a investigar o potencial de compostos porfirínicos inéditos na atividade fotodinâmica contra bactérias e fungos patogênicos ao homem e animais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

A TFD consiste na combinação de três fatores: o FS, que é capaz de se acumular seletivamente nos tecidos lesados ou de ser metabolizado pelas células-alvo; da exposição à luz visível com comprimento de onda adequado e da presença de oxigênio (MENEZES, 2012). A ativação de um agente FS resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como ânions superóxidos e o oxigênio singlete, que em uma sequência de reações fotoquímicas e fotobiológicas provocam a inativação da célula-alvo (BLISS et al, 2004; KOICHEVAR et al., 1996; OLIVEIRA, MACHADO, PESSINE, 2005). Nos últimos anos a aplicação dessa técnica tem sido muito empregada para o tratamento de neoplasias, principalmente as cutâneas (BAHNER, BORDEAUX, 2013; MROZ et al., 2013), e para a inativação de micro-organismos (EAGLESOME et al., 1994; JORI, et al., 2011; PIRES et al. 2013).

O Primeiro relato científico da utilização dessa técnica, ocorreu em 1900, quando Raab e von Tappeiner, em Munique, observaram o efeito tóxico e letais causado pelo laranja de acridina em *Paramecium* sp., quando exposto a luz. Dessa forma, a ação fotodinâmica foi considerada, quando os mesmos autores observaram que a luz e o corante sozinhos não apresentavam qualquer efeito tóxico sobre a cultura de protozoário (ACKROYD, et al., 2001). Entretanto sua utilização é descrita desde o antigo Egito, quando compostos reativos eram combinados com a luz solar para o tratamento de doenças de pele, como comprovação documentos com aproximadamente seis mil anos (SELLERA, 2014; SPIKES, 1985; EPSTEIN, 1990). Ainda há relatos da utilização da aplicação da luz no tratamento de doenças de pele como psoríase, vitiligo e câncer, no Egito, Índia e China, descritos no papiro de Ebers e no livro sagrado indiano de Atharva Veda (SELLERA, 2014; WEIS et al., 2012). Na Grécia Antiga, há vários relatos da exposição corporal ao sol no tratamento de doença, esse tratamento era defendido pelo médico grego Heródoto, que ressaltava a importância da exposição solar para a restauração da saúde, além disso deitar-se nu ao sol, era considerado passatempo popular (ACKROYD, et al., 2001, SELLERA, 2014). Na França, durante os séculos XVIII e XIX a luz solar foi usada no tratamento da tuberculose, o raquitismo, escorbuto, reumatismo, paralisia, edema e fraqueza muscular (ACKROYD, et al., 2001).

Mais tarde em 1901, Niels demonstrou o sucesso terapêutico da aplicação de filtros de luz na pele de paciente com *Lupus vulgaris* (ACKROYD, et al., 2001, ALLISON et al., 2004;



PENG, MOAN, NESLAND, 1996). No ano de 1903, o pesquisador von Tappeineir, postulou que para que ocorresse a resposta no tratamento mediado pela luz, era necessário a presença de oxigênio (ACKROYD, et al., 2001, ALLISON et al., 2004; BABILAS et al., 2005; PENG, MOAN, NESLAND, 1996). No mesmo ano, ocorreu a primeira aplicação clínica da TFD, utilizando eosina e luz para realizar o tratamento de *Lupus vulgaris*, da sífilis, psoríases e câncer de pele superficial (ACKROYD, et al., 2001; DOUGHERTY et al., 1978; KESSEL., 2004).

Cinco anos depois, em 1908, surgiram os primeiros estudos envolvendo o uso de porfirinas como FS, gerando assim um grande avanço na aplicação da TFD. Mais tarde em 1924, Policard verificou a emissão de fluorescência de tumores expostos a porfirina quando irradiados com o auxílio da lâmpada de Wood, a partir dessa descoberta, inúmeros estudos foram realizados por diferentes pesquisadores, que somente na década de 40 concluíram que as porfirinas se concentram preferencialmente em neoplasias (ACKROYD, et al., 2001).

Na década de 1960, Theodore Maiman, produziu o primeiro dispositivo de Laser, abreviatura de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, embasado nos estudos de Einstein, que em 1917, formulou a teoria da emissão estimulada (FELDMAN, 2009; PINHEIRO, 1998). Dessa forma, foi possível uma maior aplicabilidade devido à monocromaticidade, unidirecionalidade e facilidade de cálculo da dosimetria, uma vez que quando empregada a luz branca, de lâmpadas convencionais, não era possível controlar a temperatura e a dosagem de luz utilizada (BRUGNERA JÚNIOR et al, 2007; TOREZAN, et al. 2009).

A partir da década de 1970, a TFD ganhou novamente destaque, pois Dougherty, realizou pesquisas clínicas utilizando derivados da hematoporfirina como FS no tratamento e na detecção de tumores (KESSEL, 2004; SELLERA, 2013). Entretanto, entre as décadas de 1940 e 1950, ocorreram os primeiros relatos de resistência aos antimicrobianos convencionalmente empregados, assim iniciou-se uma série de estudos utilizando a TFD na aplicação do controle desses micro-organismos.

### **2.1.1 Mecanismo de ação**

A maior ou menor excitação do FS depende do comprimento de onda escolhido, assim, quando utilizado o comprimento de onda de melhor absorção a molécula do FS consegue absorver um fóton, e passar do estado fundamental ( $S_0$ ) para o primeiro estado excitado singlete ( $S_1$ ). Entretanto, esse estado de excitação tem um tempo de vida muito curto, dessa forma o FS

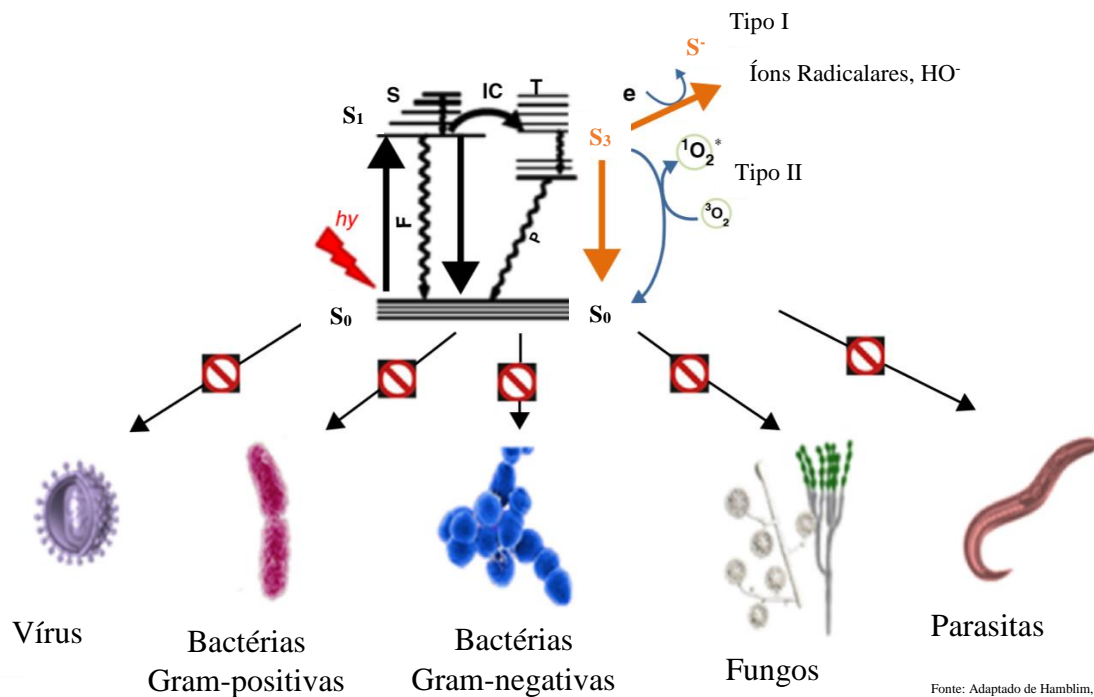
pode retornar ao seu estado fundamental através de processos radiativos, como a fluorescência ou fosforescência, ou não radiativos, como a interconversão e o cruzamento intersistemas. Através do cruzamento intersistemas, a molécula do FS no estado  $S_1$  passa para o primeiro estado excitado tripleto ( $S_3$ ), sendo esse estado a origem do efeito fotossensibilizante, pois nesse estado de excitação pode participar de reações fotodinâmicas com produção de um ou mais tipos de EROs (DONNELLY, McCARRON, TUNNEY, 2008; HAMBLIN et al., 2002; MENEZES, 2012; RODRIGUES, 2012).

A produção de EROs pode ocorrer por duas vias, conhecidas por fotoprocessos do tipo I e tipo II, que requerem a presença do oxigênio. No mecanismo do tipo I ocorre reações de transferências de elétrons do estado tripleto do FS com um substrato orgânico, resultando na produção de radicais iônicos que reagem com oxigênio produzindo EROs, como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxila, os quais são considerados citotóxicos, uma vez que apresentam elevado potencial de oxidar diversas moléculas biológicas (DONNELLY, McCARRON, TUNNEY, 2008; HAMBLIN et al., 2002; ZHU, FINLAY, 2008; ZHU et al. 2008).

Sabe-se que os FS atuais seguem o mecanismo de reação do tipo II, onde ocorre a formação de oxigênio singlete, através da transferência de energia do estado tripleto do FS para oxigênio molecular. O oxigênio singlete é capaz de reagir com lipídios insaturados, aminoácidos e ácidos nucleicos (DONNELLY, McCARRON, TUNNEY, 2008; HAMBLIN et al., 2002; ZHU, FINLAY, 2008; ZHU et al. 2008). Assim, as membranas celulares, incluindo a citoplasmática, mitocondrial, lipossomal e a nuclear tem sua permeabilidade alterada, provocando a morte da célula-alvo, através da necrose ou apoptose (DONNELLY, McCARRON, TUNNEY, 2008; HAMBLIN et al., 2002, KONAN et al., 2002, ZHU, FINLAY, 2008).

Vale ressaltar que como o oxigênio singlete possui um tempo de vida muito curto, assim as células que não estão intimamente ligadas ao FS não apresentam ação fototóxica. Logo, apenas as moléculas e estruturas próximas a área onde há acúmulo de FS serão diretamente afetadas pela TFD (NYMAN, HYNNIEN, 2004). Outro fato relevante, é que as células não apresentam mecanismos de defesa contra as moléculas de oxigênio singlete, pois esse é um agente oxidante não-específico. Por conseguinte, pode se supor, teoricamente, que não há risco ao desenvolvimento de resistência dos micro-organismos a essa terapia (MARIO, 2015; PIRES, 2012).

**Figura 2.1:** Diagrama de Jablonski mostrando o mecanismo fotoquímicos da TFD. O FS no estado fundamental ( $^1PS$ ) absorve um fóton para formar o estado excitado singlete ( $^1PS^*$ ), que sofre passagem cruzada (IC) para formar o estado triplete ( $^3PS^*$ ). Esta espécie de longa vida pode sofrer transferência de energia (Tipo II) para formação de oxigênio singleto ou elétrons (tipo II), para a formação íons radicalares, como peróxido de hidrogênio. As EROs são capazes de matar um amplo espectro de agentes patogênicos.



### 2.1.2 Laser

Einstein, em 1917, postulou a teoria da emissão estimulada, na qual afirmava que um átomo pode ser excitado a partir do bombardeamento de um meio ativo, que leva para um estado de excitação superior, assim quando o átomo retorna ao seu estado fundamental, o excesso de energia liberada na forma de pares de fótons coerentes que viaja para a mesma direção (MARINHO; 2006; PINHEIRO, 1998). Entretanto somente em 1960, Maiman, tornou essa teoria em realidade, quando esse construiu o primeiro laser, utilizando uma barra de rubi sintético (MARINHO; 2006; MIDDIA e RENTON-HARPER, 1991). Na mesma década, também houve o desenvolvimento dos lasers de Hélio-Neônio (He-Ne), neodímio-ítrio-alumínio-granada (Nd-YAG) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (MARINHO; 2006; MIDDIA e RENTON-HARPER, 1991).

Sinclair e Knoll, em 1965, produziram o primeiro laser terapêutico, entretanto sem efeito de corte, com ação biomoduladora, mas sua primeira utilização na clínica, ocorreu em 1968, por Mestre, que acreditava que a utilizam do laser de rubi ou argônio, em baixa intensidade, acelerava a cura de úlceras crônicas (MARINHO, 2006; REDDY, et al. 2004).

Hoje há dos tipos de laser, o laser cirúrgico também conhecido como laser de alta potência, esse tipo de laser causa fotodestruição celular, pela elevação da temperatura do tecido alvo, desnaturando o conteúdo protéico da célula, o que provoca as propriedades de corte, coagulação, vaporização do conteúdo hídrico da célula e carbonização do tecido (BURGNERA JÚNIOR et al., 2003; GENOVESE, 2000; MARINHO, 2006).

Outro tipo é o laser terapêutico, que possui baixa potência e é denominado laser clínico ou não-cirúrgico, os mais comumente empregados são os laser de He-Ne e o diodo (MARINHO, 2006; PINHEIRO, 1998). Esse laser é empregado na bioestimulação tecidual, promovendo assim hemostasia e estimulação da cicatrização (MARINHO, 2006; PINHEIRO e FRAME, 1992). A ação analgésica ocorre pela atuação dos receptores periféricos, que impedem a transmissão do estímulo doloroso até o sistema nervo central (SNC), já a ação anti-inflamatória, deve-se a aceleração da microcirculação, assim ocorre a alteração na pressão hidrostática capilar (GENOVESE, 2000; MARIHO, 2006). Os efeitos biológicos incluem ação vasodilatação, resolução do edema, imune-estimulação e aceleração do metabolismo (BURGNERA JÚNIOR et al. 2003; MARINHO, 2006; WILDER-SMITH, 1988).

## 2.2 FERROCENOPORFIRINA

As porfirinas pertencem a uma classe distinta de compostos macrocíclicos, as quais são vastamente encontrada na natureza. Manifestam, ainda, importantes funções no metabolismo dos seres vivo e interagem com sítios ativos em diversos processos biológicos, como na ligação e transporte de oxigênio, na fotossíntese e na transferência de elétrons (BONNETT, et al, 1990; BONNETT, 1995; GORMAN, BROWN, GRIFFITHS, 2006).

Normalmente, as porfirinas apresentam quatro bandas da região visível e uma banda na região UV próximo, a banda de Soret. Entretanto quando ocorre a complexação com um íon de metal, ocorre a formação de um novo espectro, com apenas duas bandas na região do visível; a banda Soret geralmente permanece inalterado. Vale ainda ressaltar, que as porfirinas complexadas com metais paramagnéticos, como Fe não são FS, todavia aqueles complexadas

com metais diamagnéticos, por exemplo, Mg ou Zn podem ser excelentes FS (GORMAN, BROWN, GRIFFITHS, 2006).

Quando obtidas através vias sintética, as porfirinas são normalmente insolúveis, e obtidas em pequenas quantidades, por isso a comercialização é limitada (GORMAN, BROWN, GRIFFITHS, 2006). Para a obtenção desses compostos há duas opções sintéticas disponíveis: o primeiro envolve a modificação de porfirinas existentes prontamente disponíveis, como ocorre com inúmeras porfirinas naturais substituídos com grupos funcionais, as quais têm sido relatados e investigados quanto à sua atividade biológica (BONNETT, 1995; GORMAN, BROWN, GRIFFITHS, 2006). A segunda envolve a síntese da porfirina desejado no laboratório a partir de intermediários simples, como condensação catalisada por ácido de pirrol com um aldeído (GORMAN, BROWN, GRIFFITHS, 2006; ROTHEMUND, 1936, ROTHEMUND, 2010).

Ferroceno e porfirinas são comumente associado com várias estratégias e com objetivos diversos (GUST, et al.1993; WASIELEWSKI, 1992). Através dessas ligações, as moléculas torna-se capazes de capturar e/ou liberar de formar reversível vários elétrons, os quais são usados na catálise redox multi-eletrons, Esta característica pode ser utilizada para o armazenamento de informações multiibit a nível molecular, além disso apresentam múltiplos centros ativos redox, que permitem o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos e também de sensores eletromagnéticos moleculares (BARD, 1995; BEER, et al., 1999; CHEN, et al. 2003; Health, et al 1998; LIU, et al 2003; MATSUSHIGE, et al. 1998). As ligações entre ferroceno e porfirina produzem propriedades estruturais e eletrônicas bem elucidadas, bem como a extensa reatividade química, o que o torna o metalloceno mais associado a porfirina (BEER, et al., 1999; LOIM, et al. 1994; LOIM, et al, 1996; WANG, et al. 2001; WANG, et al. 2007).

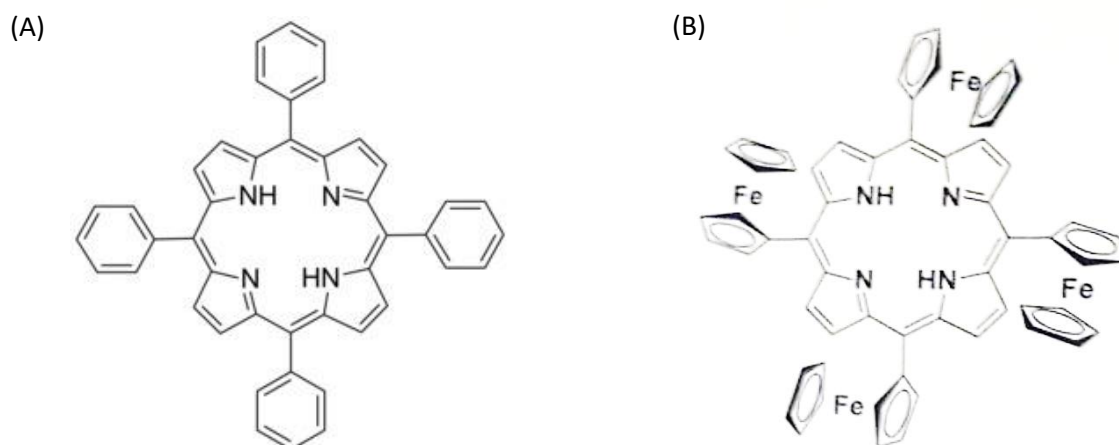
O primeiro relato de uma ligação de porfirina com uma subunidade de ferroceno foi relatada por Wollmann e Hendrickson, após a reação de ferroceno-carboxaldeído com pirrol em ácido propiônico sob refluxo, obtendo-se 5,10,15,20-tetraquis (ferrocenil) (BUCHER, et al, 2009; WOLLMANN, 1977). Entretanto as características fotoquímica e fotofísicas desta nova molécula, como a fluorescência da porfirina e o rendimento quântico de fluorescência de  $1H_2$  é altamente alterado pelos grupos de ferroceno, que é cerca de  $10^5$  vezes menor quando comparado com 5,10,15,20-tetraquis (fenil) porfirina (TPPH<sub>2</sub>) (ADLER, et al, 1967; NARAYANAN, et al. 2000; NEMYKIN, et al. 2005).

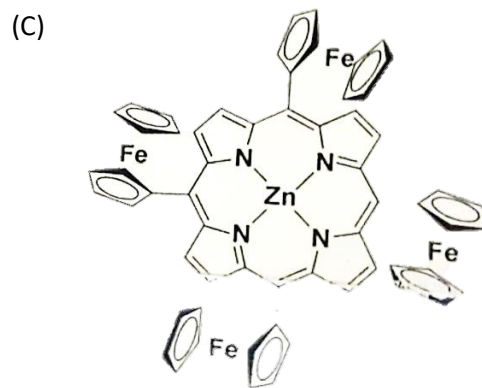
Os grupos de ferroceno também foram ligados com sucesso às posições meso de porfirinas alquiladas. O primeiro exemplo de conjugado de ferroceno-porfirina alquilado

sintetizado com sucesso foi descrito por Boyd e colaboradores, a 5,15-di (ferrocenil) -2,8,12,18-tetrabutil-3,7,13,17-tetrametilporfirina  $18H_2$ . Essa molécula foi obtida com uma condensação clássica entre ferroceno-carboxaldeído e um tetra-alkil dipirrometano, que foi isolada e caracterizada no estado sólido como um único isômero (BOYD, et al, 1999; BUCHER, et al, 2009; MORISUE, et al., 2007).

Kalita e colaboradores, demonstraram que uma ligação direta induz as mudanças mais importantes nos perfis eletroquímicas e espectroscópicas de ambas as partes, tornando a oxidação e redução do anel de porfirina mais acentuadas o que gera um deslocamento significativo de todas as bandas de absorção e uma extinção total de fluorescência (BUCHER, et al, 2009; MORISUE, et al., 2005). Ao longo do tempo, o desenvolvimento de ferroceno-porfirina buscou novas estratégias, como a coordenação axial de metaloporfirinas, afim de reproduzir as reações fotossintéticas naturais que ocorrem ao longo de montagens supramoleculares em ambientes proteicos. Essa ligação adequa-se ao metal ligado, que pode ser Zinco (II), ferro (III) (BOYD, et al, 2006; D'SOUZA, et al. 2006; OKAMURA, et al. 2007).

**Figura 2.2:** Estrutura das porfirinas. (A) Tetra-fenil-porfirina (TPP); (B) 5,10,15,4120-Tetra-ferrocenil-porfirina (TFcP); (C) 5,10,15,20-Tetra-ferrocenil-porfirina (TFcP)





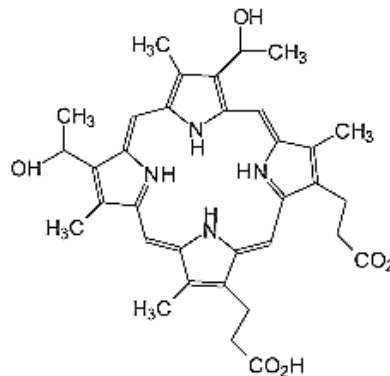
### 2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA COM PORFIRINAS

Para que a TFD ocorra com o melhor desempenho, deve-se empregar um FS, que apresente características fotoquímicas e fotofísicas específicas, como a seletividade pelas células-alvos, possuir boa absorção na região de 600 a 1000 nm, alto rendimento quântico e boa resposta biológica (PIRES, 2012). Os FS devem ser compostos atóxicos ou com baixa toxicidade, que em seu estado fundamental sejam inativos e capazes de absorver luz na região do visível (DOUGHERTY, 1993; JORI, 2006). Outra característica que deve ser levada em consideração são as propriedades físico-químicas dos FS, como carga, lipossolubilidade e hidrossolubilidade que podem interferir na eficácia da fotossensibilização (FUCHS et al, 2007).

Apesar do conceito de morte celular provocada pela interação da luz e substâncias químicas, que são conhecidas há mais de um século, o interesse por FS aumentou nos últimos anos. Por isso, há incremento no desenvolvimento de FS específicos para a utilização no tratamento de tumores malignos, assim como para o controle ou inibição de micro-organismos em diversos sistemas biológicos (BLISS et al., 2004; GORMAN, BROWN, GRIFFITHS, 2006; STRAKHOVSKAYA et al., 2002; TEGOS et al., 2005; VENEZIO et al., 1985; WAINWRIGHT et al., 2010; ZEINA et al., 2001).

As porfirinas foram descritas no século XIX, entretanto só apresentam importância clínica na medicina no século XX. Em 1841, a Hematoporfirina (Hp) foi descrita pela primeira vez por Scherer, enquanto realizava estudos que investigam a natureza do sangue. Porém, as propriedades fluorescentes de Hp foram descritos somente em 1867 (ACKROYD, et al., 2001; SCHERER, 1841).

**Figura 2.3:** Estrutura química da hematoporfirina



Em 1911, Hausmann realizou os primeiros estudos relacionados aos efeitos biológicos da Hp, quando relatou o efeito da combinação de Hp e luz sobre paramecium, mas reações de pele e nos eritrócitos também foram descritos (ACKROYD, et al., 2001). Já o relato da primeira utilização do fotossensibilização humana por porfirinas foi reportado em 1913, pelo alemão Friedrich Meyer-Betz, que após a administração de 200 mg da porfirina, notou dor prolongada e edema em áreas expostas à luz (ACKROYD, et al., 2001).

Como citado anteriormente em 1924, Policard relatou pela primeira vez a utilização de porfirina para localizar um tumor maligno, nesse estudo, foi injetado a porfirina em um sarcoma experimental de rato, o qual foi iluminado com luz ultravioleta de uma lâmpada de Wood, gerando assim a fluorescência dessa porfirina (ACKROYD, et al., 2001). No ano de 1948, Figge e Weiland administraram Hp, coproporphyrin, protoporfirina e hematoporfirina zincanda, em ratos com tumores experimentalmente induzidas e transplantadas e em ratos que não apresentavam tumores, nesse estudo a fluorescência não foi observada em tecidos normais, exceto dos gânglios linfáticos, omento, tecidos fetais e placentários e cicatrização de feridas. Esta afinidade para o tecido linfático infectado, levou-os a concluir que as porfirinas acopladas a compostos radioativos pode ter uma utilização potencial no tratamento de leucemias linfáticas (ACKROYD, et al., 2001; FIGGE, WEILAND, 1948).

Em 1955, Schwartz et al. em seu estudo demonstraram que a Hp usadas anteriores era uma mistura de porfirinas, com propriedades diferentes, e que após sua purificação parcial manifestava mal absorção pelos tumores; em contrapartida, seu resíduo matinha grande afinidade pelos tecidos tumorais. Schwartz, dando continuidade a seu primeiro estudo produzir uma substância que se tornou conhecida como derivado de hematoporfirina (HpD), o qual demonstrou atividade fototóxica duas vezes mais que a Hp bruta (ACKROYD, et al., 2001). Na



década de 1960, Lipson demonstraram, através de estudos animais, que a utilização da HpD era mais eficaz na localização dos tumores e diferenciação de tecidos normais do que a Hp bruta, mesmo quando doses menores eram utilizadas (ACKROYD, et al., 2001; LIPSON, BALDES, OLSEN, 1961).

Na década de 1970, alguns estudos propuseram que a Hp poderia ser utilizada como um agente FS seletiva para destruir células tumorais expostas ao laser. Essa informação foi confirmada com um estudo que avaliou o efeito da luz com Hp em glioma experimental de rato tanto *in vitro* como *in vivo*. Os resultados demonstraram 100% de morte celular *in vitro* acompanhados de acentuada redução no volume tumor *in vivo*, após a exposição da Hp à luz (ACKROYD, et al., 2001). Os mesmos autores também verificaram que o crescimento tumoral foi suprimido por aproximadamente 10-20 dias, mas que, a partir de áreas viáveis e mais profundas da lesão constatou-se crescimento tumoral recrudescente (ACKROYD, et al., 2001). No ano de 1975, Dougherty et al. relataram a primeira remissão completa de um tumor após a administração de HpD seguida de exposição a luz vermelha; demonstraram ainda que, baixas concentração de HpD, ou somente a exposição a luz vermelha, era insuficiente para determinar a regressão tumoral (ACKROYD, et al., 2001).

No mesmo ano, Kelly, Snell e Berenbaurri, demonstraram que as células de tumor da bexiga de humanos transplantadas para ratos poderiam ser destruídas usando TFD; por outro lado, constataram que a destruição dos nódulos era variável, assim como edema da pele normal circundante. Porém, quando o experimento foi conduzido com epitélio normal ou células de músculo liso implantadas, danos insignificantes ou ausentes foram observados após a exposição da TFD (ACKROYD, et al., 2001). No ano seguinte Kelly e Snell realizaram o primeiro estudo humano dos efeitos da TFD usando HpD em pacientes com câncer de bexiga. Em um paciente, cujo histórico acusava recorrência tumoral, após sucessivas ressecções transuretral anteriores, radioterapia e quimioterapia intravesical, introduziu-se na uretra uma vareta de quartzo ligada a uma lâmpada de vapor de mercúrio foi utilizada na tentativa de ativar HpD e induzir a destruição do tumor. Como resultado foi observado o surgimento de necrose no tumor sem nenhum efeito nas áreas não expostas após o tratamento (ACKROYD, et al., 2001).

Em 1978, Dougherty relatou a primeira grande série de pacientes submetidos a TFD, cujos tratamentos obtiveram sucesso. Vinte e cinco pacientes com tumores da pele refratários ao tratamento convencional, foram tratados com HpD seguido de exposição à luz vermelha a partir de uma lâmpada de arco de xenônio. Este estudo demonstrou que a TFD pode ser utilizado com sucesso no tratamento de vários tumores malignos, mesmo quando as terapias

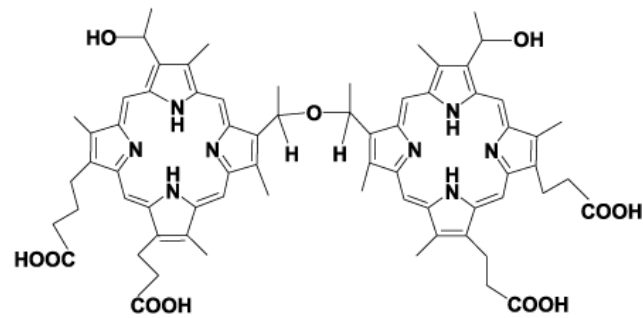
convencionais não evidenciam êxito (ACKROYD, ET AL., 2001). A partir desses estudos, diversos outros estudos foram publicados confirmando a eficácia clínica de TFD no tratamento de uma variedade de tumores.

Estudos realizados por Dougherty, em 1983, confirmaram a informação de Schwartz et al., de que a Hp bruta contém diferentes porfirinas e, quando convertida para HpD por acetilação outras porfirinas são produzidas, tais como a protoporfirina e hidroxietilvinil-deuteroporfirina (DOUGHERTY, 1993). No ano seguinte, foi proposto que o componente ativo de HpD era composto por duas unidades de porfirina ligadas por uma ligação éter e cuja fórmula química era de bis-1- [3 (1-hidroxietil) deuteroporfirina-8-il] acetato de éter, a esse composto foi dado o nome abreviado de dihematoporfirina éter (DHE), sendo que hoje esse composto está comercialmente disponível como Photofrin<sup>®</sup> (Axcan Pharma), que também apresenta uma mistura heterogênea de porfirinas (ACKROYD, et al., 2001).

Berenbaum e colaboradores, utilizaram em 1986 a meso-tetrahidroxifenil (mTHPP) para a localização de tumores, demonstrando uma melhor absorção de luz na extremidade vermelha do espectro, sendo que essa porfirina foi desenvolvida para ser cerca de 25-30 vezes mais potente do que o HpD na fotoinativação de tumores, quando ativado por luz vermelha. Em um estudo comparando os efeitos de TFD no músculo esquelético, usando diferentes tipos de mTHPP, em conjunto com HpD e Photofrin II, o meta-isômero foi demonstrado ser o mais seletivo sensibilizador-tumoral. No entanto, o problema principal com estes FSs é o grau inaceitável de fotossensibilização da pele e os danos às camadas musculares subjacentes quando utilizado no tratamento de lesões epiteliais (ACKROYD, ET AL., 2001; BERENBAUM, ET AL., 1986; CHEVRETTON, BERENBAUM, BONNETT, 1992).

Ao longo dos últimos 10 anos, a utilização de TFD para o tratamento de lesões benignas e malignas aumentou significativamente. A primeira aprovação de agências de saúde para TFD foi concedida para o Photofrin<sup>®</sup> no Canadá em 1993 para uso em câncer de bexiga. Atualmente Photofrin<sup>®</sup> já está licenciado em vários países para o tratamento de cânceres do pulmão, bexiga, colo do útero e do esôfago.

**Figura 2.4:** Estutura química do princípio ativo do Photofrin II



#### 2.4 ATIVIDADE FOTODINÂMICA FRENTE A MICRO-ORGANISMOS

Desde o início do século passado, o uso combinado de luz e corantes tem sido considerado uma alternativa para eliminar micro-organismos; entretanto, o uso dessa técnica estacionou após a descoberta dos antibióticos na década de 1950. Por outro lado, o recente aumento da resistência aos antimicrobianos tem fortalecido os esforços para desenvolver novas estratégias antimicrobianas (GONZALES & MAISCH, 2012; MAISCH et al. 2009).

Numerosos estudos têm mostrado que a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) pode ser um meio eficaz para eliminar micro-organismos. Destacam-se àqueles causadores de infecções localizadas na pele e na cavidade oral pela facilidade de exposição a luz; entre outras vantagens dessa técnica, exalta-se o fato de não verificar o desenvolvimento de resistência às EROs geradas. Esta característica deve-se ao fato dessas moléculas atingirem diversos alvos no micro-organismo provocando reações de oxidação, seja nos lipídeos, lipossomos, mitocôndrias, proteínas de membranas, e assim, promovendo a morte celular (GONZALES & MAISCH, 2012; MAISCH et al. 2009).

Diversos FSs tem sido utilizados na TFDA, como as porfirinas, protoporfirina IX, ftalocianinas, clorinas e compostos fenotiazínicos. Entretanto até o presente, os únicos FSs clinicamente empregados para o tratamento antimicrobiano são os sais de compostos fenotiazínicos. A combinação de azul de metileno (AM) ou azul de toluidina (AT), em conjunto com a luz vermelha é usada para a desinfecção de produtos derivados do sangue, esterilização da cárie dentária, canais radiculares e tratamentos periodontais (KISHEN et al 2010; GONZALES & MAISCH, 2012; WAINWRIGHT, 2003).

Zeina et al, observaram que, frente a TFD, as células procarióticas apresentam maior suscetibilidade do que as células eucarióticas. Tal constatação deve-se ao fato de que nas células procarióticas, a inativação ocorre de uma forma única, ou seja, o dano em apenas um alvo já é suficiente para causar a morte do micro-organismo. Por outro lado, acredita-se que nas células eucarióticas a membrana nuclear funcione como uma barreira para os produtos da reação fotodinâmica, explicando-se sua menor suscetibilidade (ZEINA, et al., 2001). Mesmo assim, quando a inibição ou morte é observada os mecanismos envolvem a perfuração de paredes e membranas celulares pelos radicais livres, permitindo que o FS seja translocado para o interior celular. A seguir, as EROs geradas pela luz de excitação provocam danos em vários alvos celulares, como inativação enzimática, peroxidação dos lipídios, determinando a lise das membranas celulares, lisossomos, mitocôndrias, resultando em morte celular (BERTOLONI et al., 1989; DONNELLY et al., 2008). Por isso, a TFD vem se mostrando eficiente na inativação de bactérias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, fungos e vírus (EHRENSHAFT et al., 1998; GONZALES & MAISCH, 2012; PIRES, 2012).

Wilson e Yianni, demonstraram que  $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de azul toluidina (AT) sob luz laser de baixa potência, determinou uma redução de cerca de  $4,47 \log_{10}$  na contagem viável de um isolado de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) (WILSON e YIANNI, 1995). Usacheva et al., em 2001, compararam o uso de AM e AT frente a diferentes bactérias, observaram que com o uso de um laser de diodo todas as bactérias submetidas foram erradicadas, entretanto quando não expostas ao laser, os mesmos resultados não foram observados (USACHEVA, TEICHERT, BIEL, 2001; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005).

Wainwright e colaboradores, avaliaram a atividade fotodinâmica de diferentes FS fenotiazínicos frente a cepas MRSA, observando que as concentrações letais mínimas dos FSs variaram “significativamente” entre as espécies e isolados bacterianos. Todavia, o dimetil azul de metileno foi bactericida mesmo em baixas concentrações. Apesar desse resultado, há indícios de significativa toxicidade deste composto mesmo na ausência de luz (PHOENIX, et al., 2003; WAINWRIGHT, et al., 1998). Em 1999, Kubin e colaboradores compararam os FSs: hipericina, Photofrin II, o porfímero sódico e o meso-tetra-hidroxi-fenol-clorina (mTHPC) frente a cepas *S. aureus*. Observaram acentuada sensibilidade a irradiação de luz branca térmica na presença de Photofrin II ou mTHPC (KUBIN, WIERRANI, JINDRA, 2003; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005). Já Wierrani relatou que, quando o mTHPC era empregado em associação a um derivado de hematoporfirina, o mesmo evidenciava atividade anti-

estafilocócica sob iluminação de luz branca. Nesse artigo o autor também observou o desenvolvimento de resistência à eritromicina após a iluminação com o HpD (O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005).

A TFDA também tem sido empregada no controle de micro-organismos contaminantes de alimentos. Romanova et al. compararam três FSs (tetra (N-metil-4-piridil) porfina (TMPyP), AM e AT) frente a *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157: H7 com iluminação de luz vermelha (660 nm). O estudo demonstrou que o AT foi o mais efetivo seguido do AM e, por fim, a porfirina TMPyP para ambos os organismos (RAMONAVA, et al. 2003).

Outra área onde se observa grande aplicabilidade da TFDA é na prática e pesquisa odontológica. A microbiota oral envolve grande número de bactérias dos gêneros como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Bacteroides* estão bem relacionados com periodontites. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que espécies de *Prevotella* e *Porphyromonas* cultivados como biofilmes foram inibidas após exposição à irradiação laser de argônio (MATEVSKI, et al., 2003; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005; WOOD, et al, 1999).

Também avaliou-se o uso de TFDA para biofilmes mistos, formados por *S. aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Os resultados não foram tão satisfatórios quando comparados a suscetibilidade dos biofilmes de uma única espécie. Schneider et al, observaram que no biofilme artificial de *S. mutans* usando o cloreto de fenotiazina como FS, ocorreu somente redução parcial do número de células de *S. mutans* na camada superficial (10 mm), o que comprova a dificuldade de penetração da luz, e dificuldade de difusão dos compostos nos biofilmes (SCHNEIDER, et al., 2011).

Com base nos estudos realizado por Finsen, um grupo dinamarquês realizou um trabalho para explicar os dados obtidos anteriormente, demonstrando que a produção de oxigênio singlete através de radiação de porfirinas endógenas em *Mycobacterium tuberculosis* era eficaz no tratamento da tuberculose da pele. Entretanto, a eficiência no tratamento é muito dependente da densidade celular (MOLLER, et al., 2005; SHARLIN, et al., 2002).

A TFDA evidencia pouca especificidade frente a doenças infecciosas, uma vez que o FS pode ligar-se e/ou ser absorvido pelas células hospedeiras ou micro-organismos comensais. Há, por isto, incremento em estudos objetivando aumentar a especificidade dos FS ligando-os a anticorpos que reconheçam antígenos na superfície bacteriana (GROSS, BRANDIS, CHEN; 1997; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005). Vários estudos têm sido realizados com a utilização da proteína A, uma proteína de superfície de *S. aureus* que se liga a IgG pela região

Fc. Num destes trabalhos, foi verificado que a fototoxicidade do conjugado alvo era dependente da dose do FS, da presença de luz e inibida pela IgG nativa sobre as células de estafilococos (GROSS, BRANDIS, CHEN; 1997; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005). Num outro estudo empregou-se um anticorpo específico para MRSA na confecção de um conjugado [anticorpo-SnCe6] capaz de direcionar-se contra MRSA. Este tratamento foi eficaz em destruir todas as cepas de MRSA em todas as fases de crescimento (lag, exponencial ou estacionário) que foram testados (EMBLETON, et al., 2004; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005).

Frente a fungos patogênicos a TFDA é instigante porque grande número de fungos são primariamente resistentes aos antimicóticos disponíveis. Ademais, o fenômeno da resistência secundária ou adquirida é crescente, sobretudo nas espécies dos gêneros *Candida* e *Aspergillus*. Neste contexto, a aplicação da TFDA em pacientes com infecção fúngica na pele tem um potencial considerável (JOHNSON, et al., 1995). Estudos tem demonstrado que leveduras e dermatófitos podem ser inativados *in vitro* pela irradiação com comprimentos de onda de luz visível na presença de corantes (BERTOLONI, et al., 1989; JOHNSON, et al., 1995; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005).

Souza et al, demonstraram em seu estudo que os compostos fenotiazínicos possuem capacidade de inativar diversas espécies do gênero *Candida* (SOUZA, et al., 2006). Ademais, o AM e o AT também foram eficientes frente a fungos causadores de dermatofitoses, com destaque para *Trichophyton rubrum* (BALTAZAR et al, 2013; RODRIGUES et al, 2012; SMIJS, et al, 2012). Lyon e colaboradores, demonstraram o sucesso terapeutico da TFD com AM frente a agentes de cromoblastomicose, um doença fungica que acomete o tecido cutâneo e subcutâneo e apresenta dificuldades no tratamento, uma vez que a remissão é frequente (LYON et al, 2011).

Após o estudo com a cromoblastomicose, Lyon et al., também verificaram a eficácia da TFD com AM frente *Fonsecea pedrosoi* e *Chaphialophora carrionii*. Resultados semelhantes obtidos por Gonzales et al. para *Mertharzium anisopiae*, *Aspergillus nidulans* (LYON, et al., 2012; GONZALES, et al., 2010). Um estudo *in vitro* realizado por Mario et al., demosntrou que a TFD tem atividade sobre os agentes de esporotricose, uma vez que, o AM foi capz de reduzir o crescimento fúngico de forma significativa, em concentrações mais baixas do que no estudo realizado por Lyon et al (LYON et al, 2011; LYON, et al., 2012; MARIO, 2015).

No estudo realizado por Mang et al. foi possível verificar que isolados de *Candida spp* resistentes ao fluconazol e anfotericina B apresentaram suscetibilidade similar a de cepas

sensíveis a esses antifúngicos, quando tratados com TFD utilizando porfirinas como FS (MANG, MIKULSKI, HALL, 2010).

Outra característica importante a ser ressaltada, é em relação aos biofilmes fúngicos. Normalmente esse tipo de estrutura não responde adequadamente a terapêutica com agentes antifúngicos além de, facilmente, desenvolver resistência àqueles agentes (EICK & PFISTER, 2004). Por isto, diversos estudos avaliaram a TFD sobre biofilmes fúngicos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Donnelly et al, avaliaram a suscetibilidade de *Candida albicans* na forma planctônica e no biofilme frente a TFD com compostos fenotiazínicos. Neste estudo evidenciaram a redução de 99% de micro-organismos na forma planctônica utilizando-se 2 mg/ml de azul de toluidina. Todavia, para obtenção do mesmo efeito na forma de biofilmes, foi necessária a utilização de 5 mg/ml do mesmo composto (DONNELLY, et al, 2007). Outro estudo também comparou o efeito da TFD para as formas planctônica e de biofilme de diversas espécies de *Candida*, empregando a curcumina como FS. Observou-se redução de aproximadamente 98% para a forma planctônica, e 85% para os biofilmes (DOVIGO, et al., 2011).

No amplo contexto da Infectologia, os agentes causadores de infecções locais não estão limitadas a bactérias e fungos, mas envolvem também parasitas e vírus, capazes de causar processos inflamatórios na superfície do corpo humano. Assim, infecções parasitárias locais da pele como a leishmaniose cutânea, podem representar um modelo valioso para estudar a possível aplicação de TFD na contenção dos processos infecciosos causados por parasitas (HEPBURN, 2003; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005).

Alguns estudos relatam a utilização da TFD em pacientes com leishmaniose cutânea. Em um desses estudos, onze pacientes com leishmaniose cutânea aguda foram tratados pelo TFD, utilizando-se como FS, um derivado do ácido aminolevulínico (ALA) nas concentrações de 10-20%, tal agente FS foi incorporado a forma farmacêutica de pomada, e posterior exposição a laser vermelha. Após a realização de dois tratamentos, ocorreu uma redução média do tamanho da lesão em 67% dos casos (ENK, et al. 2003; GARDLO, HORSKA, ENK, 2004; HEPBURN, 2003).

Historicamente, a utilização da TFD em pacientes com infecções virais é utilizada desde a década de 1970, para o tratamento de herpes genital. Entretanto, devido às limitações técnicas da época, como a qualidade da fonte de luz e a escassez de FSs disponíveis, a utilização de TFD para o tratamento de herpes foi descontinuado (MÜLLER-BREITKEUTZ, MOHR, 1997; O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005). Smetana et al., mostraram que a iluminação de vírus herpes simplex 1 (HSV) com luz vermelha na presença de baixas concentrações de AM danifica

e bloqueou a replicação de DNA (O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005). Outros estudos realizados com derivados de ftalocianina demonstram muitas vezes uma atividade virucida notável após a ativação de luz e alterações nas proteínas estruturais do envelope de HSV (O'RIORDAN, AKILOV, HASAN, 2005).

Alguns estudos demonstraram eficácia superior da TFD em comparação com crioterapia. Em um estudo comparativo, a TFD com luz branca foi mais eficaz do que com luz vermelha ou azul ou crioterapia em pacientes com verrugas refratárias (UHLIR, et al. 2002). Utilizando ALA como FS em TFD para verrugas recalcitrantes, foi demonstrado que essa técnica constitui-se numa boa alternativa ao tratamento tradicional, embora o elevado nível de desconforto e de dor durante o procedimento requeira anestésicos (STENDER, WULF, 1999).

## 2.5 RESISTÊNCIA MICROBIANA

Os termos antimicrobiano, antibiótico e anti-infecioso, englobam uma grande variedades de fármacos como antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários, sendo que os antibacterianos são os mais empregados. Em 2001, Mellon et al. estimaram que a cada ano são consumidos 11,2 milhões de Kg de antimicrobianos em animais sem finalidades terapêuticas, e 900.000 Kg administrados em terapias (MELLON, et al.2001). Em humanos o consumo anual e de cerca de 1,3 milhões Kg (MELLON, et al. 2001). O termo antibiótico foi definido por Selma A. Waksman, em 1942, e referia-se a qualquer produto capaz de antagonizar o crescimento microbiano (HUGHES, FENICAL, 2005; NASCIMENTO, 2016). Atualmente há uma distinção entre bactericidas e bacteriostáticos, o primeiro engloba substancias que causam a morte das célula, como  $\beta$ -lactâmicos, já os bacteriostáticos são capazes de inibir a replicação do micro-organismo, sem causar a morte, como por exemplo as sulfonamidas (LEEKHA, 2011; NASCIMENTO, 2016 ; NOGUEIRA, 2012).

Os agentes antibacterianos classificam-se em diferentes classes, como os  $\beta$ - lactâmicos, inibidores de  $\beta$ -lactamases, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifamicinas, macrolídeos, licoeptídeos, estreptograminas, sulfonamidas, quinolonas e outros. Cada uma dessas classes apresenta um mecanismo de ação, que podem agir na replicação de DNA, transcrição, metabolismo do ácido fólico, síntese de proteínas e síntese/ integridade da parede celular (MACDOUGALL,POLK, 2005; MARQUES, et al.2006).

Apesar dessa elevada variedade de antimicrobianos, a resistência antimicrobiana tem emergido como um grave problema de saúde que atrai a atenção de órgãos governamentais



como a Organização Mundial de Saúde (OMS), e no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BECKER, et al. 2006; NOGUEIRA, 2006). Soma-se a esse fato, o elevado potencial de recombinação genética que os micro-organismos possuem e uso indiscriminados de antibacterianos e antifúngicos, gerando assim cepas que se tornam multirresistentes (LOUREIRO, et al. 2016; NASCIMENTO, 2016). Em um estudo realizado por O'Neill, em 2014, estima-se que em 2050, aproximadamente 10 milhões de pessoas morram por ano, em decorrência de alguma infecção causada por uma cepa resistente, tornando-se a principal causa de morte (O'Neill, 2014).

Hoje, tem-se conhecimento de que o surgimento da resistência ao antimicrobianos é o processo altamente complexo e variável. Acredita-se que os antibacterianos que agem sobre enzimas estão mais propensos ao desenvolvimento de resistência, quando comparado aos que atuam de forma irreversível em várias estruturas (MACDOUGALL, POLK, 2005; MARQUES, et al. 2006). Esse mecanismo podem ocorrer de quatro formas principais (i) pela modificação ou destruição enzimática do antimicrobiano, isso ocorre por exemplo com agentes  $\beta$ -lactâmicos quando as bactérias apresentam enzimas  $\beta$ -lactamases; (ii) pela acumulação intracelular do antimicrobiano através da redução da permeabilidade celular ao fármaco, como ocorre com *Pseudomonas aeruginosa* ao imipenem, ou pela presença de bombas de efluxo dos antimicrobianos das células bacterianas, no caso da resistência da família das enterobacteriáceas às tetraciclinas; (iii) as alterações nas moléculas alvo dos antibacterianos, como ocorre na resistência intrínseca das bactérias do gênero *Enterococcus* às cefalosporinas; (iv) e pela produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antimicrobiano, enquanto se continua a produzir as moléculas alvo originais, contornando desse modo a inibição induzida pelo farmaco, no caso da resistência de *S. aureus* à metilina (HAWKEY, 2007; LOUREIRO, et al. 2016).

Ao longos dos anos, verificou-se que *S. aureus* e o gênero *Enterococcus*, foram as bactérias Gram-positivas que apresentaram maiores problemas relacionadas a resistência (HAWKEY, 2007, 2009). A espécie de *S. aureus* foi a primeira espécies bacteriana a produzir penicilinas, e que tornaram-se resistentes a outros antibacterianos causados problemas clínicos na década de 1950. Para suprir esse problema, introduziu-se no mercado a metilina e outras penicilinas semissintéticas (HAWKEY, JONES 2009). Entretanto da década de 1960, surgiram os primeiros relatos de *S. aureus* metilina resistente (MRSA) resistentes no Reino Unido, e que depois disseminou-se mundialmente (DUCKWORTH, ET AL. 1988; GRUNDMANN, ET AL. 2006; HAWKEY, JONES, 2009).

As bactérias do gênero *Enterococcus*, que possuem baixa virulências, mas que causam doenças principalmente em pacientes imunodeprimidos, tiveram o primeiro relato de resistência, em 1986, na espécie *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina, no Reino Unido. O surgimento de bactérias do género *Enterococcus* altamente resistentes e causadoras de infecções difíceis de tratar ocorreu inicialmente nos Estados Unidos, e depois em outras regiões do mundo (CAMINS, 2007; GOULD, 2008; HAWKEY, 2008; NAIDOO, 1989).

Entre as bactérias Gram-negativas, a família *Enterobacteriaceae*, apresentou os primeiros relatos de resistência, na década de 1960, quando introduziu-se no mercado a ampicilina. Essas bactérias eram capazes de produzir a enzimas  $\beta$ -lactamase, que tornou-se um problema sério de saúde, devido à transferência por plasmídeos de genes de resistência  $\beta$ -lactamases, o serina temoniera (TEM) e sulfhydryl variable (SHV) (HAWKEY, JONES, 2008; HAWKEY, 2009). Na década de 1980, foi colocado no mercado a 3ª geração de cefalosporina, e surgiram os relatos de genes TEM e SHV mutates, que disseminou-se entre as espécies de *Escherichia coli* e *Klebsella spp.*, com isso surgiu as estripes produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL), e mais tarde um novo gene de  $\beta$ -lactamases, a cefotaximases Munich (CTX-M), que se disseminou por todos os continentes (HAWKEY, JONES, 2008; HAWKEY, 2009; JACOBY, MEDEIROS, 1991).

Na década compreendida entre 2000 e 2010, a ocorrência de alterações genéticas ocorreram predominantemente na bactérias que apresentavam o gene ESBL e CTM-X, além disso, é notório que o aumento da utilização de carbapenêmicos, em infecções causadas por enterobactérias multirresistentes, provocou um aumento na ocorrência de resistência a estes agentes, devido a disseminação da transferência de plasmídeos que codificam enzimas carbapenemase, como o imipenemases (IMP) e Verona integron-encoded metallo-  $\beta$  lactamases (VIM) (CASTANHEIRA, 2005; GOULD, 2008; HAWKEY, JONES, 2008; HAWKEY, 2009).

As infecções causadas por fungos também tornaram-se mais prevalentes, devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos ou em estado crítico, permitindo-se caracterizar as micoses oportunistas como infecções fúngicas invasivas com elevada morbidade e mortalidade (CASTRO, ET AL. 2006; MAGRI, 2012; NAVARRO, 2016). Ao mesmo tempo, o aumento da prevalência das micoses invasivas, em geral de difícil tratamento, acentuou o antigo problema das escassas opções terapêuticas. Apesar dos últimos lançamentos de agentes antifúngicos para uso sistêmico, hoje as opções terapêuticas disponíveis são ainda limitadas: anfotericina B, azólicos (itraconazol, fluconazol, isavuconazol, posaconazol, voriconazol) e equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina). O fenômeno da resistência aos

antifúngicos, normalmente atribuído ao uso prolongado de antimicóticos, é recente mas agrava ainda mais as já reduzidas opções do arsenal antifúngico (CASTRO, ET AL. 2006; MAGRI, 2012; NAVARRO, 2016).

Durante a última década, o fluconazol foi empregado como o fármaco de primeira linha para infecções causadas por fungos leveduriformes. Entretanto as espécies resistentes a esse fármaco começaram a surgir, isso ocorre devido a expressão de genes de resistências em algumas espécies de *Candida*, como o *C. glabrata*, ou em então devido ao aumento da expressão de bomba de efluxo, como *C. tropicalis* (CASTRO, et al. 2006; MAGRI, 2012; NAVARRO, 2016). Novos triazóis como voriconazol e o posaconazol, foram então lançadas. Mesmo assim o problema de resistência esta bem definido em âmbito mundial e a ocorrência de resistência cruzada entre triazóis, tornou-se uma preocupação em sua relação clínica (CASTRO, et al. 2006; Chen et al., 2012; MAGRI, 2012; NAVARRO, 2016). Por outro lado, a ocorrência de espécies, simultaneamente a antifúngicos de classes diferentes, como é o caso da resistentes à anfotericina B e ao fluconazol tem sido constatada, tal fenômeno chama-se multirresistência e potencializa os problemas da terapêutica antimicótica (CASTRO, et al. 2006; Chen et al., 2012; MAGRI, 2012; NAVARRO, 2016).

### 3. PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS

#### 3.1 PROPOSIÇÕES

Na evolução histórica da terapêutica antimicrobiana registram-se intermitentes avanços e retrocessos devido ao fenômeno da resistência antimicrobiana, sobretudo quanto à antibioticoterapia. Na busca por alternativas a estes tratamentos, a TFD emerge com uma possibilidade, ainda pouco explorada. As investigações nesta área centralizam pontos promissores como é a busca por melhores agentes fotossensibilizantes, capazes de resultados mais eficientes.

#### 3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, a atividade da TFD associado ao uso de compostos derivados de ferroceno-porfirinas sobre micro-organismos patogênicos.

#### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Frente a um painel de micro-organismos incluindo bactérias – *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus wernicke*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA), *Staphylococcus aureus* metilina-sensível (MSSA) – fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e uma alga – *Prototheca spp.* –, avaliar a atividade fotodinâmica *in vitro* dos seguintes fotossensibilizantes:

- a) tetra- fenil – porfirina (TPP)
- b) 5,10,15,20 - tetra- ferroceil – porfirina (TFcP)
- c) zinco – 5,10,15,20 - tetra- ferroceil – porfirina (ZnTFcP)

#### 4. MANUSCRITO

### **Evaluation of photodynamic activity ferrocene-porphyrin compounds on pathogenic microorganisms**

Fernanda Baldissera Piasentin<sup>1</sup>; Jessica Tairine Keller<sup>1</sup>; Mariana Stoeber; Bernardo Almeida Iglesias<sup>1,3</sup>; Sydney Hartz Alves<sup>1,2</sup>

A ser submetido ao periodico Brazilian Journal of Infectious Diseases.

Qualis: B2

Impact Factor: 1.468

## Evaluation of photodynamic activity ferrocene-porphyrin compounds on pathogenic microorganisms

Fernanda Baldissera Piasentin<sup>1</sup>; Jessica Tairine Keller<sup>1</sup>; Mariana Stoever; Bernardo Almeida Iglesias<sup>1,3</sup>; Sydney Hartz Alves<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Micological Research Laboratory, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Laboratory of Macrocycles Porfirínicos, Federal University of Santa Maria, UFSM, 97115-900 Santa Maria, RS, Brazil

### SUMMARY

**Introduction:** The increase of antimicrobial resistance to conventional treatments and the increasingly frequent appearance of multi-resistant microorganisms has encouraged studies to develop new techniques capable of containing the advance of this problem. Therefore in recent years, PDT has emerged as an efficient alternative in the inhibition of Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as with fungi and viruses.

**Objective:** Evaluate, *in vitro*, the photodynamic activity promoted by compounds derived from ferrocene-porphyrins on pathogenic microorganisms.

**Methods:** Strains of *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. epidermidis* ATCC 1228, *S. wernicke*, *B. cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 19559, five strains of MRSA and six strain MRSA, *C. albicans* ATCC 14057, *A. fumigatus* CBS 133-61 and *Prototheca* spp which were exposed to photosensitizers: TPP, TFcP, ZnTFcP, at the concentrations of 6.0  $\mu$ M, 3.0  $\mu$ M and 1.5  $\mu$ M. After adjusting the inoculum, 100 $\mu$ L of the cell suspension and 100 $\mu$ L of the photosensitizer were placed in 96-well microplates, incubated in the dark for 30 min at 30°C ( $\pm$  2°C), under agitation and then exposed to light for 1 minute and 50 seconds. Aliquots of 10 $\mu$ L were removed and seeded at 35°C until growth and after the number of developing colonies was determined.

**Results:** In our study, the photodynamic activity of TPP, TFcP and ZnTFcP in the three concentrations tested were able to inhibit bacterial growth only of the following species: *S. aureus* ATCC 25922, *S. wernicke*, *S. epidermidis*, *B. cereus* ATCC 14579. For MRSA strains and for MRSA strains, the best inhibition occurred with TFcP at the concentration of 3.0  $\mu$ M,. For *B. subtilis* ATCC 19559, PDT was only effective in TPP concentrations at 1.5  $\mu$ M and 3.0  $\mu$ M. For Gram-negative bacteria, fungi and *Prototheca* spp, we didn't register satisfactory results.

**Conclusion:** Ferrocene-porphyrin compounds while photosensitizers candidates showed the best activity against Gram-positive bacterial agents. So they deserve be evaluated as an alternative for treatments of bacterial topical infections.

**Keywords:** photodynamic therapy - ferrocene-porphyrin – bacteria – fungi - *Prototheca*

## 1. INTRODUCTION

The increase of antimicrobial resistance to conventional treatments, as well as the increasingly frequent emergence of multidrug-resistant microorganisms has become a world problem<sup>2,3</sup>. This is consequence to some causes as: the widespread and inadequate use of antimicrobial agents, the increase of resistance to antimicrobial agents, as well as the worldwide spread of resistant strains. The different resistance, mechanisms adopted by microorganisms together to decrease of financial resources applied to researching new drugs by the pharmaceutical industries are important factors too<sup>2,3</sup>.

In recent years, photodynamic therapy (PDT) has emerged as an effective alternative for the inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and virus. This technique consists by the combination of three factors: (i) the photosensitizer (PS), which is able to accumulate selectively into damaged tissues or be metabolized by the target cells; (ii) exposure to visible light with adequate wavelength and (iii) the presence of oxygen<sup>41</sup>. The activation of PS results in the production of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anions and singlet oxygen, which in a sequence of photochemical and photobiological reactions promotes the inactivation of the target cell<sup>14,34</sup>.

In order to PDT shows the best performance, it is mandatory that the molecules shows photochemical and photophysical characteristics such as: selectivity to target cells, good absorption in the region of 600 to 1000 nm, high quantum and good yielding biological response<sup>48</sup>. Several PSs have been used in photodynamic therapy, including porphyrines, protoporphyrin IX, phthalocyanines, chlorines and phenothiazine compounds. Nowadays, the only clinically employed PSs are the salts of phenothiazine<sup>21,25,28,31,51,52</sup>.

Porphyrines are molecules very employed in photodynamic therapy as a photosensitizer, since they have strong optical absorption, high chemical stability and photochemical and high affinity by the biological structures<sup>20,56</sup>.

Here we studied the ability of three new porphyrines tetraphenyl porphyrin (TPP), 5,10,15,20-Tetra-ferrocenyl-porphyrine (TFcP) and Zinc-5,10,15,20-meso-tetra-ferrocenyl-porphyrin (ZnTFcP) be used as PSs against pathogenic microorganisms.

## 2. MATERIALS AND MEDOTOS

### 2.1 Microorganisms

The strains *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228, *Staphylococcus wernicke*, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 19559, six strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and five strains (MSSA), *Candida albicans* ATCC 14057, *Aspergillus fumigatus* CBS 133-61 and a *Prototheca* spp isolate from the Mycological Research Laboratory (LAPEMI) of the Federal University of Santa Maria (UFSM).

## 2.2 Photosensitizers

Ferrocene-porphyrin photosensitizers were synthesized by the Laboratory of Macrocycles Porphyrins (LMP) of Federal University of Santa Maria. Stock solutions of TPP, TFcP and ZnTFcP, were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO), aliquoted and kept in the dark at -4°C. To carry out this study the photosensitizers were diluted in PBS to the working concentrations: 6.0 µM, 3.0 µM and 1.5 µM

## 2.3 Light source

A diode laser (Na-GaAlP; Theralase, DMC, São Carlos, Brazil) was used with a power of 100 mW at a wavelength of 660 nm and at a distance of 1 cm from the surface of a microplate, resulting in a dose of energy of 30 J/cm<sup>2</sup>.

## 2.4 Evaluation of the effectiveness of photodynamic treatment

The inoculum were standardized from a 24 h subcultures in Muller-Hinton agar for bacterial agents and a 72 h subcultures in potato dextrose agar for *A. fumigatus* and *Prototheca* sp. The concentration of the inoculum were determined by the turbidity evaluated through a spectrophotometer, following the CLSI techniques M07-A10 for bacteria, M27-A3 for yeasts and *Prototheca* sp and M38-A2 for filamentous fungi<sup>16,17,18,19</sup>.

After adjusting the inoculum, 100 µL of the bacterial suspension and 100 µL of FS at different concentrations were added to 96-well microplates. These microplates were kept in the dark for 30 min at 30°C (± 2°C), under agitation and after exposure to light for 1 minute and 50 seconds.

Microplates-control, protected from light, were carried out in parallel in all experiments. After exposures, 10 µL aliquots were removed and seeded in MHA (for bacteria), SDA (for *C. albicans* and *Prototheca*) and PDA (*A. fumigatus*) poured into Petri dishes. After, they were incubated at 35 °C for 24 hours for bacteria, 48 h for yeasts and during 72 hours for *Prototheca* and *A. fumigatus* when the number of developed colonies were registered. All tests were performed in triplicate.



## 2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the two-way ANOVA test, followed by Fischer's LSD test, with values of  $P < 0.05$  considered to be statistically significant.

## 3. RESULTS

In Figure 1, our results show that the photosensitizers TPP, TFcP and ZnTFcP at 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu\text{M}$  when exposed to laser light were able to reduce growth compared to the positive control ( $p \leq 0, 05$ ) for *S. aureus* strain ATCC 25923, whereas for the other microorganisms there was no reduction statistically significant.

The same can be observed in the figure 2, where the tested concentrations of the photosensitizers plus irradiation were not able to reduce the growth of *C. albicans*, *A. fumigatus* and *Prototheca* sp strains.

For MSSA strains (Figure 3) the bacterial inactivation was more effective with the use of the TFcP (3.0  $\mu\text{M}$ ) which was able to inhibit around 60% of the strains ( $p < 0.05$ ). At the same time, when we tested ZnTFcP (1.5  $\mu\text{M}$ ) 40% of these strains showed growth inhibition ( $p < 0.05$ ) and the same PS at 3.0  $\mu\text{M}$  was able to inhibit around 20% of these strains ( $p < 0.05$ ). The PS TPP 1.5  $\mu\text{M}$  inhibited 20% of the MSSA either ( $p < 0.05$ ).

The photodynamic activity against MRSA reached 66.7% of the strains if compared to growth control, employing any concentration of photosensitizers associated with laser light ( $p < 0.05$ ) (Figure 4).

No significant bacterial reduction was found when comparing the photosensitizers or light alone against MSSA and MRSA strains.

In Figure 5, it is shown that the photodynamic inhibition of *Bacillus subtilis* ATCC 19559 was obtained by TPP photosensitizer at 1.5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) and 3.0  $\mu\text{M}$  ( $p < 0, 05$ ). When we tested *Bacillus cereus* strain ATCC 14579, all concentrations of the photosensitizers exposed to laser light were able to inhibit the microbial growth ( $p < 0.0001$ ) (Figure 5).

*Staphylococcus wernicke* was inhibited by the three PS at all concentrations but the best results were obtained with ZnTFcP (1.5  $\mu\text{M}$ ), TPP (3.0  $\mu\text{M}$ ) TPP and ZnTFcP (6.0  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0.0001$ ). The photodynamic inactivation against *S. epidermidis* also occurred with any concentration of the photosensitizers tested, but the best were TPP (1.5  $\mu\text{M}$ ), TFcP (1.5  $\mu\text{M}$ ), ZnTFcP (3.0  $\mu\text{M}$ ), TFcP (6.0  $\mu\text{M}$ ) and ZnTFcP 6.0  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.005$ )

No growth inhibition statistically significant for bacterial agents was found when we compared the controls of growth exposed alone to PS or to laser light.

#### 4. DISCUSSION

Here we studied the ability of 3 new porphyrins compounds named TPP, TFcP e ZnTFcP which after exposed to laser light could be used as a photosensitizers. The compounds TFcP and ZnTFcP (1.5, 3.0 and 6.0  $\mu\text{M}$ ) showed photodynamic activity mainly against Gram-positive bacteria as *Staphylococcus* spp. Previous studies with porphyrin derivatives as hipericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and Photofrin II also showed the photodynamic activity of similar compounds against *Staphylococcus*<sup>35,47</sup>. Growth inhibition of *Staphylococcus* by mTHPC was either reported by Wierrani. Bactericidal activity against *S.aureus* was registered by Nitzan et al. when studied aminolevulinic acid (ALA) 0,38 mM exposed to blue light  $\lambda= 407\text{-}420\text{ nm}$ <sup>45,47</sup>.

We did not observe any photodynamic activity by the porphyrins here studied against Gram-negative bacteria. Similar results have been reported by Romanova, et al. employing three porphyrin as photosensitizers: tetra (N-metil-4-piridil) porfine (TMPyP), methylene blue and toluidine blue against *E. coli* O157<sup>47,59</sup>.

In general, Gram-positive bacteria are more susceptible than gran-negative microorganisms because the cellular membrane structure from Gram-positive is more simple than Gram-negative bacteria. The Gram-positive structure is susceptible to the perforating capacity of free radicals favoring the entrance of photosensitizer to the cellular interior which causes enzymatic inactivation, lipid peroxidation and cellular membrane lysis resulting in cellular death<sup>12,22,42,43</sup>.

The photosensitizers candidates studied here showed neutral charge; so our results are also in accordance with authors whom postulated that Gram-positive bacteria are more susceptible to photosensitizers showing neutral charge<sup>9,52,58</sup>. On contrary, the Gram-negative bacteria have an organized external membrane which hinders the interactions with photosensitizers therefore show resistance to porphyrins with neutral charge<sup>10,11,36,42,43,51</sup>.

As showed by figures 3 and 4 MRSA isolates were more susceptible than MSSA isolates because the first were inhibited by the three compounds at all concentrations studied while MSSA were resistant to one and the inhibition were registered with TFcP and ZnTHcP 1.5 and 3.0  $\mu\text{M}$ . Similar results were reported by Makdoui et al. employing riboflavin 0.01%<sup>38</sup>.

Some studies have compared the photodynamic activity between MRSA and MSSA. Briggs et al didn't report differences employing methylene blue as photosensitizer and also Hoorijani et al employing toluidine blue 0.75 mg/ml<sup>15,29</sup>. On the other hand Grinholc et al showed that MSSA were more susceptible than MRSA when exposed to protoporphyrin IX 25  $\mu\text{M}$ <sup>27</sup>. Why these differences? The suggestions are based on phenotypic characteristics such as efflux pump, biofilm formation, superoxide dismutase expression and presence of capsular polysaccharides<sup>24,27,38</sup>. It is important remember that structural properties can normally protect against the action of antibacterial agents but there are structural changes such as presented by MRSA what confers resistance. However the same idea can't be applied when the microorganisms are exposed to oxidative damage which is the basis of photodynamic activity<sup>24,63</sup>.

The photodynamic activity can suffer influences by variables such as the nature of photosensitizers, their concentrations and time of exposure to laser light. So, Briggs et al showed inhibition of *S. epidermidis* by methylene blue 0.6 mM after 16 minutes at 35 J/cm<sup>2</sup> and Zeina et al employing different energy doses and methylene blue as PS obtained similar results<sup>15,61,64</sup>. These studies concluded that elevation in the energy causes better effects. Our results showed *S. epidermidis* inhibition by all the concentrations tested suggesting that the increase in the PS concentration may not be always a good way to get better results.

When we tested the concentration of 1.5  $\mu\text{M}$  of the TFCP e ZnTFCP against *S. warneri* during 1:50 minutes of exposure to light (30 J/cm<sup>2</sup>) we registered significant growth inhibition. Similar results were reported by Alves et al testing cationic derivatives of porphyrin 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetraiodide (Tetra-Py+-Me) and 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)20-(pentafluorophenyl)porphyrin tri-iodide (Tri-Py+-Me-PF) employing 0.5  $\mu\text{M}$  during 5 minutes of exposure to light (1,2 J/cm<sup>2</sup>)<sup>8</sup>. A good effect obtained from low photosensitizer concentrations can be explained by their charges; the molecules with elevated positive charge show improvement in the porphyrin amphiphilic character and this condition interacts with bounds between porphyrins and cellular membranes resulting in better photodynamic activity<sup>3,4,5,6,7,60</sup>.

The inactivation of the *Bacillus subtilis* strains occurred when associate to the use of laser light with TPP 1.5  $\mu\text{M}$  and 3.0  $\mu\text{M}$ , while for *Bacillus cereus*, all PS concentrations were able to inhibit microbial growth<sup>28</sup>. Our results confirm the data of Shawar and Cooper, which demonstrated that photodynamic inactivation of *B. subtilis* was more difficult when compared to *Enterococcus faecalis*, using hematoporphyrin at concentrations of 5-50  $\mu\text{g/ml}$ <sup>50</sup>. The same

was demonstrated in the study conducted by Su, et al. in which the use of hypocrellin A as a photosensitizer against *S. aureus* and *B. subtilis* was able to decrease the bacterial growth of both species. However, the results for *S. aureus* were more sensitive in comparison to *B. subtilis*<sup>57</sup>.

Some authors suggest that structural characteristics such as cytoplasmic membrane composition can explain the susceptibilities variations because the presence of some proteins and lipoproteins can favoring the interactions between cells and photosensitizers as also the transport of these molecules into cells. Besides this we must consider the affinity between PS and the bacterial cells because TPP was the only studied compound able to inhibit *B. subtilis* growth. On contrary, *Bacillus cereus* growth was inhibited by all of the compounds evaluated<sup>50</sup>.

When we tested these candidates to be PS against yeasts and filamentous fungi we did not register growth inhibition by our compounds. This is according with reports involving *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* which are conflicting because some of them show good activity and others employing aminolevulinic acid show low photodynamic activity<sup>32,47,54,55</sup>. On the other hand, Lyon et al showed *in vivo* inhibition of *Fonsecaea pedrosoi* and *Chladophialophora carrionii* using methylene blue as photosensitizer as well as Mario et al showed growth inhibition of five *Sporothrix* species employing methylene blue as photosensitizer<sup>37</sup>.

The compounds TPP, TFcP e ZnTFcP didn't show photodynamic activity against *Prototheca zopfii* but Sellera, et al. showed this activity employing methylene blue as photosensitizer<sup>49</sup>. As already commented the neutral charge of our compounds can explain this finding<sup>28,39,49</sup>.

In general our results confirm previous studies showing better photodynamic activity against prokaryotic cells than eukaryotic cells. External structures as cellular wall and cytoplasmic membrane are the main target of the photodynamic activity and they are easily damaged in the prokaryotic cells causing the extravasation of the cellular content, enzymatic activity inhibition or inhibition in the transport system from the membranes<sup>1,12,23,26,28,33,,36,43,44</sup>.

We can conclude by stating that TFcP and e ZnTFcP compounds deserve further studies in order to first expand the spectrum of pathogens tested and after establishing comparisons with the photosensitizers traditionally employed in photodynamic therapeutic studies.

## REFERENCES

1. Allen C. M., Weber J. M., van Lier J. E. Sulfophthalocyanines for photodynamic inactivation of viruses in blood products: effect of structural modifications. **Photochemistry and Photobiology** v. 62, n. 1, p. 184–189, 1995.
2. Almeida A., et al. Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents. In: Hamblin M, Jori G (eds) Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications. **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, pp 83–160, 2011.
3. Alves, E., et al. Bioluminescence and its application in the monitoring of antimicrobial photodynamic therapy. Appl Microbiol Biotechnol, v. 11, n.6 p. 1115-1128.1992.
4. Alves, E. L., et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins, **BMC Microbiol.**, v. 9, p.70, 2009.
5. Alves, E. L., et al. Photodynamic oxidation of *Staphylococcus warneri* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics, **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 27, p. 1607–1618, 2013.
6. Alves, E. L., et al. Nucleic acid changes during photodynamic inactivation of bacteria by cationic porphyrins, **Bioorg. Med. Chem.**, v. 21, p. 4311– 4318, 2013.
7. Alves, E. L., et al. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation, **Future Med. Chem.**, v. 6, p.141–164, 2014.
8. Alves, E. L., et al. Protein profiles of *Escherichia coli* and *Staphylococcus warneri* are altered by photosensitization with cationic porphyrins. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14; p. 1169-1178. 2015.
9. Ashkenazi, H. Y. Nitzan, D. Ga'1, Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on Gram-positive and Gram-negative bacteria, **Photochem. Photobiol.** v. 77 p. 186–191. 2003.
10. Ballatore, M. B. et al. Photodynamic Inactivation of Bacteria Using Novel Electrogenerated Porphyrin-Fullerene C60 Polymeric Films. **Environmental Science & Technology**, v.49, ,p. 7456-7463, 2015.
11. Banfi, S. et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, p. 28-38, 2006.
12. Bertoloni, G. et al. Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of microbial cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, n. 5, p. 695-698, 1987.
13. Bertoloni, G. et al. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p 9570-966. 1989.
14. Bliss, J. M. et al. Susceptibility of *Candida* Species to Photodynamic Effects of Photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2000–2006, 2004.

15. Briggs, T. et al. Antimicrobial photodynamic therapy—a promising treatment for prosthetic joint infections. **Lasers in Medical Science**, p. 1-10. 2017.
16. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Document M38- A2. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: approved standard**. 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
17. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Document M27-S4 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. 4th ed. informational gsupplemetg1. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.
18. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE CLSI. **Document M07-A10. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard – 10th ed**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.
19. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE CLSI. **Document M100-S26. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 12th ed**. informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2016.
20. Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.
21. Dougherty, T. J. Photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, p. 895-900, 1993.
22. Donnelly, R. F.; McCarron, P. A.; Tuney, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.
23. Egyeki, M. et al. Photosensitized inactivation of T7 phage as surrogate of non-enveloped DNA viruses: efficiency and mechanism of action. **Biochim Biophys Acta**, n.1624 v. 1–3 p.115–124, 2003.
24. Fournier, J.M., Boutonnier, A., and Bouvet, A. Staphylococcus aureus strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. **J. Clin. Microbiol.** v. 27, p. 1372–1374, 1989.
25. Friedberg, J. S. et al. *In vitro* effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 105-107, 2001.
26. Gábor F, et al. Photobiological activity of exogenous and endogenous porphyrin derivatives in *Escherichia coli* and *Enterococcus hirae* cells. **Radiat Environ Biophys**, n. 40, v. 2, p.145–151, 2001.
27. Griholc, M., et al. Multiresistant Strains Are as Susceptible to Photodynamic Inactivation as Their Naïve Counterparts: Protoporphyrin IX-Mediated Photoinactivation Reveals Differences Between Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32; n. 3; p. 121–129. 2014.

28. Hamblin M. R. , Hasan T., Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci**, n.3, p. 436–450, 2004.
29. Hoorijani, M. N., et al. The effect of antimicrobial photodynamic therapy on the expression of novel methicillin resistance markers determined using cDNA-AFLP approach in *Staphylococcus aureus*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19; p. 249–255. 2017.
30. Jori, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 505-520, 2006.
31. Juzenas, P.; Moan, J. Singlet oxygen in photosensitization. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 25 (1-2), p. 29-50, 2006.
32. Kamp H, et al. Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. **Mycoses**, v. 48, p. 101-107, 2005.
33. Kassab K., Phthalocyanine-photosensitized inactivation of a pathogenic protozoan, *Acanthamoeba palestinensis*. **Photochem Photobiol Sci**, v. 2, n. 6, p. 668–672, 2003.
34. Kochevar, I. E. et al. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1280, n. 2, p. 223-230, 1996.
35. Kubin A., et al. Antagonist effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and photofrin II on *Staphylococcus aureus*. **Drugs Exp Clin Res**, v. 38, p.17-22, 2003.
36. Li H. et al. A series of meso-tris(N-methyl-pyridiniumyl)-(4-alkylamidophenyl) porphyrins: synthesis, interaction with DNA and antibacterial activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1354, n. 3, p. 252–260, 1997.
37. LYON, J. P., et al. In vitro photodynamic therapy against *Fonsecaea pedrosoi* and *Cladophialophora carrionii*. **Mycoses**, v. 56, p. 157-161, 2013.
38. Makdoui, K. ; Bäckman, A. Photodynamic UVA-riboflavin bacterial elimination in antibiotic-resistant bacteria. Royal Australian and New Zealand College of Ophthalmologists, v, 44; n, 7; p. 582–586, September/October, 2016.
39. Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n. 3, p. 262-266, 1992.
40. Mario, D. A. N.; et al. *In vitro* photodynamic inactivation of *Sporothrix schenckii* complex species. **Medical Mycology**, v. 52, n. 7., p. 770-773, 2014.
41. Menezes, H.D.; **Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores**

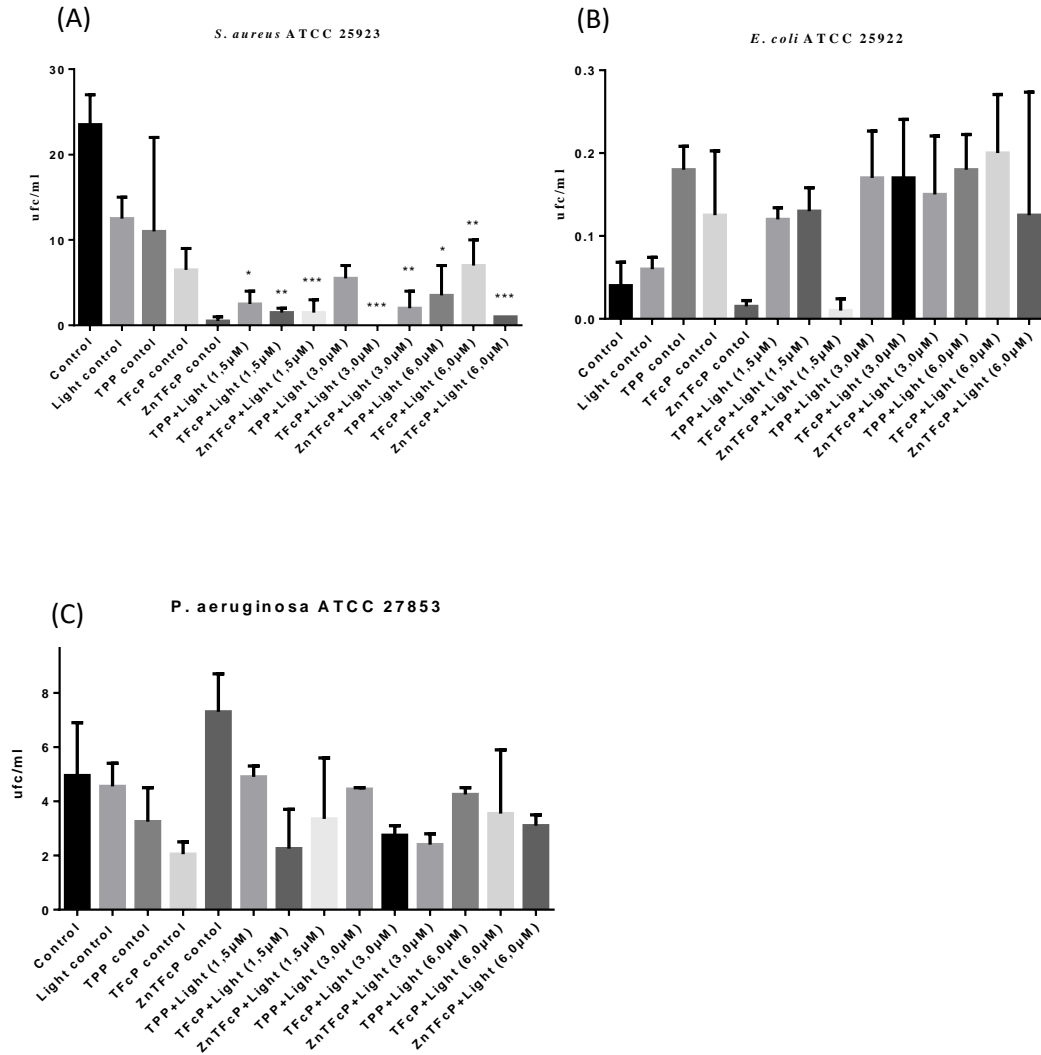
- fenotiazínicos e cumarínicos.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2012.
42. Merchat, M., et al. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria, **J. Photochem. Photobiol. B**, v.32, p. 153–157, 1996.
  43. Merchat M, et al. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. **J Photochem Photobiol B Biol**, v. 35, n. 3, p. 149–157, 1996.
  44. Mettath S, Munson BR, Pandey RK. DNA interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the peripheral position. **Bioconjugate Chem**, v.10, n. 1, p. 94–102, 1998.
  45. Nitzan Y., et al. ALA induced photodynamic effects on Gram-positive and negative bacteria. **Photochem photobiol sci**, v. 3, p. 430-435, 2004.
  46. Nitzan, A. Balzam-Sudakevitz, H. Ashkenazi, Eradication of *Acinetobacter baumannii* by photosensitized agents in vitro, **J. Photochem. Photobiol. B**, v.42, p. 211–218, 1998.
  47. O’Riordan, K.; Akilov, O. E.; Hasan, T. The potencial for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2; p. 247-262, 2005.
  48. Pires, L.; **Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* – estudo *in vitro* e *in vivo*.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade Federal de São Paulo, 2012
  49. Sellera, F. P., et al. *In vitro* photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 13, p. 276-281, 2016
  50. Shawar, R., Cooper, B. H. Comparative kinetics of hematoporphyrin derivative uptake and susceptibility of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus faecalis* to photodynamic action. **Photochemistry and Photobiology**, v. 52, n. 4, p. 825-830, 1990.
  51. Smijs, T. G. et al. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 2, p. 197-202, 2004.
  52. Soukos, N. S. et al. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2595-2601, 1998.
  53. Spesia, M. B. et al, Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, p. 289–295, 2005
  54. Strakhovskaya M. G., et al. Effect of 2,2’-dipyridyl on accumulation of pRotoporphyrin IX and its derivatives in yeast mitochondria and plasma membranes. **Biochemistry**, v.64, p. 213-216, 1999



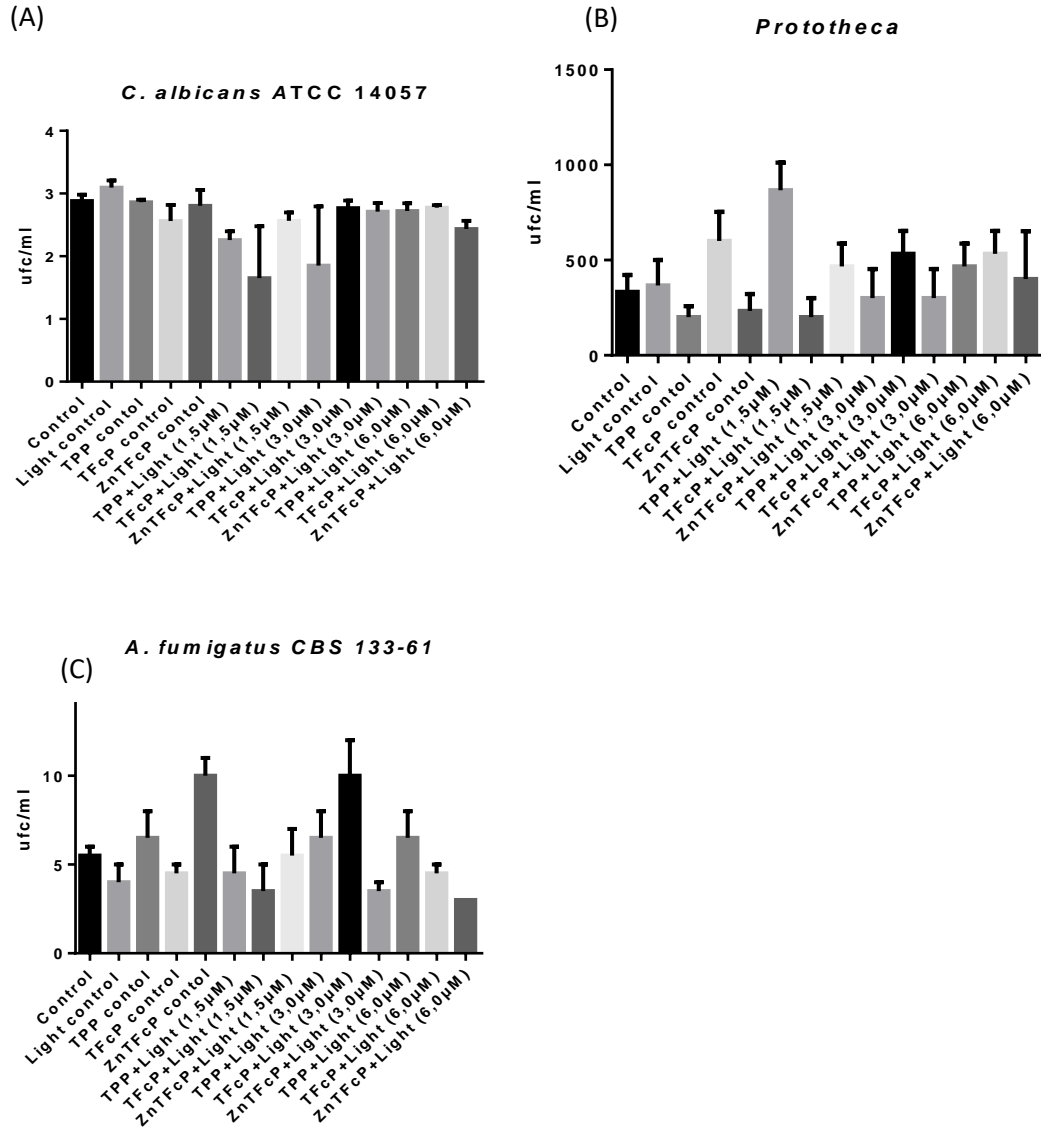
55. Strakhovskaya M. G., et al. Endogenous porphyrin accumulation and photosensitization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of 2,2'-dipyridyl. **J. Photochem Photobiol B**, v. 49, p. 118-122, 1999
56. STERNBERG, E. D., DOLPHIN, D., BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, p. 4151-4202, 1998.
57. Su, Y. et al. Photodynamic antimicrobial activity of hypocrellin A. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103; p. 29–34. 2011.
58. Reddi, E., et al. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrin, **Photochem. Photobiol**, v.75, p. 462–470, 2002.
59. Romanova N. A. et al. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 6393-6398, 2003.
60. Tavares, A., et al. Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins, **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 10, p.1659–1669, 2011.
61. 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.
62. Wierrani F. Experimental investigations and clinical use of photodynamic therapy (PDT) in the rudolf foundation hospital. **Gynakol Geburtshilfliche Rundsch**, v. 39, p. 217-225, 1999.
63. Wised–Wisniewska, A., and Bielawski, K. P. Evaluation of the role of the pharmacological inhibition of Staphylococcus aureus multidrug resistance pumps and the variable levels of the uptake of the sensitizer in the strain-dependent response of Staphylococcus aureus to PPAArg(2)-based photodynamic inactivation. **Photochem. Photobiol.**, v. 86, p. 1118–1126, 2010.
64. Zeina, B., et al. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144; p. 274-278; 2001.

**Figure 1:** Evaluation of photodynamic therapy of (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (B) *Escherichia coli* ATCC 25922, (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

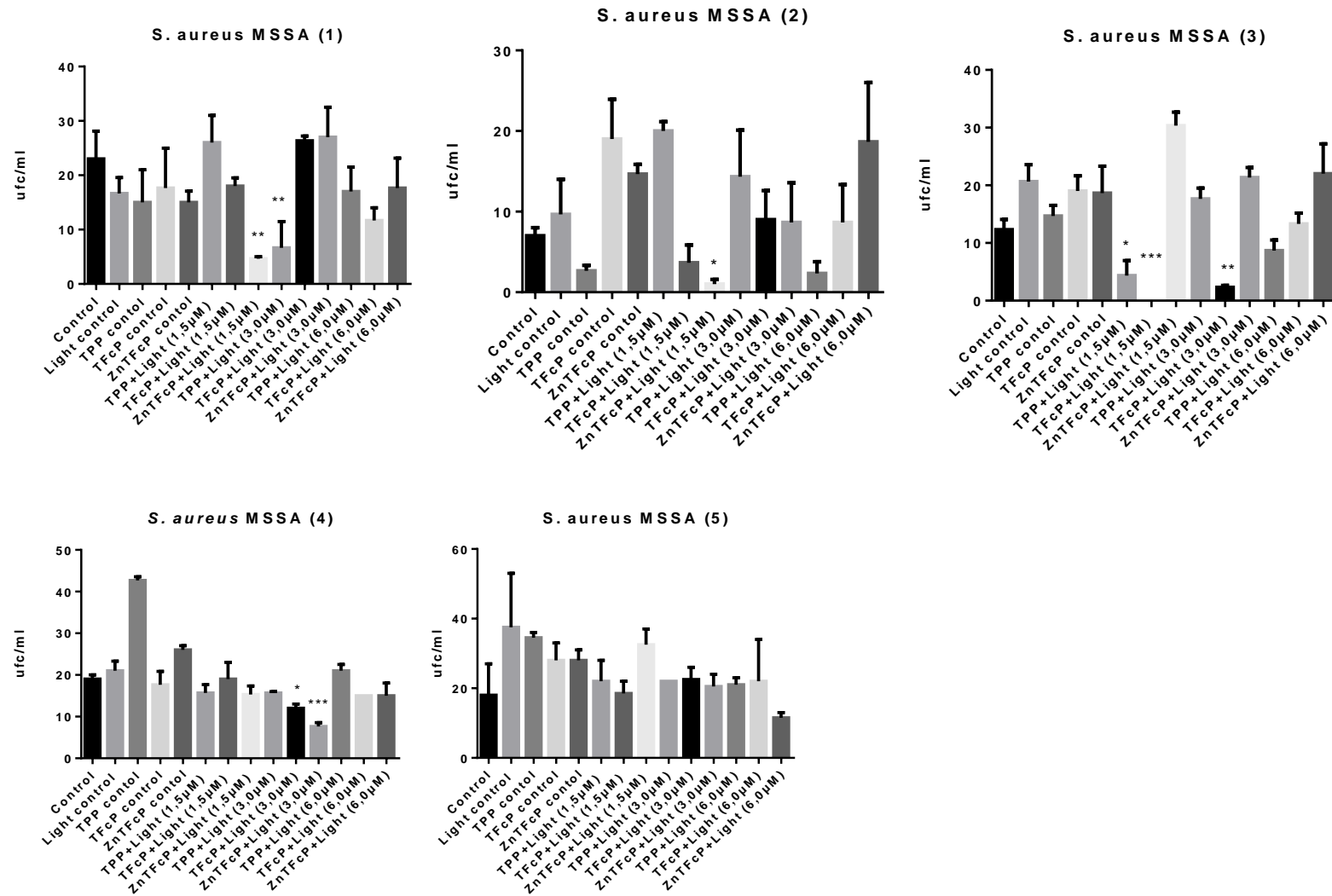
\* p <0.05; \*\* p <0.01: \*\*\* P <0.001



**Figure 2:** Evaluation of photodynamic therapy of (A) *Candida albicans* ATCC 15057, (B) *Prototheca* spp. and (C) *Aspergillus fumigatus* CBS13361

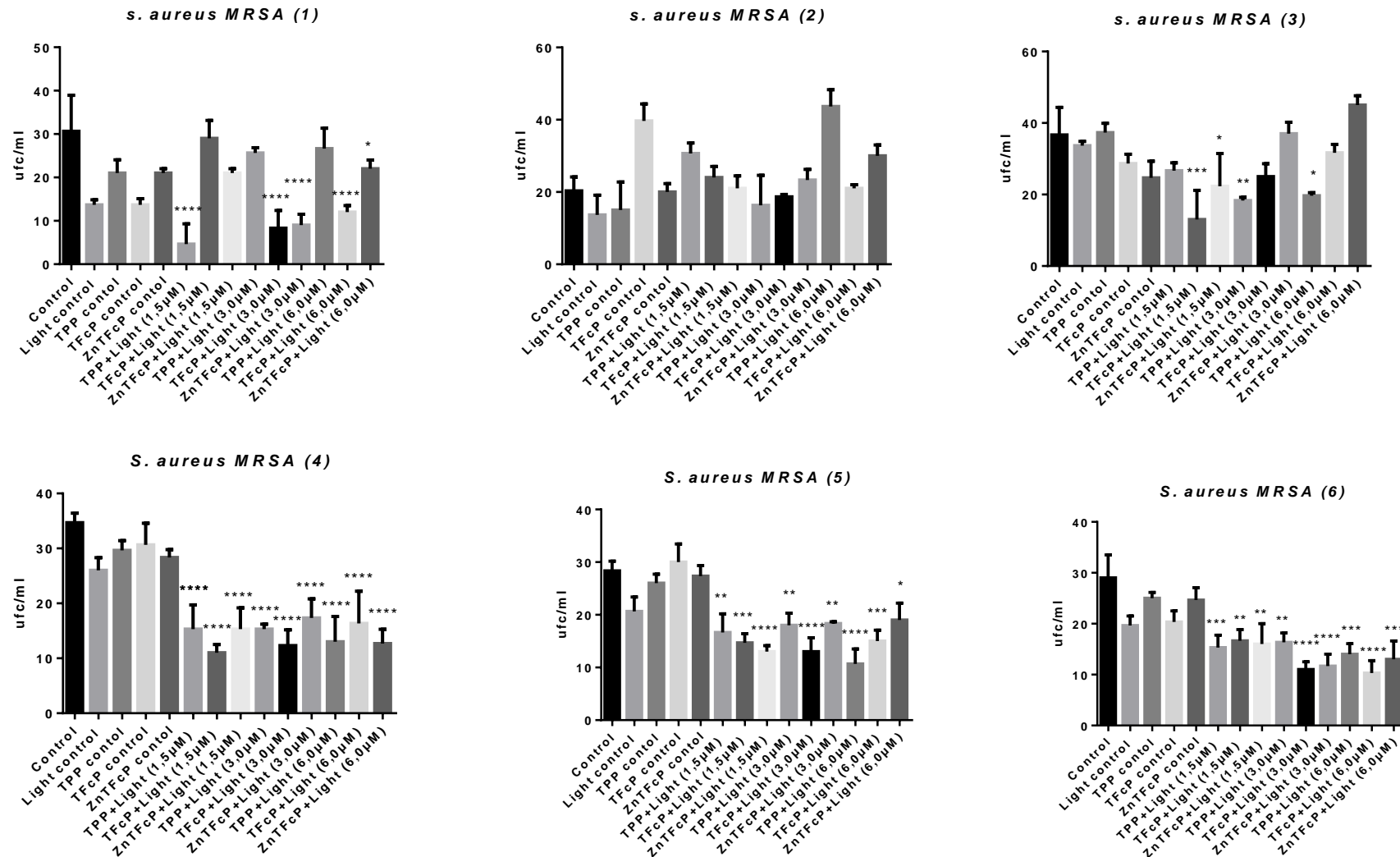


**Figure 3:** Mean (+ standard error of the mean) of *S. aureus* MSSA treated with TPP, TFcP and ZnTFcP at concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu\text{M}$  together with  $\lambda$ : 660 nm laser light during 1 minute and 50 seconds.  
 \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $P < 0.001$



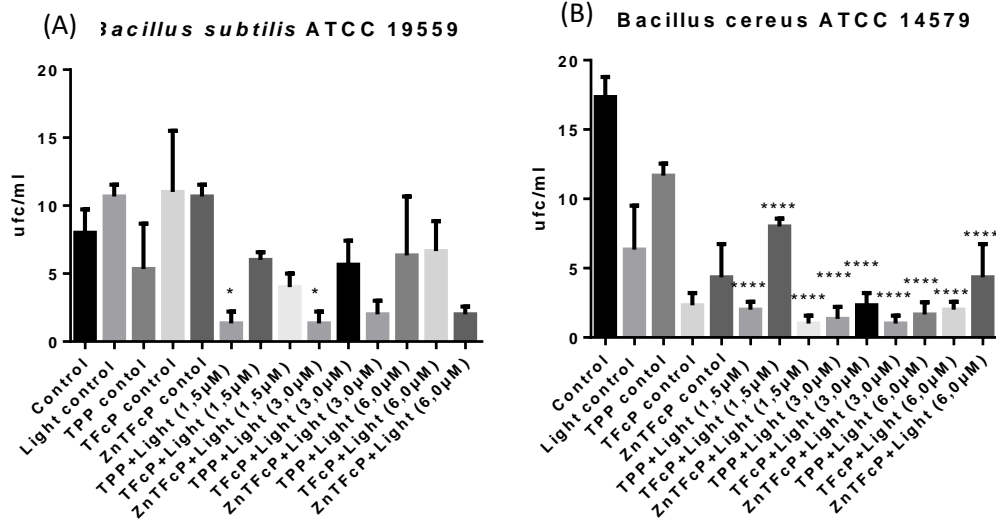
**Figure 4:** Mean (+ standard error of the mean) of *S. aureus* MRSA treated with TPP, TFCp and ZnTFCp at concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu\text{M}$ ;  $\lambda$ : 660 nm laser light during 1 minute and 50 seconds.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$

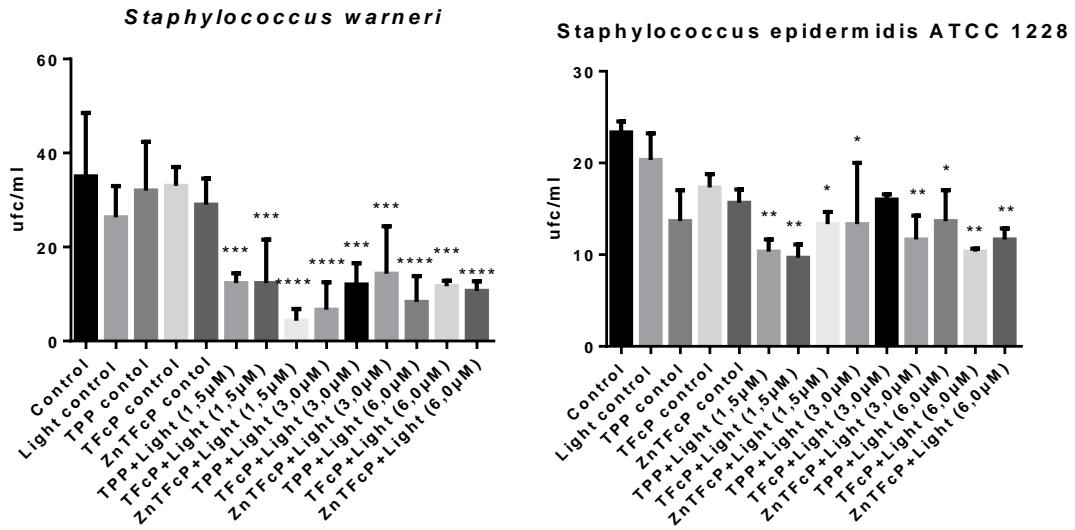


**Figure 5:** Mean (+ standard error of the media) of (A) *B. subtilis* ATCC 19559 and (B) *B. cereus* ATCC 14579 treated with TPP, TFcP and ZnTFcP at the concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu\text{M}$  and laser light with  $\lambda$ : 660 nm for 1 minute and 50 seconds.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$



**Figure 6:** Mean (+ standard error of the media) of (A) *S. warneri* ATCC 19559 and (B) *S. epidermidis* ATCC 14579 treated with TPP, TFcP and ZnTFcP at concentrations of 1.5, 3.0 and 6.0  $\mu$ M along with the laser light with  $\lambda$ : 660 nm for 1 minute and 50 seconds.  
 \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$



## 5. CONCLUSÃO

Com base nos dados relatados nesse trabalho, a TFD associada com a luz laser e utilizando o TPP como FS, foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, MRSA, MSSA, e *S. epidermidis*, *S. wernicke*, *B. cereus* ATCC 14579 e *B. subtilis* ATCC 19559. Já quando associada a luz laser com TFcP, a inibição ocorreu frente *S. aureus* ATCC 25923, MSSA, e *S. epidermidis* e *B. cereus* ATCC 14579. Enquanto, que a utilizam da TFD com ZnTFcP mostrou-se eficaz contra *S. aureus* ATCC 25923, MSSA, e *S. epidermidis*, *S. wernicke* e *B. cereus* ATCC 14579.

Dessa forma, podemos concluir que os três FS empregados nesse estudos foram capazes apenas de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, com baixas concentrações do FS e baixas doses energéticas, entretanto novos estudos devem ser realizados, para avaliar novas concentrações frente a outros micro-organismos ou a biofilmes.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R. et al, The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**. v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

ADLER, A. D. et al. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 32, n. 2, p. 476. 1967

ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1, p. 27-42, 2004.

ALVES, E. et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic *meso*-substituted porphyrins. **BMC Microbiology**. v. 70, n. 9. p 1-13, 2009.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-a clinical super-challenge. **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 5, p. 439-443, 2009.

BABILAS, P. et al. Photodynamic therapy in dermatology – an update. **Photodermatology Photoimmunology e Photomedicine**. v. 21, p. 142–149, 2005.

BAHNER, J. D.; BORDEAUX, J.S. Non-melanoma skin cancers: photodynamic therapy, cryotherapy, 5-fluorouracil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**. v. 31, n. 6, p. 792–798, 2013.

BALTAZAR, L. M.; Melanin Protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the Effects of Antimicrobial Photodynamic Inhibition and Antifungal Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 59, n.7, p. 4003-4011, 2015.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ANDORNO, N. Infectious diseases: a global challenge. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 296, n. 4-5, p. 179-185, 2006.

BEER, P. G. et al. Synthesis and co-ordination chemistry of a novel bis(benzo crown ether) substituted calix[4]arene that can simultaneously complex cations and anions. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**. v. 18, p. 3117-3123, 1995.

BERENBAUM, M. C. et al. Meso-tetra (hydroxyphenyl) porphyrins, a new class of potent tumour photosensitizers with favourable selectivity. **British Journal of Cancer**. v. 54, n. 5, p. 717–72, 1986.

BERTOLONI, G. et al. Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of microbial cells. **Photochemistry and Photobiology**. v. 46, n. 5, p. 695-698, 1987.

BERTOLONI, G. et al. Biochemical and morphological changes in *Escherichia coli* irradiated by coherent and non-coherent 632.8 nm light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 18, n. 2-3, p. 191-196, 1993.

BERTOLONI, G. et al. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**. v. 135, p 957-966, 1989.

BLISS, J. M. et al. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 6, p. 2000-2006, 2004.

BONATO, B. S.; CASTRO, F. F.; HELENA, R. P. G. Oculares de microscópios podem ser veículos de contaminação? **NewsLab**. v. 81, p. 98-104, 2007.

BONNETT, R. et al. Porphyrin sensitizers in tumor phototherapy. Novel sensitizers of the chlorin and bacteriochlorin class with amphiphilic properties. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 6, n. 1-2, p. 29-37, 1990.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**. n. 1, p. 19-33, 1995.

BOYD P. D. W.; HOSSEINI A. 5,15-Bis(p-methylphenyl)-2,8,12,18-tetraethyl-3,7,13,17-tetramethylporphyrin. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**. p.2627-2629, 2006.

BRUGNERA JÚNIOR, et al. **Atlas de laserterapia aplicada à Clínica Odontológica**. 2. ed. São Paulo: Santos, p. 199, 2003.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A.; ZANIN, F. Dosimetria da Laserterapia de Baixa Intensidade na Odontologia. **Jornal Brasileiro de Laser**. v. 1, p. 30-32, 2007.

BUCHER, C. et al. Ferrocene-appended porphyrins: Syntheses and properties. **Coordination Chemistry Reviews**. v.253, n. 1-2, p.21-36, 2009.

CAMINS B. C. et al. A population-based investigation of invasive vancomycin-resistant *Enterococcus* infection in metropolitan Atlanta, Georgia, and predictors of mortality. **Infection Control e Hospital Epidemiology**. v. 28, n. 8, p. 983-991, 2007.

CASTANHEIRA M. et al. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 2, p. 570-573, 2008.

CASTRO, T. L. et al. Mecanismos de resistência da *Candida* sp. a antifúngicos. **Infarma**. v.18, n.9-10, p. 30-35, 2006.

CHEN, T. C. et al., Fluconazole exposure rather than clonal spreading is correlated with the emergence of *Candida glabrata* with crossresistance to triazole antifungal agents. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**. v. 28, n. 6, p. 306- 315, 2012.

CHEVRETTON, E. B., BERENBAUM, M. C.; BONNETT R. The effect of photodynamic therapy on normal skeletal muscle in an animal model. **Lasers Medical. Science**, v. 7, n. 1, p. 103-110, 1992.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Document M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard.** 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Document M38- A2. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: approved standard.** 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Document M27-S4 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** 4th ed. informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE CLSI. **Document M07-A10. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically;** approved standard – 10th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE CLSI. **Document M100-S26. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;** 12th ed. informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2016.

DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.

DONNELLY, R. F. et al. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterization of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 87, n. 1, p. 59-69, 2007.

DONNELLY, R. F.; McCARRON, P. A.; TUNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**. v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.

DOUGHERTY, T. J. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**. v. 38, p. 2628-2635, 1978.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**. v. 58, n.6, p. 895-900, 1993.

DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**. v. 87, n. 4, p. 895-903, 2011.

DUCKWORTH G.J.; LOTHIAN J. L.; WILLIAMS J. D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Report of an outbreak in a London teaching hospital. **Journal of Hospital Infection**. v. 11, n. 1, p. 1–15, 1988.

EAGLESOME, M. D. et al. Studies on inactivation of pathogenic microorganisms in culture media and bovine semen by photosensitive agents. **Veterinary Microbiology**. v. 38, n. 3, p. 277-284, 1994.

EICK, S.; PFISTER, W. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: a in vitro study. **Journal of Periodontology**. v. 75, n. 10, p. 1327-1334, 2004.

EMBLETON, M. L. et al. Antibody-Directed Photodynamic Therapy of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**. v. 10, n. 2, p. 92-97, 2004.

ENE I. V. et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**. v.14, n.9, p. 1319-1335, 2012.

EPSTEIN, J. M. Phototherapy and photochemotherapy. **The New England Journal of Medicine**. v. 32, n. 16, p. 1149-1151, 1990.

FELDMSN, B. C. **Avaliação clínica dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento não-cirúrgico da periodontite crônica**. 2009. Dissertação (Mestrados em Odontologia), Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Duque de Caxias, RJ, 2009.

FIGGE, F. H.; WEILAND G. S. The affinity of neoplastic embryonic and traumatized tissue for porphyrins and metalloporphyrins. **The Anatomical Record**. v. 100, p. 659, 1948.

FORBES B. A.; SAHM D. F.; WEISSFELD A. S. **Diagnostic microbiology**. 12th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier; 2007.

FRIEDBERG, J. S. et al. *In vitro* effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 48, p. 105-107, 2001.

FUCHS, B. B. et al. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 8, p. 2929-2936, 2007.

GENOVESE, W. J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em Odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZALES, F. P.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Fungal Biology**. v. 116, n. 1, p. 1-10, 2012.

GONZALES, F. P. et al. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. **Photochemistry and Photobiology**. v. 86, n.3, p. 637-642, 2010.

GORMAN, S. A.; BROWN, S. B.; GRIFFITHS, J. An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 79-108,

2006.

GOULD I. M. The epidemiology of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 32, p. 52–59, 2008.

GROSS, S. et al. Protein-A-mediated Targeting of Bacteriochlorophyll-IgG to *Staphylococcus aureus*: A Model for Enhanced Site-Specific Photocytotoxicity. **Photochemistry and Photobiology**. v. 66, n. 6, p. 872-878, 1997.

GRUNDMANN H. et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **The Lancet**. v. 368, n. 9538, p. 874–885, 2006.

GUST, D., MOORE, T. A., MOORE, A. L. Molecular mimicry of photosynthetic energy and electron transfer. **Accounts of Chemical Research**. v. 26, n. 4, p. 198-205, 1993.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996.

HANAKOVA, A. et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. **Microbiological Research**. v. 169, n.2-3, p. 163-170, 2014.

HAMBLIN, M. R. et al. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by *in vivo* bioluminescence imaging. **Photochemistry and Photobiology**. v. 75, n. 1, p.51-57, 2002.

HAWKEY P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **British Medical Journal**. v. 317, n. 7159, p. 657–660, 1998.

HAWKEY P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 62, p. i1–i9, 2008.

HAWKEY P. M.; JONES A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 64, p. i3–i10, 2009.

HUGHES, C. C.; FENICAL, W. Antibacterials from the sea. **Chemistry: A European Journal**. v. 16, n. 42, p. 12512-12525, 2010.

ITO, T. Photodynamic action of hematoporphyrin on yeast cells—a kinetic approach. **Photochemistry and Photobiology**. v.34, n. 4, p. 521-524, 1981.

JACOBY G. A.; MEDEIROS A. A. More extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 35, n. 1, p. 1697–1704, 1991.

JOHNSON, E. M. et al. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 35, n. 1, p. 103-114, 1995.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**. v. 25, n. 1-2, p. 505-520, 2006.

JORI, G. et al. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water-borne diseases. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 30, n. 3, p. 261-271, 2011.

JUZENAS, P.; MOAN, J. Singlet oxygen in photosensitization. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**. v. 25, n. 1-2, p. 29-50, 2006.

KESSEL, D. Photodynamic Therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1, n. 1, p. 3-7, 2004.

KISHEN, A. et al. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. **Photochemistry and Photobiology**. v. 86, n.6, p. 1343-1349. 2010.

KOCHEVAR, I. E. et al. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. v. 1280, n. 2, p. 223-230, 1996.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLE'MANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KUBIN, A., WIERRANI, F., JINDRA, R. H. Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and photofrin II on *Staphylococcus aureus*. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**. v. 25, n. 1 p. 13-21, 1999.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General principles of antimicrobial therapy. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 86, n. 2, p. 156-167, 2011

LIPSON, R. L. et al. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 26, n. 1, p. 1-11, 1961.

LOIM, N. M. et al. 5,10,15,20-Tetracyantrenylporphyrin and 5,10,15-tricyantrenylcorrol. **Russian Chemical Bulletin**. v. 43, n.5, p. 871-873, 1994.

LOIM, N. M. et al. The first optically active organometallic porphyrin: *meso*-tetrakis[(1*S*)-2-methylcyantrenyl] porphine. **Russian Chemical Bulletin**. v. 43, n.5, p. 905-906, 1994.

LOIM, N. M., ABRAMOVA, N. V., SOKOLOV, V. I. Synthesis of 5,10,15,20-tetra(ruthenocanyl)porphyrin and 5,10,15,20-tetra (ferrocenyl) porphyrin. **Mendeleev Communications**. v. 6, n. 2, p. 46-47, 1996.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista portuguesa de saúde pública**. v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LYON, J. P. et al. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v.172, n. 4, p. 293-297, 2011.

MACDOUGALL, C.; POLK, R. E. Antimicrobial stewardship programs in health care systems. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, n. 4, p. 638-656, 2005.

MAISCH, T. et al. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 3, n. 10, p. 907-917, 2004.

MAISCH, T. et al. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, n. 5, p. 1569-1578, 2009.

MAGRI, M. M. C. **Caracterização molecular e perfil de sensibilidade de *Candida tropicalis* isoladas em correntes sanguíneas e cateter de pacientes internados em hospitais de ensino**. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012.

MANG T. S.; MIKULSK, L.; HALL, R. E. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 7, n. 2, p. 98-105, 2010.

MARQUES, M. A.; CITRON, D. M.; WANG, C. C. Development of Tyrocidine A analogues with improved antibacterial activity. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. v.15, n. 21, p. 6667-6677, 2007.

MARINHO, S. P. **Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida* sp. e de células epiteliais: estudos *in vitro***. 2006. Tese (Doutorado em Odontologia), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006

MATEVSKI, D. et al. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered xenon lamp *in vitro*. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n.4, p. 428-435. 2003.

MARIO, D.N. **Complexo *Sporothrix schenckii*: inativação fotodinâmica, influência da melanina na atividade dos antifúngicos e combinação de fármacos**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015

MELLON, M.; BENBROOK, C.; BENBROOK, K. L. **Hogging it: estimates of antimicrobial abuse in livestock**. Cambridge: Union of Concerned Scientists, 2001

MENEZES, H. D. **Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2012.

MIDIA, M.; RENTHON-HARPER, P. Laser in dentistry. **British Dental Journal**. v. 170, n. 9, p. 343-346, 1991.

- MIMS, C. et al. **Microbiologia Médica**. 2° ed., São Paulo: Manole Ltda, 2002.
- MOLLER, K. I. et al. How Finsen's light cured lupus vulgaris. **Photodermatology, Photoimmunology e Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 118-124, 2005.
- MORISUE, M. et al. Fine-tuning of a ferrocene|porphyrin|ITO redox cascade for efficient sequential electron transfer commenced by an S<sub>2</sub> photoexcited special-pair mimic. **Chemical Communications**. v. 23, p. 2348-2350, 2007.
- MROZ, P., et al. Photodynamic Therapy of Murine Mastocytoma Induces Specific Immune Responses against the Cancer/Testis Antigen P1A. **Cancer Research**. v. 73, n. 21, p. 6462-6470, 2013.
- MÜLLER-BREITKEUTZ, K.; MOHR, H. Infection cycle of herpes viruses after photodynamic treatment with methylene blue and light. **Beitrage zur Infusionstherapie und Transfusionsmedizin**. v. 34, p. 37-42, 1997.
- NASCIMENTO do, E. D. **Resistencia Bacterina em reservatórios do semiárido brasileiro: caracterização, ações para a vigilância ambiental, prevenção e educação em saúde**. Tese, (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2016
- NARAYANAN, S. J. et al. Synthesis of *meso* Ferrocenyl Porphyrins. **Synlett**. v. 12, p. 1834 – 1836, 2000.
- NAVARRO, B. S. **Fenótipos e perfis de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas da mucosa oral de cães da cidade de Campinas**, São Paulo. Dissertação, (Doutorado em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2016
- NEMYKIN, V. N. et al. Accessing of the mixed-valence states in the zinc meso-ferrocenylporphyrin: experimental and theoretical data. **Journal of Ukrainian Chemistry**. v. 71, p. 79, 2005.
- NOGUEIRA, L. G. **Avaliação do potencial antimicrobiano de Pouteria spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no Helicobacter pylori**. Tese, (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, SP, 2012.
- NYMAN, E. S.; HYNNINEN P. H. Research advances in the use os tetrapyrrolic photosensitisers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 73, n. 1-2 p. 1-28, 2004.
- OLIVEIRA, C. A.; MACHADO, A. E. H.; PESSINE, F.B.T. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. **Chemistry and Physic of Lipids**. v.113, n. 1, p. 69-78, 2005.
- O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations, **Review on Antimicrobial Resistance**. 2014



O'RIORDAN, K.; AKILOV, O. E., HASAN T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 2, n. 4, p. 247-262, 2005.

OKAMURA, T. A. et al. Synthesis and molecular structures of S-2-FcNHCOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SH and [M<sup>III</sup>(OEP)(S-2-FcNHCOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)] (Fc = ferrocenyl, M = Fe, Ga): Electrochemical contributions of intramolecular SH···O=C and NH···S hydrogen bonds. **Journal of Organometallic Chemistry**. v.692, n. 1-2, p. 248-256, 2007.

PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J. M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. **Ultrastructural Pathology**. v. 20, n. 2, p. 109-129, 1996.

PFALLER M. A. et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 26, n. 8, p. 1437– 1441, 1988.

PHOENIX, D. A. et al. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 39, n. 1, p. 17-22, 2003.

PINHEIRO, A. L. **Laser na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, p. 27-44, 1998.

PIRES, L.; **Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* – estudo *in vitro* e *in vivo***. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, SP, 2012

PRATES R. A. et al. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. **Laser Physics**, v.19, n. 5, p. 1038–1044, 2009.

REDDY, G. K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **Journal of Clinical Medicine e Surgery**. v. 22, n. 2, p. 141-150, 2004.

RODRIGUES, G.B. **Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de *Cryptococcus neoformans* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2012.

ROMANOVA, N. A. et al. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 11, p. 6393-6396. 2003.

ROTHERMUND P. Formation of porphyrins from pyrrole and aldehyde. **Journal of the American Chemical Society**. v. 57, n. 10, p. 2010–2011, 1935

ROTHERMUND P. A new porphyrin synthesis. The synthesis of porphyrin. **Journal of the American Chemical Society**. v 58, n. 4, p. 625–627, 1936.

SCHNEIDER, M. et al. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. **Laser in Medical Science**. v. 27, n. 3, p. 615-620, 2011.

SCHERER, H. Chemisch-physikalische untersuchungen. **Annaen der Chemie und Pharmacie**, v. 40, p. 1-64, 1841.

SELLERA, F. P. **Fotoinativação de patógenos causadores da mastite bovina**. 2014. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 2014.

SHOJI, O. et al. Coordination Assembled Rings of Ferrocene-Bridged Trisporphyrin with Flexible Hinge-like Motion: Selective Dimer Ring Formation, Its Transformation to Larger Rings, and Vice Versa, **Journal of the American Chemical Society**. v. 127, n. 7, p. 2201-2210, 2005.

SMIJS, T. G. et al. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**. v. 80, n. 2, p. 197-202, 2004.

SPESIA, M. B. et al, Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 44, n.3, p. 289–295, 2005

SPIKE, J. D. The historial development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciencies. In: Bergasson, R. V. et al. **Primary Photo-Processes in Biology and Medicine**. New York: Plenum Press, cap. 12, p. 209-227, 1985.

SOUKOS, N. S. et al. Targeted antimicrobial photochemoterapy. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**. v. 42, n. 10, p. 2595-2601, 1998.

SOUZA, S. C. de. et al. Photosensitization of diferente *Candia* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**. v. 83, n. 1, p. 34-38, 2006

D'Souza, F. et al. Supramolecular triads bearing porphyrin and fullerene via 'two-point' binding involving coordination and hydrogen bonding. **Tetrahedron**. v. 62, n. 9, p. 1967-1978, 2006.

STENDER I. M.; WULF. H.C. Photodynamic therapy of recalcitrant warts with 5-aminolevulinic acid: a retrospective analysis. **Acta dermato-venereologic**. v. 79, n. 5, p. 400-401, 1999.

STERNBERG, E. D., DOLPHIN, D., BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**. v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.

STRAKHOVSKAYA, M. G. et al. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. **Doklady. Biochemistry and Biophysics**. v. 384, n. 1-6, p. 155-158, 2002.

TEGOS, G. P. et al. Cationic fullerenes are effective antimicrobial photosensitizers. **Chemistry & Biology**. v. 12, n. 10, p. 1127-1135, 2005.

TAM, V. H.; NIKOLAOU, M. A novel approach to pharmacodynamic assessment of antimicrobial agents: new insights to dosing regimen design. **Plos Computational Biology**. v. 7, n. 1, p. , 2011.

TAVARES, A. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. **Marine drugs**. v. 8, n.1, p. 91-105, 2010.

TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA NETO, C. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 5, p. 445-459, 2009.

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 in Surgery and medicine**. v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.

UHLIR, M. et al. Photodynamic therapy of benign viral vulgar lesions. **Ceska Gynecologie**, v. 67, n. 6, p 320-323, 2002.

UTTLEY A. H. et al. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. **Epidemiology e Infection**. v. 103, n.1, p. 173–181, 1989.

VENKATRAMAN, S. et al. Electronic interactions in meso ferrocenyl porphyrin and its metal derivatives. **Indian Journal of Chemistry**. v. 42A, p. 2191-2197, 2003.

VENEZIO, F. R. et al. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 151, n. 1, p. 166-169, 1985.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Chemotherapy**. v. 42, n. 1, p 13-28, 1998.

WAINWRIGHT, M. The use of dyes in modern biomedicine. **Biotechnic Histochemistry**. v. 78, n. 3, p. 147-155, 2003.

WAINWRIGHT, M. et al. Phenothiazinium photosensitisers VII: Novel substituted asymmetric Nbenzylphenothiaziniums as photoantimicrobial agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 99, n. 2, p. 74-77, 2010.

WANG, H. J. H., et al.  $\beta,\beta'$ -Fused metallocenoporphyrins. **Chemical Communications**. v. 24, p. 2646-2647, 2001.

WANG, H. J. H., et al. Synthesis, Characterization, and Electrochemical Studies of  $\beta,\beta'$ -Fused Metallocenoporphyrins. **Inorganic Chemistry**. v. 46, n. 7, p. 2898-2913, 2007.

WASIELEWSKI M. R. Photoinduced electron transfer in supramolecular systems for artificial photosynthesis. **Chemical Reviews**. v. 92, n. 3, p. 435-461, 1992.

WEIS, et al., Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: the revival of a promising idea. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer**. v. 1826, n. 1, p. 53-70, 2012.

WILDER-SMITH, P. The soft laser: therapeutic tool or popular placebo. **Oral Surgery Oral Medicine Oral pathology Oral Radiology**. v. 66, n. 6, p. 654-658. Dec. 1988.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. **Alternative Medicine Review**. v. 6, n. 6, p. 567-579, 2001.

WOLLMANN, R.G; HENDRICKSON, D. N. Synthesis and physical properties of meso-tetraferrocenylporphyrin, the copper complex, and the corresponding mixed-valence oxidation products. **Inorganic Chemistry**. v. 16, n. 12, p. 3079-3089, 1977.

WOOD. S. et al. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 50, n. 1, p. 1-7, 1999.

ZEINA, B. et al. Killing of cutaneous microbial species photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**. v. 144, n. 2, p. 274-278, 2001.

ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**. v. 35, n. 7, p. 3127- 3136, 2008.

ZHU, T. et al. Regulation of Singlet Oxygen Generation Using Single-Walled Carbon Nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**. v. 130, n. 33, p. 10856-10857, 2008.