

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE –  
MEDICINA VETERINÁRIA

Marlane Geribone Seeger

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PORFIRINAS TETRA-  
CATIÔNICAS FRENTE ÀS BACTÉRIAS ISOLADAS DE OTITE  
CANINA**

Santa Maria, RS

2020

**Marlane Geribone Seeger**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS  
FRENTE ÀS BACTÉRIAS ISOLADAS DE OTITE CANINA**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientador: Prof. Juliana Felipetto Cargnelutti

Santa Maria, RS  
2020

**Marlane Geribone Seeger**

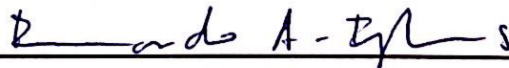
**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS  
FRENTE ÀS BACTÉRIAS ISOLADAS DE OTITE CANINA**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva.**

**Aprovado em 21 de fevereiro de 2020**



**Juliana Felipetto Cargnelutti, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



**Bernardo Almeida Iglesias, Dr. (UFSM)**



**Sonia de Avila Botton, Dra. (UFSM)**

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, Márcia Lisiane Geribone Pires e Verlane Vandir Seeger pelo apoio incondicional, amor, paciência e por terem me ensinado o valor do conhecimento, da persistência e a nunca desistir dos meus sonhos.*

*À minha orientadora Juliana Felipetto Cargnelutti, pela oportunidade de aprender e trabalhar com uma profissional tão dedicada, pela confiança, amizade e incentivo que me proporcionaram uma experiência maravilhosa durante a Residência. Obrigada por acreditar em mim e pela orientação durante a execução deste trabalho.*

*Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia - UFSM, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos e durante todo o período da Residência, pelo convívio diário, ensinamentos e amizade.*

*Ao professor Bernardo Almeida Iglesias, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos e ensinamentos.*

*À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Residência em área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva, pela oportunidade de cursar a Residência em uma instituição de excelência.*

*A todos que contribuíram de alguma maneira para a minha formação pessoal e profissional, muito obrigada!*

## RESUMO

### ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS FRENTE ÀS BACTÉRIAS ISOLADAS DE OTITE CANINA

AUTORA: Marlane Geribone Seeger  
ORIENTADOR: Juliana Felipetto Cargnelutti

A otite externa canina é uma doença multifatorial, comumente encontrada na prática veterinária e estima-se que pode afetar até 20% dos cães. Os agentes bacterianos considerados patógenos mais importantes como causa de otite externa em cães são *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* e *Proteus* sp. Nesses casos, cada vez mais tem se isolado bactérias resistentes aos antimicrobianos tradicionais e, assim, os desafios estão voltados ao combate dessas bactérias resistentes, principalmente com o uso de terapias alternativas. A terapia fotodinâmica é um método alternativo que pode ser aplicado na eliminação de micro-organismos em fluidos e soluções, superfícies e materiais contaminados, bem como em infecções, especialmente causadas por agentes bacterianos resistentes aos antimicrobianos convencionais. Esta terapia utiliza moléculas fotoativas, como as porfirinas, que são capazes de interagir com a luz gerando espécies reativas de oxigênio que alteram estruturas e funções de células e micro-organismos, causando apoptose e/ou inativação. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar as bactérias mais frequentemente isoladas a partir de culturas de suabes de ouvido de cães com otite na região central do estado do Rio Grande do Sul e avaliar a atividade antibacteriana de duas metaloporfirinas tetra-catiônicas (H<sub>2</sub>TMeP e ZnTMeP) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de otite de cães e em cepas padrão. Para isso, inicialmente foi realizado um estudo retrospectivo nos arquivos do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, no período de 2000 a 2018, a fim de determinar os gêneros bacterianos mais frequentemente isoladas de cães com otite. Os resultados deste estudo indicaram a predominância dos gêneros *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp. Assim, isolados clínicos e cepas padrão desses gêneros bacterianos foram utilizados nos ensaios de atividade antibacteriana. Para isso, uma dose não citotóxica das porfirinas, observada em células MDCK (5µM para H<sub>2</sub>TMeP e ZnTMeP) foi incubada com uma concentração fixa de cada uma das bactérias selecionadas (aproximadamente 1x10<sup>4</sup> UFC/mL), e expostas à luz artificial (25 mW/cm<sup>2</sup>) por 0, 30, 60 e 90 min para a fotoativação dos compostos. Após a exposição à luz, 10µL da solução de bactérias Gram-positivas e 50 µL da solução de Gram-negativas foram semeadas e incubadas por 24 horas a 37°C. No dia seguinte, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia. *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa foram inativados após 30 min de exposição a luz por ambas porfirinas. Para as bactérias Gram-negativas, a inativação ocorreu após 60 min de fotoativação utilizando a porfirina H<sub>2</sub>TMeP e 90 minutos com a porfirina ZnTMeP. Além disso, comprovou-se através da utilização de sequestradores de espécies reativas de oxigênio, que a ação dessas porfirinas provavelmente ocorreu pela produção de oxigênio singlete. Os resultados demonstram que as porfirinas tetra-catiônicas H<sub>2</sub>TMeP e ZnTMeP possuem atividade bactericida frente às principais bactérias isoladas de otite de cães, e podem ser promissoras opções para serem empregadas como alternativa de controle e tratamento em casos de otites com etiologia bacteriana resistente aos antimicrobianos convencionais.

**Palavras chave:** porfirinas; terapia fotodinâmica; bactéria; resistência antimicrobiana; otite.

## ABSTRACT

### ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TETRA-CATIONIC PORPHYRINS AGAINST ISOLATED BACTERIA FROM CANINE OTITIS

AUTHOR: Marlane Geribone Seeger  
ADVISOR: Juliana Felipetto Cargnelutti

Canine otitis externa is a multifactorial disease commonly found in veterinary practice and it is estimated to affect up to 20% of dogs. The most important bacterial agents considered pathogens as a cause of otitis externa in dogs are *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* and *Proteus* sp. Bacteria resistant to traditional antimicrobials increasingly in cases of canine otitis, so the challenges are fight against these resistant bacteria. Porphyrins are photosensitizing molecules capable of interacting with light in order to generate reactive oxygen species that have the ability to alter structures and functions of cells and microorganisms, causing apoptosis and inactivation. Photodynamic therapy is a method that can be applied in many areas, such as the elimination of microorganisms in fluids and contaminated solutions, surfaces and materials, as well as in infections, especially caused by antimicrobial resistant bacteria. The objective of this study was to identify the most frequently isolated bacteria from ear swab cultures of dogs with otitis in the central region of Rio Grande do Sul state and to evaluate the antibacterial activity of two tetra-cationic metalloporphyrins (H<sub>2</sub>TMeP and ZnTMeP) in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from dog otitis and standard strains. For this, initially a survey of the genera of bacteria most frequently isolated from these cases was performed. The most frequently isolated genera of bacteria were *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. and *Proteus* sp. Antibacterial activity assays were performed by incubating a non-cytotoxic dose of porphyrins observed in MDCK cells (5 μM to H<sub>2</sub>TMeP and ZnTMeP) against a fixed concentration of each of the selected bacteria, approximately 1x10<sup>4</sup> CFU / mL, and exposing this solution to artificial light (25 mW / cm<sup>2</sup>) for 0, 30, 60 and 90 min for porphyrin photoactivation. After light exposure, 10 μL of Gram-positive bacteria solution and 50 μL of Gram-negative solution were seeded and incubated for 24 hours at 37 °C. The following day, the colony forming units were counted. Coagulase-positive staphylococci and coagulase-negative were inactivated after 30 min of light exposure. For Gram-negative bacteria, inactivation occurred after 60 min of photoactivation using H<sub>2</sub>TMeP and 90 minutes by ZnTMeP. In addition, it has been proven through the use of reactive oxygen species scavengers that the action of these porphyrins probably occurred by the production of singlet oxygen. The results show that ZnTMeP and H<sub>2</sub>TMeP tetra-cationic porphyrins have bactericidal activity against the main bacteria isolated from dog otitis, and may be promising options to be used as alternative control and treatment of clinical otitis with bacterial etiology resistant to conventional antimicrobials.

**Key words:** porphyrins; photodynamic therapy; bacteria; antimicrobial resistant; otitis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de resistência aos antibióticos .....	15
Figura 2 – Representação da rota sintética para as porfirinas H <sub>2</sub> TMeP e ZnTMeP .....	19
Figura 3 – Fig 1. Synthetic route representation for H <sub>2</sub> TMeP and ZnTMeP porphyrins used in this study.....	43
Figura 4 – Fig 2. Cell cytotoxicity test (MTT) with ZnTMeP and H <sub>2</sub> TMeP porphyrins in MDCK cells.....	44
Figura 5 – Fig 3. Antimicrobial activity of porphyrin assays.....	45
Figura 6 – Fig 4. Antimicrobial activity of porphyrin H <sub>2</sub> TMeP (5 µM) and ZnTMeP (5 µM) against CPS, CPN, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Proteus mirabilis</i> .....	46
Figura 7 – Fig 5. Antimicrobial activity of porphyrin H <sub>2</sub> TMeP (5 µM) and ZnTMeP (5 µM) against <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25853) and <i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 29906).....	47

## LISTA DE TABELAS

Table 1 – The most prevalent bacteria in dogs with otitis identified in the archives from 2000 to 2018, that were resistant to one or more antibiotics from different classes.....	41
Table 2 – CFUs values for tetra-cationic porphyrins (H <sub>2</sub> TMeP, ZnTMeP) without and with ROS scavengers, at light irradiation conditions (30 min to coagulase-positive staphylococci and 90 min to <i>Proteus mirabilis</i> ) .....	42



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1 OTITE CANINA .....	11
2.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	13
2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA .....	15
2.4 PORFIRINAS .....	18
2.5 SEQUESTRADORES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	20
<b>3 ARTIGO (Conforme normas da revista Journal of Applied Microbiology)</b> .....	<b>22</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>22</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>22</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>25</b>
<b>RESULTS</b> .....	<b>29</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERECES</b> .....	<b>35</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A otite externa canina é uma doença multifatorial, comumente identificada na prática veterinária e estima-se que afete entre 5% e 20% dos cães (ROUGIER, 2005). A enfermidade tem diversos fatores envolvidos no seu desenvolvimento, tais como fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores primários são capazes de iniciar a inflamação em ouvido, tais como dermatite atópica e hipersensibilidade alimentar (PENNA, 2009). Os fatores predisponentes são aqueles que tornam a orelha mais susceptível à inflamação que foi iniciada por fatores primários, mas que por si mesmos não provocam otite (ROSYCHUK & LUTTGEN, 2004). Os fatores perpetuantes ou persistentes são responsáveis pela continuação da resposta inflamatória. A doença geralmente ocorre como uma complicação secundária de fatores primários, que iniciam um processo inflamatório no interior das orelhas (PENNA, 2009).

Os gêneros bacterianos considerados patógenos mais importantes como causa de otite externa em cães são *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. e *Escherichia coli*, além da levedura *Malassezia* spp. (MALAYERI et al., 2010; MARTINO et al., 2016). *Staphylococcus* spp. têm alta frequência de conjugação, que compreende o processo de transferência de material genético, e constantemente adquirem plasmídeos contendo genes que codificam a resistência antimicrobiana (MALIK et al., 2005). *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno bacteriano oportunista, que pode ser encontrado em vários ambientes e está se tornando cada vez mais importante devido ao seu perfil de resistência aos antibióticos (MEKIC' et al., 2011).

O uso indevido e excessivo de antimicrobianos gera pressões evolutivas seletivas que aumentam a chance de sobrevivência de bactérias resistentes aos fármacos antimicrobianos, com isso, o tratamento de infecções bacterianas comuns tem se tornado um desafio à clínica médica e veterinária (SHIN & PARK, 2018). Assim, com o estabelecimento da resistência antimicrobiana, cada vez mais tem se buscado por métodos alternativos capazes de eliminar os agentes infecciosos (TASLI et al., 2018). Nesse cenário, o estudo das porfirinas tem se destacado como terapia no combate às infecções bacterianas (TASLI et al., 2018; BRANCO et al., 2018).

As porfirinas são moléculas fotossensibilizadoras que, quando irradiadas pela luz, absorvem energia e geram espécies reativas de oxigênio (ALVES, 2014). A terapia fotodinâmica é um método aplicado às diversas áreas da saúde e tem como base a ação de um composto fotossensível que, quando ativado por diferentes comprimentos de onda de luz, produz espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ser radicais livres e/ou oxigênio

singlete ( $^1\text{O}_2$ ), e que são capazes de induzir a apoptose e/ou morte celular (MACHADO, 2000). Além disso, foto-oxidam as proteínas, lipídeos e DNA, inativando ou alterando diversas moléculas celulares (CASTEEL et al., 2004).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana vem sendo reconhecida como uma alternativa muito promissora ao tratamento com antimicrobianos, especialmente em infecções localizadas (ALMEIDA et al., 2014). Pesquisas demonstraram sua utilização no combate ao herpesvírus simplex tipo 1, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo eficaz no tratamento de pessoas com lesões orais (RAMALHO et al. 2015).

O efeito dessa terapia é capaz de inativar células bacterianas sem induzir a resistência em resposta ao tratamento, devido ao modo de ação e ao tipo de alvos bioquímicos (TAVARES, et al. 2010) e devido à irradiação local, não afeta a microflora normal do paciente de outras regiões do organismo, ao contrário dos fármacos antimicrobianos de ação sistêmica (MEEROVICH et al., 2018).

No presente trabalho, objetivou-se contribuir para o desenvolvimento de métodos de inativação de bactérias resistentes aos antimicrobianos tradicionais, isoladas de cães com otite empregando o uso de terapia fotodinâmica, através da investigação da atividade antimicrobiana de porfirinas tetra-catiônicas ( $\text{H}_2\text{TMeP}$  e  $\text{ZnTMeP}$ ) e determinação do seu mecanismo de ação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 OTITE CANINA

A otite externa canina é uma doença multifatorial, comumente encontrada na prática veterinária, especialmente na clínica de pequenos animais. A enfermidade tem diversos fatores envolvidos no seu desenvolvimento, tais como fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores primários são capazes de iniciar a inflamação no ouvido, incluindo a dermatite atópica, a hipersensibilidade alimentar, a presença de corpos estranhos, microorganismos e ectoparasitas, bem como doenças metabólicas, anormalidades de queratinização e as doenças autoimunes (PENNA, 2009). Os fatores predisponentes são aqueles que tornam a orelha mais susceptível à inflamação que foi iniciada por fatores primários, mas que por si mesmos não provocam otite, tais como temperatura ambiental elevada, umidade e erros no processo de limpeza das orelhas (ROSYCHUK & LUTTGEM, 2004). Os fatores perpetuantes ou persistentes são responsáveis pela continuação da resposta inflamatória. Infecções bacterianas e fúngicas são os exemplos mais comuns (BIRCHARD & SHERDING; 2003).

Os sinais clínicos mais comuns observados em cães com otite são a presença de exsudato, eritema, edema, odor desagradável, dor e prurido (ROSYCHUK & LUTTGEN, 2004). Os micro-organismos pertencentes à flora microbiana normal da área auricular podem se tornar patogênicos quando as condições ambientais e causas primárias são ideais para expressar seus fatores de virulência (MARTINO et al., 2016).

Os gêneros bacterianos considerados patógenos mais importantes como causa de otite externa em cães são *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. e *Escherichia coli*, além da levedura *Malassezia* sp. (MALAYERI et al., 2010; MARTINO et al., 2016). A maioria das espécies de *Staphylococcus* são comensais da pele e mucosas, e transitórias no trato digestivo de animais e humanos (QUINN et al., 2011). Os membros deste gênero são frequentemente encontrados em cães hígidos e doentes, produzindo uma variedade de infecções, incluindo bacteremia, conjuntivite, pneumonia, abscessos, pioderma e otite externa (LILENBAUM et al., 2000).

Dentre as espécies de *Staphylococcus* comumente patogênicas destacam-se *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), incluindo: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae* e *S. delphini* (DEVRIESE et al., 2005), sendo que *Staphylococcus intermedius* é o mais frequentemente isolado em cães (LILENBAUM et al., 2000; MALAYERI et al., 2010). *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), constituem um grupo importante da microflora normal de seres humanos, cães e gatos, e são considerados importantes patógenos oportunistas nessas espécies. As espécies de SCN mais comumente encontradas são *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* (LILENBAUM et al., 2000).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* têm alta frequência de conjugação e constantemente adquirem plasmídeos contendo genes que codificam a resistência antimicrobiana (SCHWARZ & NOBLE, 1999). Este fato exige que o conhecimento de seus padrões de resistência aos antimicrobianos requeira uma atualização continuada. Tratamentos empíricos sem o auxílio de resultados de testes de suscetibilidade antimicrobiana podem resultar em falha terapêutica e seleção de cepas multirresistentes (MALIK et al., 2005).

As bactérias Gram-negativas mais comumente isoladas de otite externa canina são *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (BUDGEN, 2013). *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno bacteriano oportunista, que pode ser encontrado em vários ambientes e está se tornando cada vez mais importante devido à sua resistência aos antimicrobianos tradicionais e à sua capacidade de causar infecções graves em animais e seres humanos. A otite externa crônica em cães é frequentemente associada a *P. aeruginosa* (MEKIC' et al., 2011). As bactérias

*Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli* são geralmente encontradas em casos crônicos da doença que não respondem adequadamente ao tratamento (FRASER, 1965). Estudos indicam que *Proteus* sp. e *Pseudomonas* sp. não iniciam a inflamação, porém são os principais responsáveis pela contaminação das lesões primárias do ouvido e maior incidência em cães que possuíam concomitantemente otite e doença clínica da pele (FRASER, 1965).

O diagnóstico da otite canina é baseado na anamnese, exame clínico/otoscopia, citologia auricular, cultura e antibiograma, biopsia e radiografia (BOJRAB & CONSTANTINESCU, 2005). O tratamento bem-sucedido das otites externas requer identificação e eliminação de todos os fatores causais. Por isso, o indicado é a realização da cultura microbiológica seguida do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, a fim de direcionar a escolha da droga mais adequada para o tratamento da infecção e evitar o surgimento de cepas de bactérias resistentes aos fármacos atualmente disponíveis (LILENBAUM et al., 2000).

Muitos organismos variam na suscetibilidade às diferentes classes de antimicrobianos. Algumas cepas se tornam resistentes após um amplo uso por um longo período de tempo, ou após excessivo uso de uma mesma classe de medicamento em um curto período de tempo (BLUE & WOOLEY, 1977; LILENBAUM et al., 2000). O desconhecimento e o uso indiscriminado de antimicrobianos favorecem o surgimento e a seleção das cepas resistentes.

## 2.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A descoberta da penicilina em 1928 causou uma redução significativa nas taxas de mortalidade em todos os continentes através do uso de antibióticos (LOBANOVSKA & PILLA, 2017). Na atualidade, os antimicrobianos são amplamente utilizados em medicina humana e veterinária no tratamento de infecções pelos diferentes agentes microbianos. O uso anual de antimicrobianos foi estimado entre 100.000 e 200.000 toneladas no mundo e, na Europa, 2/3 destes fármacos são empregados em medicina humana e 1/3 são de aplicação em medicina veterinária (EZZARIAI et al., 2018).

A excessiva utilização de antimicrobianos é considerada uma das principais causas da evolução da resistência (EZZARIAI et al., 2018; SHIN & PARK, 2018; HAMBLIN & ABRAHAMSE, 2019). Estudos revelaram que as indicações de tratamento, a escolha do agente e a duração da antibioticoterapia são inadequadas em 30% a 50% dos casos (ASLAM et al., 2018).

O uso indevido e excessivo de antimicrobianos gera pressões evolutivas seletivas que aumentam a chance de sobrevivência de bactérias resistentes aos fármacos. O uso efetivo de

um agente antimicrobiano é prejudicado devido à possível tolerância ou resistência desenvolvida desde o início do tratamento em que esse composto é utilizado, colocando os indivíduos em risco de serem infectados por bactérias resistentes, tornando as terapias antimicrobianas ineficazes e estabelecendo-se como uma séria ameaça à saúde pública (SHIN & PARK, 2018).

Além disso, a uso inadequado desses fármacos inclui a sua utilização no tratamento de infecções em animais, o uso de sub-doses terapêuticas em animais saudáveis, a sua utilização na profilaxia de determinadas enfermidades e como promotores do crescimento fornecidos na alimentação e na água (O'NEILL, 2016). Segundo Aslam et al. (2018) estima-se que cerca de 80% dos antibióticos vendidos nos Estados Unidos são apenas para uso como suplementos de crescimento e para controlar infecções em animais.

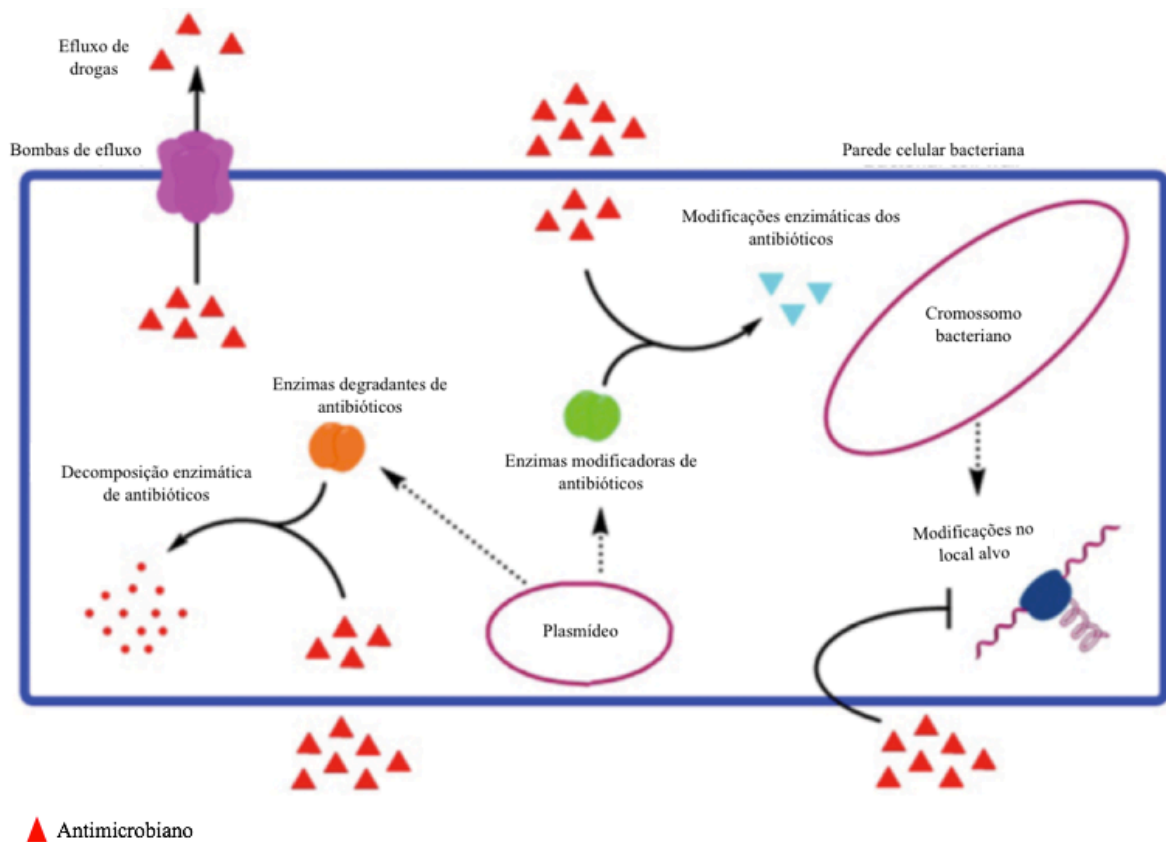
A resistência aos agentes antimicrobianos pode ocorrer com os fármacos usados para tratar infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias. Vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos podem direcionar ao desenvolvimento da resistência. A resistência aos antimicrobianos está relacionada à capacidade de uma bactéria sobreviver mesmo em contato com produtos bacteriostáticos ou bactericidas, sendo esta capacidade de sobrevivência dependente da seleção natural de micro-organismos que possuem determinados genes de resistência (LEVY, 2001). Esses genes podem codificar fatores de virulência, os quais resultam em resistência por meio de mecanismos de desativação enzimática e que induzem a modificação ou inativam o antimicrobiano (SILVEIRA et al., 2006; ZACHARY, 2013). A resistência também pode ocorrer através do mecanismo de alteração de sítios de ligação do antimicrobiano (BLAIR et al., 2015), por alterações da via metabólica, e por redução do acúmulo de antimicrobianos no interior da célula bacteriana (ZACHARY, 2013), bem como promover a redução da permeabilidade da membrana ao fármaco e/ou aumento do seu fluxo por bombas de efluxo da membrana (Figura 1) (SILVEIRA et al., 2006; ZACHARY, 2013; BLAIR et al., 2015; ASLAM et al., 2018).

Com o estabelecimento da resistência antimicrobiana, os desafios estão voltados ao combate às bactérias resistentes. A descoberta e identificação de novos antibióticos não ocorre na mesma velocidade de aparecimento de patógenos resistentes. As pesquisas têm falhado no desenvolvimento ou descoberta de novos antibióticos, ocorrendo apenas a produção de novas moléculas que geralmente são uma extensão das classes atuais de medicamentos (BROOKS & BROOKS, 2014).

Estratégias múltiplas devem ser adotadas para enfrentar esse problema, e é imprescindível uma educação constante, visando a conscientização de estudantes de medicina,

médicos, farmacêuticos e médicos veterinários, em relação ao uso de drogas antimicrobianas. Além disso, devem ser implementados regulamentos que exijam um monitoramento rigoroso do uso de antibióticos. Além dessas abordagens, cada vez mais deve-se priorizar pela busca por métodos alternativos capazes de neutralizar e/ou eliminar os agentes infecciosos (TASLI et al., 2018). Alternativas aos antibióticos, como probióticos, terapia fotodinâmica e bacteriófagos, podem ajudar a diminuir o número de patógenos resistentes (DAI et al., 2009).

Figura 1 - Mecanismos de resistência a antibióticos



Fonte: Adaptado de ASLAM (2018).

### 2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica, tem como base a ação de um composto fotossensível que quando ativado por diferentes comprimentos de onda de luz, produz espécies reativas de oxigênio (EROS) que são capazes de induzir a apoptose das células (MACHADO, 2000) ou foto-oxidar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, inativando ou alterando diversas moléculas celulares (CASTEEL et al., 2004).

A terapia fotodinâmica é um método aplicado às diversas áreas da saúde, como no tratamento de tumores, desde a profilaxia antes e após remoção cirúrgica do tumor, na degeneração macular da retina, psoríase, arteriosclerose, infecções bacterianas e virais, dentre outras patologias (SIMPLÍCIO et al., 2002). Além disso, tem sido utilizada na inativação de micro-organismos em soluções/fluidos e superfícies (BONNETT, 2000; CARVALHO et al., 2007).

Este tipo de terapia pode ser dividida em duas categorias de acordo com o método de aplicação: terapia direta, sem a administração de um fotossensibilizador, sendo realizada apenas pela ação de uma fonte de luz (BONNETT, 1995) e a terapia indireta, que envolve dois componentes não tóxicos (o fotossensibilizador e o oxigênio molecular) e uma fonte de luz. Neste caso, o composto fotossensibilizador é administrado, geralmente, diretamente na lesão (tumores, lesões inflamatórias ou infecciosas) e, em seguida é irradiado para gerar as EROS que irão interagir com moléculas orgânicas, alterando estruturas e/ou funções celulares que resultam na morte e/ou inativação celular (BECHET et al., 2008).

A luz visível que é utilizada para excitar o fotossensibilizador tem comprimentos de onda específicos que coincidem com o comprimento de onda de absorção máxima do fotossensibilizador (AMOS-TAUTUA et al., 2019). Desta forma, quando ativado, ele transfere energia da luz para o oxigênio molecular resultando na formação de EROS que destroem as células alvo (ALVES, 2014). As reações ocorrem no local em que o fotossensibilizador absorve a luz, assim as respostas biológicas ao fotossensibilizador ocorrem apenas nas áreas em que o tecido foi exposto à irradiação (DOLMANS et al., 2003).

A inativação fotodinâmica baseia-se na produção de ROS, que podem ser radicais livres e/ou oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ). Nas reações, o fotossensibilizador é ativado para um estado singleto excitado ( $S_1$ ). As moléculas nesse estado decaem rapidamente de volta ao estado fundamental ( $S_0$ ), com a emissão de luz (fluorescência) ou calor, ou para o estado tripleto ( $T_1$ ). O fotossensibilizador, no estado tripleto excitado ( $T_1$ ), pode decair para o estado fundamental por fosforescência ou agir nas seguintes reações: reação do tipo I, o fotossensibilizador excitado no estado tripleto ( $T_1$ ) reage diretamente com o substrato ( $^3\text{O}_2$ ), formando espécies reativas de oxigênio, tais como os ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio; e na reação do tipo II, o fotossensibilizador excitado no estado tripleto ( $T_1$ ), transfere energia diretamente para o oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), originando oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ). O  $^1\text{O}_2$  é extremamente reativo podendo interagir com um grande número de substratos biológicos, induzindo, assim, dano oxidativo e morte celular (ALVES, 2014).



O  $^1\text{O}_2$  é o principal agente citotóxico, um eletrófilo forte que reage rapidamente com as ligações carbono-carbono insaturadas, nucleófilos neutros, tais como, sulfuretos e aminas, bem como ânions, podendo reagir com um número elevado de moléculas biológicas, como os triglicerídeos, colesterol, fosfolípidos, aminoácidos, metionina, bases nitrogenadas, entre outros (DEROSA & CRUTCHLEY, 2002).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana vem sendo reconhecida como uma alternativa muito promissora ao tratamento com antimicrobianos, especialmente em infecções localizadas (ALMEIDA et al., 2014). O efeito dessa terapia é capaz de inativar células bacterianas sem induzir o desenvolvimento de resistência em resposta ao tratamento, e graças à irradiação local, não afeta a microflora normal de outros órgãos do paciente, ao contrário dos fármacos antimicrobianos sistêmicos (MEEROVICH et al., 2018).

Originalmente essa técnica foi utilizada no tratamento do câncer, porém nas últimas três décadas, um número crescente de estudos sobre terapia fotodinâmica antimicrobiana foram publicados, mostrando que essa terapia é eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, fungos e parasitas (ALMEIDA et al., 2015). A principal vantagem desta tecnologia sobre os fármacos antimicrobianos é a ação multialvo e não há surgimento de resistência bacteriana (ALVES et al., 2015).

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem diferenças fundamentais em sua estrutura e, conseqüentemente, na sensibilidade aos efeitos dos fármacos. A parede celular das bactérias Gram-positivas tem um grau de porosidade relativamente alto. Portanto, várias macromoléculas como glicopeptídeos e polissacarídeos, com peso molecular de até 60 kDa podem facilmente se difundir através da parede celular. Dessa forma, não é uma barreira para a penetração da maioria dos fotossensibilizadores, cujo peso molecular geralmente não excede 1,5-1,8 kDa (MEEROVICH et al., 2018).

A parede celular das bactérias Gram-negativas tem um elemento estrutural adicional, a membrana externa, que possui 10-15nm de espessura localizando-se externamente à rede de peptidoglicano. Tem uma composição muito heterogênea, com proteínas com função de porina, trímeros de lipopolissacarídeos e lipoproteínas que criam uma pseudo-superfície externa de cargas negativas fortemente compactadas. Esse sistema altamente organizado impede a penetração de grandes moléculas e facilita a resistência aos diferentes compostos químicos. Compostos hidrofílicos com uma massa molecular abaixo de 0,6-0,7 kDa podem se difundir facilmente através dos poros. Somente um fotossensibilizador policatiônico com um tamanho bastante pequeno da molécula e peso molecular interage efetivamente com bactérias Gram-negativas, inativando-as. Para garantir a inativação adequada das bactérias, é necessário usar

altas concentrações de fotossensibilizadores durante a sensibilização (MEEROVICH et al., 2018).

Devido aos problemas crescentes de resistência bacteriana aos antimicrobianos estarem cada vez mais comuns na rotina clínica médica e veterinária, há a necessidade de pesquisar métodos alternativos para o controle e terapia das infecções bacterianas. Desta forma, a terapia fotodinâmica pode ser um auxiliar no combate aos patógenos bacterianos resistentes, potencializando o efeito e/ou a eficácia antimicrobiana, ou, ainda, sendo utilizado como única forma de tratamento às infecções bacterianas superficiais.

## 2.4 PORFIRINAS

As porfirinas são compostos macrociclos tetrapirrólicos composto de 4 anéis heterocíclicos (A, B, C, D) ligados entre si por grupos de meteno (-CH=), aleatoriamente denominados  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (RIMINGTON & KENNEDY, 1962). São um grande grupo de pigmentos intensamente coloridos cristalinos fluorescentes de origem natural ou sintética (AMOS-TAUTUA et al., 2019). As porfirinas podem estar associadas aos íons metálicos, sendo chamadas de metaloporfirinas (Figura 2).

As porfirinas são moléculas fotossensibilizadoras que, quando irradiadas pela luz, absorvem energia e geram espécies reativas de oxigênio (ALVES, 2014). Elas estão envolvidas em muitos processos biológicos nos organismos vivos, incluindo transporte de oxigênio e fotossíntese (MONDAL & BERA, 2014).

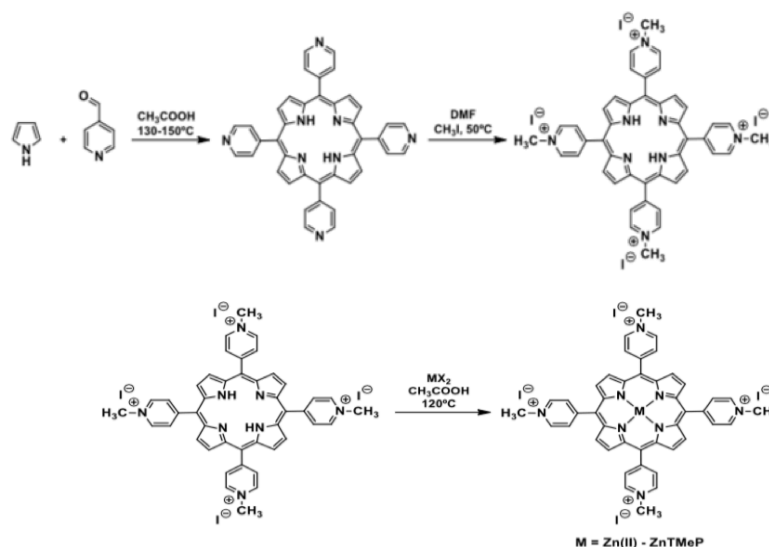
Estudos evidenciaram que as porfirinas catiônicas são mais eficientes em comparação as aniônicas ou neutras contra bactérias, principalmente bactérias Gram-negativas (MERCHAT et al., 1996; SIMÕES et al., 2016; MARCIEL et al., 2018; AMOS-TAUTUA et al., 2019). Foi demonstrado que as porfirinas catiônicas podem atuar contra os dois tipos de bactérias, provavelmente devido a uma ação dupla: rompimento da parede celular bacteriana e, posteriormente, fotossensibilização da célula (CARVALHO et al., 2007)

As bactérias Gram-positivas possuem uma membrana citoplasmática cercada por uma parede celular relativamente porosa composta de peptidoglicano e ácido lipoteicóico que permite a passagem dos fotossensibilizadores (DAI et al., 2009). Dessa forma, a inativação dessas bactérias pode ser feita através de fotossensibilizadores neutros, aniônicos e catiônicos (DAI et al., 2009; AMOS-TAUTUA et al., 2019).

A parede celular da bactéria Gram-negativa contém lipopolissacarídeo (LPS) com carga negativa, o que dificulta a permeabilidade de porfirinas neutras ou aniônicas do ambiente

externo para a célula bacteriana. No entanto, as porfirinas catiônicas interagem efetivamente com essas superfícies carregadas negativamente da parede celular de bactérias Gram-negativas (AMOS-TAUTUA et al., 2019).

Figura 2 - Representação da rota sintética para as porfirinas  $H_2TMeP$  e  $ZnTMeP$



Fonte: Gentilmente cedido por Prof. Bernardo Iglesias.

O fotossensibilizador neutro e aniônico pode inativar de maneira eficiente as bactérias Gram-positivas, porque esses tipos de fotossensibilizadores podem atravessar facilmente a parede celular. No entanto, esses fotossensibilizadores são ineficientes contra bactérias Gram-negativas (DEMIDOVA et al., 2005).

As porfirinas catiônicas podem ser obtidas pela inserção de substituintes carregados positivamente nas posições periféricas do anel porfirínico (SOBOTTA et al., 2019). O número de cargas positivas e sua distribuição no núcleo do fotossensibilizador tem um papel importante na eficiência da terapia fotodinâmica (SIMÕES et al., 2016). O número de cargas aumenta o caráter anfífilo do fotossensibilizador, a capacidade de promover a interação entre moléculas que apresentam polaridade diferentes, e consequentemente, sua afinidade por bactérias, promovendo seu acúmulo nas células, o que geralmente é acompanhado por um aumento na atividade fotocitotóxica (SIMÕES et al., 2016; MARCIEL et al., 2018).

Os compostos catiônicos são absorvidos pela chamada via de captação auto-promovida, o aumento no número de cargas aumenta a afinidade do fotossensibilizador com as bactérias, o

que aumenta a sua retenção. As moléculas catiônicas têm uma afinidade de 2 a 4 ordens de magnitude mais alta aos locais de ligação na superfície das moléculas de LPS de bactérias Gram-negativas do que os cátions divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , e eles substituem competitivamente esses cátions (SIMÕES et al., 2016). O deslocamento de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , leva a uma reorganização da estrutura da membrana externa e permeabilização da membrana externa (EHRENBERG et al., 1985). O dano inicial favorece a penetração do fotossensibilizador, especialmente em bactérias Gram-negativas, aumentando a eficiência da fotoinativação (DAI et al., 2009).

## 2.5 SEQUESTRADORES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Espécies reativas de oxigênio são formadas em organismos vivos como co-produtos em reações bioquímicas. Assim, as bactérias desenvolveram mecanismos de defesa contra essas espécies, como as enzimas glutathione peroxidase e a catalase. Porém as EROS podem facilmente superar a atividade dessas enzimas. Algumas EROS, mesmo em baixa quantidade, são problemáticas para a autodefesa de bactérias e levam à sua morte (VATANSEVE et al., 2013).

As principais EROS distribuem-se em dois grupos, as radicalares: hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) e alcoxila ( $\text{RO}\cdot$ ); e as não-radicalares: oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ). Em lesões teciduais causadas por traumas, radiações, infecções, toxinas, hipóxia, e exercícios extremos ocorre alta produção de ROS devido a um conjunto de processos, como o aumento de enzimas envolvidas na formação de radicais, a ativação da fagocitose, liberação de ferro e cobre ou uma interrupção da cadeia transportadora de elétrons (ROCK et al., 1996).

Baixos níveis de EROS, como superóxido e peróxido de hidrogênio, são produzidos como consequência da respiração e metabolismo aeróbicos, mas mecanismos sensoriais combinados com defesas antioxidantes constitutivas e induzíveis, superóxido dismutase (SOD) e catalase, evoluíram para neutralizar amplamente esses EROS sem a ocorrência de danos. No entanto, grandes concentrações de superóxido e peróxido de hidrogênio podem sobrecarregar essas defesas, e pequenas quantidades de EROS contra as quais os organismos não têm defesas adequadas, como radical hidroxila e oxigênio singleto pode rapidamente ser fatal para os micro-organismos (VATANSEVE et al., 2013).

Vários métodos foram empregados para distinguir entre os diferentes tipos de EROS produzidas na terapia fotodinâmica. O método mais usado tem sido a utilização de diferentes sequestradores. Sequestradores são moléculas que podem ser adicionadas à suspensão microbiana que contém o fotossensibilizador durante a terapia e esses podem consumir ou desativar as ROS produzidas, diminuindo assim a extensão da inativação microbiana (MARTIN & LOGSDON, 1987; RYWKIN et al., 1992; VATANSEVE et al., 2013). Desta forma, pode-se estimar qual ROS está sendo produzido e, portanto, o mecanismo de ação do fotossensibilizador.

A azida sódica tem sido usada como um desativador seletivo de oxigênio singleto, removendo fisicamente a energia do estado excitado e tem sido usada para reduzir a morte microbiana em vários estudos de terapia fotodinâmica (MAISCH et al., 2005). Outros inibidores para oxigênio singleto incluem histidina e ácido ascórbico, e para o radical superóxido pode ser utilizado iodeto de potássio (GUTERRES et al., 2019). Os sequestradores que são usados para radical hidroxila incluem manitol (RYWKIN et al., 1992) e dimetilsulfóxido (MARTIN & LOGSDON, 1987).

1 **3 ARTIGO** (Conforme normas da revista Journal of Applied Microbiology)

2  
3 **Tetra-cationic porphyrins are effective against bacteria from canine otitis**

4  
5 **M.G. Seeger<sup>1</sup>, B.A. Iglesias<sup>3</sup>, L.T. Gressler<sup>4</sup>, S.A. Botton<sup>2</sup>, J.F. Cargnelutti<sup>2\*</sup>**

6 <sup>1</sup> Programa de Residência em Área Profissional da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa  
7 Maria, RS, Brasil.

8 <sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa  
9 Maria, RS, Brasil.

10 <sup>3</sup> Departamento de Química, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

11 <sup>4</sup>Instituto Federal Farroupilha, Frederico Westfallen, RS, Brasil.

12 \*Corresponding author: jucargnelutti@gmail.com

13  
14  
15 **ABSTRACT**

16  
17 **Aims:** Antimicrobial resistant bacteria have been frequently isolated from canine otitis externa.  
18 Photodynamic therapy using porphyrins as photosensitizing molecules is an alternative to  
19 combat microorganisms in localized infections. We aimed to evaluate the antibacterial activity  
20 of tetra-cationic metalloporphyrin (H<sub>2</sub>TMeP, ZnTMeP) against Gram-positive and -negative  
21 bacteria isolated from dog otitis, and its action mechanism.

22 **Methods and Results:** Two Gram-positive and two Gram-negative bacteria more frequently  
23 detected in cases of canine otitis (Coagulase-positive and -negative staphylococci [CPS and  
24 CNS], *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*) were used in antibacterial activity  
25 assays. The non-cytotoxic dose of both porphyrin was incubated with a fixed concentration of  
26 each bacteria and exposed to artificial light for 0, 30, 60 and 90 min. CPS and CNS were  
27 inactivated after 30 min of light exposure. Gram-negative bacteria were inactivated after 60  
28 min of photoactivation by H<sub>2</sub>TMeP and with 90 min by ZnTMeP. Similar assay was conducted  
29 using ROS scavengers showing that the mechanism for bacterial inactivation is through the  
30 production of singlet oxygen.

31 **Conclusions:** Tetra-cationic porphyrins have antibacterial activity against bacteria isolated from  
32 canine otitis.

33 **Significance and Impact of the Study:** Tetra-cationic porphyrins are promising alternative to  
34 treatment of canine otitis caused by bacteria.

35  
36 **Key-words:** porphyrins; photodynamic therapy; bacteria; antimicrobial resistant; otitis

37  
38 **Introduction**

39  
40 Canine otitis externa is a multifactorial disease commonly found in small animal clinic,  
41 especially in pet care, and is estimated to affect between 5% and 20% of dogs (Rougier 2005).

42 The disease has several factors involved in its development, such as primary, predisposing and

43 perpetuating factors. Primary factors are capable of initiating inflammation in the ear, such as  
44 atopic dermatitis, food hypersensitivity, ectoparasites, metabolic diseases, keratinization  
45 abnormalities and autoimmune diseases (Penna 2009). Predisposing factors are those that make  
46 the ear more susceptible to inflammation that was initiated by primary factors, but that cannot  
47 cause otitis alone (Rosychuk and Luttgen 2004). Perpetuating or persistent factors are  
48 responsible for the continued inflammatory response.

49         The disease usually occurs as a secondary complication of primary factors, which  
50 initiate an inflammatory process inside the ears (Penna 2009). The most common clinical signs  
51 observed in canine otitis are the presence of exudate, erythema, edema, unpleasant smell, pain  
52 and itching (Rosychuk and Luttgen 2004). The most important pathogens causing otitis externa  
53 in dogs are *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp, *Escherichia coli* and  
54 *Malassezia* spp. (Malayeri *et al.* 2010; Martino *et al.* 2016). The most species of  
55 *Staphylococcus* are found in skin and mucous as a commensal and transient in the digestive  
56 tract of animals and humans (Quinn *et al.* 2011). However, the pathogenic species include  
57 coagulase-positive staphylococci (CPS) as *Staph. aureus*, *Staph. pseudintermedius* and *Staph.*  
58 *intermedius* (Devriese *et al.* 2005). Coagulase-negative staphylococci (CNS) constitute an  
59 important group of normal microflora in humans, dogs and cats and they are considered  
60 important opportunistic pathogens in these animal species (Lilenbaum *et al.* 2000).

61         The most common Gram-negative bacteria involved in canine otitis are *Pseudomonas*  
62 *aeruginosa* and *Proteus mirabilis* (Budgen 2013). *Ps. aeruginosa* is an opportunistic pathogen  
63 that can be found in many environments and this microorganism is becoming increasingly  
64 important due to its resistance to traditional antibiotics and its ability to cause serious infections  
65 in humans and animals. Chronic otitis externa in dogs is often associated with *Ps. aeruginosa*  
66 (Mekic' *et al.* 2011) and *Proteus* spp. *Pseudomonas* spp. and *Escherichia coli* are usually found  
67 in chronic cases of canine otitis that do not respond adequately to treatment (Fraser 1965).

68 Studies indicate that *Proteus* spp. and *Pseudomonas* spp. do not initiate inflammation, but are  
69 mainly responsible for the contamination of primary ear injuries and these bacteria have a  
70 higher incidence in dogs with otitis and clinical skin disease (Fraser 1965).

71 To obtain a successful treatment of otitis externa in dogs it is necessary the identification  
72 and elimination of all causal factors. Therefore, it is recommended microbiological culture  
73 followed by antimicrobial susceptibility testing in order to select the appropriate drug for the  
74 treatment and, consequently, to prevent the emergence of bacteria resistant strains to drugs  
75 commercially available (Lilenbaum *et al.* 2000).

76 The susceptibility to different classes of antimicrobials range among the  
77 microorganisms and misuse of antimicrobials further the emergence of resistant strains  
78 (Ezzariai *et al.* 2018; Shin and Park 2018; Hamblin and Abrahamse 2019). The antimicrobial  
79 resistance is related to the ability of bacteria to survive even in contact with bacteriostatic or  
80 bactericidal drugs, and its survival capacity is dependent of natural selection of microorganisms  
81 that carry resistance genes (Levy 2001).

82 Photodynamic therapy (aPDT) is a method applied in some areas of human health. This  
83 therapy can be used to treat tumors, retinal macular degeneration, psoriasis, arteriosclerosis,  
84 bacterial infections, among other conditions (Simplicio *et al.* 2002). In addition, it has been  
85 used to inactivate microorganisms in solutions, fluids and surfaces (Bonnett 2000; Carvalho *et*  
86 *al.*, 2007; Basso *et al.* 2019). PDT is based on the action of a photosensitive compound that it  
87 activated by different wavelengths of light and produces reactive oxygen species (ROS), as free  
88 radicals and/or singlet oxygen (Amos-Tautua *et al.* 2019), that can to induce cell apoptosis  
89 (Machado 2000) or interact with proteins, lipids and DNA, inactivating or altering various cell  
90 molecules (Casteel *et al.* 2004).

91 Porphyrins are photosensitizing molecules that, when irradiated by light, absorb energy  
92 and generate reactive oxygen species (Alves 2014). They are involved in many biological



93 processes in living organisms, including oxygen transport and photosynthesis (Mondal and  
94 Bera 2014). Studies have shown that cationic porphyrins are more efficient to inactivate  
95 bacteria, especially Gram-negative, compared to anionic or neutral porphyrins (Merchat *et al.*  
96 1996; Simões *et al.* 2016; Marciel *et al.* 2018; Amos-Tautua *et al.* 2019).

97 Antimicrobial aPDT has been recognized as a very promising alternative to  
98 antimicrobial treatment, especially in localized infections (Almeida *et al.* 2014). The most  
99 benefit effect of this therapy is due to inactivate bacterial cells without develop/induce  
100 resistance, as well as it does not to affect the normal microflora of the patient, unlike  
101 antimicrobial drugs of systemic administration (Meerovich *et al.* 2018). Then, the goal of this  
102 study was to evaluate the antimicrobial activity of tetra-cationic porphyrins (H<sub>2</sub>TMeP and  
103 ZnTMeP) against the main bacterial agents isolated from canine otitis and determine its  
104 mechanism of bactericidal action.

105

## 106 **Materials and methods**

107

### 108 **Experimental design**

109

110 This research evaluated the antibacterial activity of two tetra-cationic porphyrins  
111 (H<sub>2</sub>TMeP and ZnTMeP) against the main bacteria isolated from canine otitis externa. Initially,  
112 a retrospective study was carried out in archives of Laboratório de Bacteriologia da  
113 Universidade Federal de Santa Maria (LABAC/UFSM) from 2000 to 2018, to determine the  
114 main bacteria involved in canine otitis and their susceptibility pattern to antimicrobial drugs.  
115 After, the cellular toxicity of the porphyrins was investigated by MTT assay and a non-cytotoxic  
116 concentration of compounds were used *in vitro* antibacterial tests.

117 Gram-positive and Gram-negative bacteria involved in the etiology of canine otitis and  
118 their respective standard strains (ATCC<sup>®</sup>), were incubated with each porphyrin and exposed to  
119 light at different periods (0, 30, 60 and 90 min) or remained in the dark (control without  
120 exposure). The solutions were then seeded in Petri dishes containing culture medium for 24 h  
121 at 37 °C. The antibacterial activity of porphyrins was determined by counting colony-formed  
122 units (CFU) of test samples and compared with controls. The porphyrin mechanism of action  
123 was determined by the addition of scavengers of reactive oxygen species in the antibacterial  
124 assays.

125

#### 126 **Microorganisms and culture conditions**

127

128 For the antimicrobial studies, it was used two Gram-positive and two Gram-negative  
129 bacteria selected according the most frequently agents involved in canine otitis that were  
130 identified in retrospective study performed in archives of LABAC/UFSM between 2000 and  
131 2018 (Table 1). Then, all assays were performed using four bacteria species isolated from dogs  
132 with otitis and four American Type Culture Collection (ATCC) strains: *Proteus mirabilis* (SBP  
133 65/18 and ATCC 29906), *Ps. aeruginosa* (SBP 65/18 and ATCC 25853), CPS (SB 107/08 and  
134 *Staphylococcus aureus* [ATCC 25923]) and CNS (LM 138/19 and *Staphylococcus epidermidis*  
135 [ATCC 12228]). The microorganisms were maintained on culture medium with glycerol and  
136 cooled at -20 °C. To antibacterial assays, the samples were unfrozen, inoculated on Muller  
137 Hinton Infusion agar (MH) and incubated for 24 h.

138

139

140

141

## 142 **Photosensitizers (PS)**

143

144 The meso-tetra-(4-N-metilpiridinium) porphyrin (H<sub>2</sub>TMeP) and metalloporphyrin  
145 (ZnTMeP) were purchased from Sigma-Aldrich (Figure 1). All porphyrins tested in this study  
146 are water soluble and stable in this solution.

147

148

## 149 **Cytotoxicity assay**

150

151 The cytotoxicity of the compounds to canine cells was determined by the MTT assay as  
152 described by Mosmann (1983), in order to conduct future *in vivo* studies. For the MTT assay,  
153 three 96-well plates were prepared with Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK, ATCC®  
154 CCL-34™). After 24h, each porphyrin was added at different concentrations (2, 4, 5, 10, 20,  
155 40 and 80 µM) and the plates incubated in a CO<sub>2</sub> incubator at 5% for 72h. MTT was added  
156 (50µL) and the cells were incubated for 4h in a CO<sub>2</sub> incubator at 5%. After the formation of  
157 violet staining all the supernatant was removed and 200µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) was  
158 added. The reading was performed in a spectrophotometer with a wavelength of 550nm, the  
159 results were analyzed and to each porphyrin, the compound was considered non-toxic when the  
160 cell viability was higher than 80% (Mosmann 1983; Oliveira *et al.* 2018).

161

## 162 **Antibacterial activity of porphyrins assays**

163

164 The antibacterial activity of porphyrins was evaluated against two Gram-positive  
165 bacteria (coagulase-positive staphylococci [CPS] and coagulase-negative staphylococci [CNS])  
166 and two Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*). The isolates  
167 used in the *in vitro* tests were obtained from the laboratory diagnostic routine from ear swabs

168 of dogs with otitis (SBP 65/18, SB 107/08 e LM 138/19). Additionally, one ATCC® strains of  
169 each species were submitted to the same analysis.

170 The tests were performed using approximately  $1 \times 10^4$  CFU/mL assay for all Gram-  
171 positive and Gram-negative bacteria. The bacterial suspension was incubated with the highest  
172 non-cytotoxic concentration of each porphyrin, and then exposed to artificial light for different  
173 periods: 0, 30, 60, and 90 min. After this period, the suspensions were seeded in Petri dishes  
174 containing the bacterial-specific culture medium (MacConkey agar to *Proteus mirabilis*;  
175 Mueller-Hinton agar to CPS, CNS and *Pseudomonas aeruginosa*) and incubated at 37°C for 24  
176 hours. Following that, bacterial colonies were counted to determine the number of colonies  
177 forming units (CFU) after treatment with porphyrins (Figure 3).

178 All procedures were performed in triplicate, and each time replicate had a non-  
179 porphyrin-treated and light-exposed control, and a non-porphyrin-treated control without light  
180 exposure. Artificial light is important for activating porphyrins, then it was used LED strips  
181 containing 25 mW/cm<sup>2</sup>. The distance between the light source and the microtube containing the  
182 bacterial solution and porphyrin was 5 centimeters.

183

#### 184 **Scavengers of reactive oxygen species experiments**

185

186 In order to determine the mechanism involved in the phototoxicity of H<sub>2</sub>TMeP and  
187 ZnTMeP, antibacterial assays using Gram-positive and Gram-negative bacteria were performed  
188 in the presence of specific scavengers of ROS. Initially, it was determined the toxicity of the  
189 compounds/scavengers to the same bacteria used in the porphyrin's assay (CPS, CNS, *Proteus*  
190 *mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*). The ROS scavengers used in the test were dimethyl  
191 sulfoxide (DMSO) and mannitol (to scavenge hydroxyl radical species), ascorbic acid (to  
192 singlet oxygen species) and potassium iodide (superoxide species).

193 In this assay, approximately  $1 \times 10^4$  CFU/mL was used for all Gram-positive and Gram-  
194 negative bacteria. The inoculum was incubated with a solution containing the highest non-  
195 cytotoxic dose of porphyrin and 10 mM of each scavengers (non-cytotoxic scavenger  
196 concentration). After this, each solution was exposed to artificial light for different periods: 0  
197 and 30 min to Gram-positive bacteria; 0 and 90 min to Gram-negative bacteria. Later, the  
198 suspensions were seeded in Petri dishes containing the bacterial-specific culture medium and  
199 incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hours. In the next day, the bacterial colonies were counted to determine  
200 the CFU number after treatment with porphyrins and scavengers. The procedures were  
201 performed in triplicate, and each time replicate had a porphyrin-treated and light-exposed  
202 control and porphyrin-treated control without light exposure.

203

## 204 **Results**

205

206 The retrospective study performed in the laboratory archives from 2000 to 2018 showed  
207 that the most prevalent bacteria in cases of canine otitis were coagulase-positive staphylococci  
208 (CPS), coagulase-negative staphylococci (CNS), *Proteus* sp. and *Pseudomonas* sp. (Table 1)  
209 that were resistant to one or more antibiotics from different classes. Then, one sample of each  
210 bacterial genus was selected to use in antibacterial assays.

211 In the MTT tests performed with MDCK cells, the non-cytotoxic dose chosen to each  
212 porphyrin was  $5 \mu\text{M}$ . The porphyrins,  $\text{H}_2\text{TMeP}$  and  $\text{ZnTMeP}$  promoted cell viability greater  
213 than 80% when these concentrations were used (Figure 2).

214 Initially, all antibacterial assays were performed using samples of bacteria isolated from  
215 dogs with otitis obtained from diagnostic routine of a Laboratório de Bacteriologia of central  
216 region of Rio Grande do Sul, Brazil. aPDT using  $5 \mu\text{M}$  of  $\text{ZnTMeP}$  porphyrin was effective in  
217 completely inactivate CPS (SB 107/08) after 30 min of light exposure, while without

218 irradiation, a reduction in bacterial concentration was not occurred after 90 min of incubation.  
219 Similarly, the use of H<sub>2</sub>TMeP porphyrin at 5µM promoted complete inactivation of CPS (SB  
220 107/08) after 30 min of light exposure. The bacterial concentration obtained without exposure  
221 to light remained similar to control at 0 min of irradiation (Figure 4).

222 Using ZnTMeP or H<sub>2</sub>TMeP porphyrin, the CNS (LM 138/19) was inactivated after 30  
223 min of light exposure, while without irradiation the bacterial concentration was not altered until  
224 90 min (Figure 4).

225 *Pseudomonas aeruginosa* isolate (SBP 65/18) was inactivated after 60 min of light  
226 exposure of the solution containing H<sub>2</sub>TMeP and after 90 min with ZnTMeP. The control  
227 without irradiation light presented a slight decrease in bacteria concentration after 90 min  
228 (Figure 4).

229 H<sub>2</sub>TMeP porphyrin was also efficient to inactivate *Proteus mirabilis* (SBP 65/18),  
230 where the completely inactivation occurred after 60 min of irradiation, whereas ZnTMeP  
231 porphyrin reach the maximal bacteria inactivation only at 90 min of light activation. There was  
232 not significant alteration in bacteria concentration of control solution without light exposure  
233 when tested both porphyrins.

234 Antibacterial assays using standard bacterial strains (*Staph. aureus* [ATCC 25923],  
235 *Staph. epidermidis* [ATCC 12228], *Ps. aeruginosa* [ATCC 25853] and *Pr. mirabilis* [ATCC  
236 29906]) demonstrated similar results to those obtained with bacteria isolates from dogs with  
237 canine otitis (Figure 5).

238 In order to investigate which reactive oxygen species are involved in the photo-  
239 inactivation process, antibacterial assays were carried out adding the reactive oxygen species  
240 scavengers. In the presence of ascorbic acid, porphyrins were unable to inhibit Gram-positive  
241 and Gram-negative bacterial growth (Table 2). These data show that probably the predominant  
242 ROS that is acting in the photo-oxidation process is the species of singlet oxygen. The use of

243 other ROS scavengers (mannitol, DMSO and potassium iodide) did not interfere in bacteria  
244 inactivation. Then, hydroxyl radical and superoxide species probably are ROS not involved in  
245 photo-inactivation of evaluated bacteria.

246

## 247 **Discussion**

248

249 Otitis externa is an important disease of dogs mainly caused by bacteria (Lilenbaum *et*  
250 *al.* 2000), and over the years, the number of antimicrobial-resistant bacteria isolated from ear  
251 conduct is rapidly growing (Martino *et al.* 2016). Therefore, it is necessary the search for new  
252 alternatives to combat/threat this infectious disease. In our study, the main objective was to  
253 determine the most frequently/resistant bacteria isolated from canine otitis in the last years and  
254 investigate an alternative method to treat affected animals. For this, a retrospective analysis was  
255 performed in the archives of Laboratório de Bacteriologia of central region of Rio Grande do  
256 Sul, Brazil. to select all reports of canine otitis samples received between 2000 and 2018. The  
257 results of this investigation show that the most frequent and resistant bacteria isolated from  
258 dogs with otitis were *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., coagulase-positive staphylococci (CPS)  
259 and coagulase-negative staphylococci (CNS) (Table 1). Our findings are consistent with  
260 previous studies where *Staphylococcus* sp. and *Pseudomonas aeruginosa* are the most common  
261 ear pathogen isolated from dogs around the world (Oliveira *et al.* 2008; Penna *et al.* 2010;  
262 Bourély *et al.* 2019). Variabilities between results can be explained by the differences between  
263 sample selection, size and the method of strain collection (Malayeri *et al.* 2010).

264 The establishment of antimicrobial resistance created challenges to fight against  
265 resistant bacteria. Search for alternative methods capable of neutralizing and/or eliminating  
266 infectious agents should be prioritized (Tasli *et al.* 2018). Alternatives to antibiotics, such as

267 probiotics, photodynamic therapy, and bacteriophages, may help decrease the number of  
268 resistant pathogens (Hamblin and Hasan 2004; Aslam *et al.* 2018)

269 *Staphylococcus* spp. are members of the normal flora of the ear, the fact that they were  
270 obtained in pure culture from dogs indicates their importance in the pathogenesis of otitis. CNS  
271 are considered as important opportunistic pathogens in dogs and cats (Lilenbaum *et al.* 1998).  
272 CPS, such as *Staph. intermedius* and *Staph. aureus* as the most frequent staphylococci isolates  
273 in otitis externa of dogs (Kiss *et al.* 1997). Gram-negative bacteria involved in canine otitis  
274 externa are frequently *Ps. aeruginosa*, although *Pr. mirabilis*, or other such as *E. coli*,  
275 *Klebsiella* sp. and *Enterobacter* sp., may occur. Our results indicated that *Pseudomonas* spp.  
276 are the most prevalent bacteria in canine otitis and it was manifested the most resistance against  
277 antimicrobial drugs, similar to observed by Malayeri *et al.* (2010). Malayeri (2010) and co-  
278 workers carried out the identification and analysis of patterns of antimicrobial susceptibility of  
279 bacteria causing otitis externa in dogs and in this study, *Pseudomonas* genus presented the most  
280 resistance against antimicrobial drugs.

281 After to determine the most frequently and important bacteria involved in canine otitis,  
282 we investigated an alternative method of treatment, using the photodynamic therapy (aPDT)  
283 with tetra-cationic porphyrins (H<sub>2</sub>TMeP and ZnTMeP) against Gram-positive and Gram-  
284 negative bacteria. This study also determines the mechanism involved in the phototoxicity of  
285 these porphyrins by use of ROS scavengers.

286 In PDT, it is used a photosensitizer (PS) with desired properties, such as non-toxic effect  
287 in living cells, being only activated with light and having maximal antimicrobial activity in the  
288 broad spectrum (Hamblin and Hasan 2004). PS compounds, as porphyrins, are activated by  
289 irradiation with visible light of wavelength compatible with its absorption spectrum, even  
290 sunlight. Upon light activation, the photosensitizer generates active oxygen species, which can  
291 modify many biological molecules and eventually lead to cell death (Ergaieg *et al.* 2008).



292 At antibacterial assays using two tetra-cationic porphyrins, Gram-positive bacteria and  
293 Gram-negative bacteria were completely inactivated after *in vitro* PDT. Both porphyrins  
294 (H<sub>2</sub>TMeP and ZnTMeP) were able to inactivate both bacteria isolated from clinical samples  
295 and standard strains (ATCC), but the time to completely inactivate these agents was different  
296 between Gram-positive (30 min) and Gram-negative bacteria (60 to 90 min).

297 Gram-positive bacteria are sensitive to photosensitization by many different dyes, while  
298 Gram-negative bacteria are more resistant, being destroyed only after increasing the  
299 permeability of the outer membrane either by pre-treatment with different chemical or by  
300 employing cationic photosensitizers (Ergaieg *et al.* 2008). Earlier studies suggested that the  
301 porphyrin with positive charge favors the binding of the photosensitizer molecule at critical  
302 cellular sites that once damaged by exposure to light cause the loss of cell viability (Jori and  
303 Brown 2004).

304 According to Hamblin (2016), cationic charges as one of the most important attributes  
305 of antimicrobial photosensitizers. Studies reporting that meso-substituted cationic porphyrins,  
306 as used in this study, can inactivate not only Gram-positive (*Enterococcus seriolicida*, *Staph.*  
307 *aureus*) but also Gram-negative bacteria, such as *Vibrio anguillarum* and *E. coli* (Merchat *et*  
308 *al.* 1996). Cationic porphyrins act against both types of bacteria, probably due direct damage in  
309 bacterial cell wall and, subsequently, cell inactivation (Carvalho *et al.* 2007).

310 The genus *Pseudomonas* is the most frequently microorganism involved in canine otitis  
311 externa (Mekic' *et al.* 2011). The antimicrobial-resistant pattern of *Pseudomonas* spp. isolates  
312 showed that this microorganism developed/acquired several mechanisms to survive even in  
313 contact with large-spectrum and very potent antimicrobial drugs (Mekic' *et al.* 2011; Martino  
314 *et al.* 2016). At our assays, *Pseudomonas aeruginosa* (SBP 65/18) recovered from clinical cases  
315 of otitis in dogs, that present resistant to one or more antimicrobial class (not shown), were  
316 more difficult to inactivate by PDT than standard strains (ATCC). However, even though

317 exposure to light needed to be prolonged, both porphyrins were able to inactivate this resistant  
318 bacterium opening the possibility of using this therapy in cases unresponsive to conventional  
319 antibiotic treatment.

320         The microbiological experiments showed that there was a significant difference between  
321 the inhibition of porphyrins under light and dark conditions. All porphyrins exhibited a lower  
322 number of colonies forming units when exposed to light source, however in the dark conditions,  
323 the concentration is higher when comparing with treatment in light exposition. This shows that  
324 the growth inhibitory effect of porphyrins occurred when the microorganism was exposed to  
325 light, explaining the photodynamic mode of action of porphyrins (Merchat *et al.* 1996; Simões  
326 *et al.* 2016; Talis *et al.* 2018).

327         The experiments performed to the light control (bacterial suspension with light without  
328 porphyrins) and to dark control (bacterial suspension with porphyrins without light exposure)  
329 indicate that the reduction on bacterial concentration was due to the porphyrin's treatment.  
330 Gram-positive inactivation occurred after 30 min of light exposure and to Gram-negative, the  
331 inactivation occurred after 60 to 90 min. The results of this study corroborate with effect of  
332 porphyrins on *E. coli* (Simões *et al.* 2016), *Staph. aureus* (Talis *et al.* 2018) and rapidly growing  
333 mycobacteria (Guterres *et al.* 2019).

334         The mechanism of action of aPDT were evaluated using ROS scavengers. We observed  
335 that in the presence of radical species scavengers, the values found for CFU were close to those  
336 presented for all bacteria in the absence of the porphyrins. As for the presence of ascorbic acid  
337 (oxygen singlet scavenger), we can notice a significant increase of the CFU values to CPS and  
338 *Proteus sp.*, in relation to the values observed in the absence of ROS scavengers. These data  
339 show that probably the predominant species that is acting in the photo-oxidation process is the  
340 species of singlet oxygen. Singlet oxygen is thought to play a key role in photosensitized  
341 inactivation of bacteria by porphyrins (Henderson and Dougherty 1992) and tetra-cationic

342 porphyrins have moderate values for the generation of this type of reactive oxygen species  
343 (Merchat *et al.* 1996). The singlet oxygen has been considered the main ROS through which  
344 the photosensitizer can exert the photodynamic action, it reacts with proteins, cholesterol of cell  
345 membranes and DNA bases (Amos-Tautua *et al.* 2019).

346 This work demonstrates that tetra-cationic porphyrins (ZnTMeP and H<sub>2</sub>TMeP) may be  
347 considered as promising photosensitizer for the inactivation of Gram-positive and Gram-  
348 negative bacteria from canine otitis. The mechanism of action of these porphyrins is through  
349 the production of singlet oxygen. Both porphyrins showed a bactericidal activity in light  
350 exposure and lower cytotoxicity in MDCK cells becoming an interesting option to development  
351 of future *in vivo* research in photodynamic therapy to dogs with bacterial otitis.

352

### 353 **Acknowledgements**

354

355 The authors thank Carolina Sleutjes Machado, Ricardo Carlos Schutz for technical assistance  
356 and Setor de Virologia – UFSM for collaboration. This study was founded in part by the  
357 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance  
358 Code 001.

359

### 360 **Conflict of Interest**

361

362 The authors declare no conflict of interests.

363

### 364 **References**

365

366 Almeida, J., Tomé, J.P.C., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, A.,  
367 Costa, L., Faustino, M.A.F. *et al.* (2014) Photodynamic inactivation of multidrug- resistant

- 368 bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochem Photobiolo Sci*  
369 **13**, 626–633. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24519439>>. [Accessed 24  
370 Nov. 2019]. Doi: 10.1039/ c3pp50195g.
- 371
- 372 Alves, E., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Cunha, A., Nadais, H. and Almeida, A. (2015)  
373 Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *J*  
374 *Photoch Photobio C* **22**, 34-57. Available at: <  
375 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389556714000392>>. [Accessed 24 Nov.  
376 2019] Doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2014.09.003.
- 377
- 378 Amos-Tautua, B.M., Songca, S.P. and Oluwafemi, O.S. (2019) Application of Porphyrins in  
379 Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules* **24**. Available at: <  
380 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6650910/>>. [Accessed 24 Nov. 2019].
- 381
- 382 Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M.H., Nisar, M.A.,  
383 Alvi, R.F. et al. (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*  
384 **11**, 1645-1658. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30349322>>. [Accessed  
385 27 Nov. 2019]. Doi: 10.2147/IDR.S173867.
- 386
- 387 Basso, G., Cargnelutti, J.F., Oliveira, A.L., Acunha, T.V., Weiblen, R., Flores, E.F. and Iglesias,  
388 B.A. (2019) Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-  
389 platinated porphyrins. *J Porphyr Phthalocya* **23**, 1041-1046. Available at: <  
390 <https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S1088424619500767>>. [Accessed 27 Nov.  
391 2019]. Doi: 10.1142/S1088424619500767.
- 392
- 393 Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A., Madec J.Y., Haenni, M. and Gay, E. (2019).  
394 Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiol Infect*  
395 **147**, 1–10. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30868979>>. [Accessed 21  
396 Nov. 2019]. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268818003278>
- 397
- 398 Bonnet, R. (2000) *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Londres, Gordon and Breach  
399 Science Publishers, pp. 291.
- 400
- 401 Budgen, D.L. (2013) Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs  
402 with otitis externa in Australia. *Aust Vet J* **91**, 43–46. Available at: <  
403 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23356371>>. [Accessed 22 Nov. 2019]. Doi:  
404 10.1111/avj.12007.
- 405
- 406 Carvalho, C.M.B., Gomes, A.T., Fernandes, S.C., Prata, A.C., Almeida, M.A., Cunha, M.A.,  
407 Tomé, J.P., Faustino, M.A. et al. (2007). Photoinactivation of bacteria in wastewater by  
408 porphyrins: bacterial beta-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor  
409 the process. *J Photochem Photobiol B.* **88**, 112-118. Available  
410 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616398>>. [Accessed 24 Nov. 2019]. doi:  
411 10.1016/j.jphotobiol.2007.04.015.
- 412
- 413 Casteel, M.J., Jayaraj, K., Gold, A., Ball, L.M. and Sonsey, M.D. (2004) Photoinactivation of  
414 hepatitis A virus by synthetic porphyrins. *Photochem Photobiol* **80**, 294-300. Available at: <  
415 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15362943>>. [Accessed 24 Nov. 2019]. Doi:  
416 10.1562/2004-04-05-RA-134.
- 417

- 418 Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., Graef, E., Snauwaert, C.,  
419 Cleenwerck, I., Daeyndt, P. *et al.* (2005) *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a  
420 coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1569-1573. Available  
421 at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014483>>. [Accessed 24 Nov. 2019] Doi:  
422 10.1099/ijs.0.63413-0.  
423
- 424 Ergaieg, K., Chevanne, M., Cillard J. and Seux R. (2008). Involvement of both Type I and Type  
425 II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a meso-  
426 substituted cationic porphyrin. *Sol Energy* **82**, 1107-1117. Available  
427 at: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038092X0800128X>>. [Accessed 28  
428 Nov. 2019]. Doi: 10.1016/j.solener.2008.05.008  
429
- 430 Ezzariai, A., Hafidi, M., Khadra, A., Aemig, Q., Fels, L.E. Barret, M., Merlina, D., Patureau,  
431 D. *et al.* (2018) Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure:  
432 Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. *J Hazard Mater* **359**,  
433 465-481. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30071464>>. [Accessed 24  
434 Nov. 2019].  
435
- 436 Fraser, G. (1965). Aetiology of Otitis Externa in the Dog. *J Small Anim Pract* **6**, 445-452.  
437 Available at: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-5827.1965.tb04362.x>>.  
438 [Accessed 11 Dez. 2019].  
439
- 440 Guterres, K.B., Rossi, G.G., Menezes, L.B., Anraku M.M.C. and Iglesias, M.A. (2019)  
441 Preliminary evaluation of the positively and negatively charge effects of tetra-substituted  
442 porphyrins on photoinactivation of rapidly growing mycobacteria. *Tuberculosis* **117**, 45-51.  
443 Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31378267>>. [Accessed 24 Nov. 2019].  
444 Doi: 10.1016/j.tube.2019.06.001.  
445
- 446 Hamblin, M.R. (2016) Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill  
447 resistant microbes. *Curr Opin Microbiol* **33**, 67-73. Available  
448 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27421070>>. [Accessed 24 Nov. 2019]. Doi:  
449 10.1016/j.mib.2016.06.008.  
450
- 451 Hamblin, M.R. and Hasan, T. (2004) Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach  
452 to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* **3**, 436-450. Available  
453 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122361>>. [Accessed 28 Nov. 2019] Doi:  
454 10.1039/b311900a.  
455
- 456 Hamblin, M.R. and Abrahamse, H. (2019) Can light-based approaches overcome antimicrobial  
457 resistance? *Drug Dev Res* **80**, 48-67. Available  
458 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30070718>>. [Accessed 28 Nov. 2019]  
459  
460
- 461 Henderson, W. and Dougherty, T.J. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem*  
462 *Photobiol* **55**, 145-157. Available at: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x>>. [Accessed 24 Nov. 2019]. doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x  
463  
464
- 465 Jori, G. and Brown, S.B. (2004) Photosensitized inactivation of micro-organisms. *Photochem*  
466 *Photobiol Sci* **3**, 403-405. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122355>>.  
467 [Accessed 24 Nov. 2019]. doi: 10.1039/b311904c.

- 468  
469 Kiss, G., Radvanyi, S. and Szigeti, G. (1997) New combination for the therapy of canine otitis  
470 externa. I Microbiology of otitis externa. *J Small Anim Pract* **38**, 51-56. Available  
471 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065882>>. [Accessed 24 Nov. 2019]. Doi:  
472 10.1111/j.1748-5827.1997.tb02987.x.  
473
- 474 Levy, S.B. (2001) Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin Infect Dis* **33**, S124-  
475 S129. Available  
476 at: <[http://cid.oxfordjournals.org/content/33/Supplement\\_3/S124.full.pdf+html](http://cid.oxfordjournals.org/content/33/Supplement_3/S124.full.pdf+html)>. [Accessed  
477 24 Nov. 2019]. Doi: 10.1086/321837.  
478
- 479 Lilenbaum, W., Nunes, E.L.C. and Azeredo, M.AI. (1998) Prevalence and antimicrobial  
480 susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinical normal cats. *Lett Appl*  
481 *Microbiol* **28**, 448–452. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9812400>>.  
482 [Accessed 28 Nov. 2019]. Doi: 10.1046/j.1472-765x.1998.00406.x  
483
- 484 Lilenbaum, W., Veras, M., Blum, E. and Souza, G.N. (2000) Antimicrobial susceptibility of  
485 staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Lett Appl Microbiol* **31**, 42-45. Available  
486 at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10886613>>. [Accessed 24 Nov. 2019]. Doi:  
487 10.1046/j.1472-765x.2000.00759.x  
488
- 489 Machado, A.E.H. (2000) Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e  
490 perspectivas. *Quím Nova* **23**, 236-243. Available at: <  
491 [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422000000200015&script=sci_abstract&tlng=pt)  
492 [40422000000200015&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422000000200015&script=sci_abstract&tlng=pt)>. [Accessed 24 Nov. 2019]. doi:  
493 10.1590/S0100-40422000000200015.  
494
- 495 Malayeri, H.Z., Jamshidi, S. and Salehj, T.Z. (2010) Identification and antimicrobial  
496 susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Vet Res Commun* **34**, 435-444.  
497 Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20526674>>. [Accessed 17 Nov. 2019].  
498 doi: 10.1007/s11259-010-9417-y.  
499
- 500 Marciel, L., Mesquita, M.Q., Ferreira, R., Moreira, B., Neves, M.G.P.M.S., Faustino, M.A.F.  
501 and Almeida, A. (2018) An efficient formulation based on cationic porphyrins to  
502 photoinactivate *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Future Med Chem* **10**, 1821-1833.  
503 Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30019927>>. [Accessed 17 Nov. 2019].  
504
- 505 Martino, L.Nocera, F.P., Mallardo, K., Nizza, S., Masturzo, E., Florito, F., Iovane, G.,  
506 Catalanotti, P. (2016) An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania  
507 Region, Italy. *Asian Pac J Trop Biomed* **6**, 384-389. Available at: <  
508 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169116302106>>. [Accessed 28 Nov.  
509 2019]. Doi: 10.1016/j.apjtb.2015.11.012  
510
- 511 Meerovich, G.A., Akhlyustina, E.V., Tiganova, I.G., Makarova, E.A., Alekseeva, N.V.,  
512 Romanishkin, I.D, Philipova, N.I., Lukyanets, E.A *et al.* (2018) Photosensitizers for  
513 antibacterial photodynamic therapy based on tetracationic derivatives of synthetic  
514 bacteriochlorins. *Laser Phys Lett* **15**. Available  
515 at: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1612-202X/aae03f/meta>>. [Accessed 23 Nov.  
516 2019]. doi: <https://doi.org/10.1088/1612-202X/aae03f>.  
517

- 518 Mekić, S., Matanović, K. and Šeol, B. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas*  
519 *aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Vet Rec* **169**. Available  
520 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742683>>. [Accessed 27 Nov. 2019]. Doi:  
521 10.1136/vr.d2393.  
522
- 523 Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villaneuva, A. and Jori, G. (1996) Meso-substituted  
524 cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria,  
525 *J Photochem Photobiol* **32**, 153-157. Available  
526 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622178>>. [Accessed 23 Nov. 2019]. doi:  
527 10.1016/1011-1344(95)07147-4.  
528
- 529 Mondal, D. and Bera, S. (2014) Porphyrins and phthalocyanines: promising molecules for light-  
530 triggered antibacterial nanoparticles. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* **5**. Available  
531 at: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2043-6262/5/3/033002>>. [Accessed 23 Nov.  
532 2019].  
533
- 534 Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to  
535 proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63. Available  
536 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>>. [Accessed 24 Nov. 2019].  
537
- 538 Oliveira, L.C., Leite, C.A.L., Brilhante, R.S.N. and Carvalho, C.B.M. (2008) Comparative  
539 study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *Can Vet J* **49**, 785–788.  
540 Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2465783/>>. [Accessed 24  
541 Nov. 2019].  
542
- 543 Oliveira, A.L., Cargnelutti, J.F., Mortari, A.P.G, Flores, E.F. and Weiblen, R. (2018) *In*  
544 *vitro* activity of six antiviral drugs against equid alphaherpesvirus type 1 indicates ganciclovir  
545 as promising drug for *in vivo* studies. *Cienc. Rural* **48**. Available at: <  
546 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010384782018001200450&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782018001200450&lng=en&tlng=en)  
547 [&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782018001200450&lng=en&tlng=en)>. [Accessed 24 Nov. 2019]. Doi: 10.1590/0103-8478cr20180085  
548
- 549 Penna, B., Vargas, R., Medeiros, L., Martins, G.M, Martins, R.R. and Lilenbaum, W. (2009)  
550 *In vitro* antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine pyoderma in Rio  
551 de Janeiro, Brazil. *Braz J of Microbiol* **40**, 490-494. Available  
552 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031392>>. [Accessed 24 Nov. 2019]. Doi:  
553 10.1590/S1517-838220090003000011.  
554
- 555 Penna, B., Vargas, R., Medeiros, L., Martins, G.M, Martins, R.R. and Lilenbaum, W. (2010)  
556 Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis  
557 externa. *Vet Dermatol* **21**, 292-296. Available at: <  
558 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042036>>. [Accessed 28 Nov. 2019]. Doi:  
559 10.1111/j.1365-3164.2009.00842.x  
560
- 561 Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S. and Fitzpatrick, E.S. (2011)  
562 *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2nd ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, pp.  
563 912.  
564
- 565 Rosychuk, R.A.W. and Luttgen, P. (2004) Doenças dos ouvidos. In: Ettinger, J.S. and Feldman,  
566 E.C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 5th ed. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,  
567 pp.1048-1053.

568

569 Rougier, S., Borell, D., Pheulpin, S., Woehrlé, F. and Boisramé, B. (2005) A comparative  
570 study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis  
571 externa. *Vet Dermatol* **16**, 299–307. Available  
572 at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16238809>>. [Accessed 28 Nov. 2019]. Doi:  
573 10.1111/j.1365-3164.2005.00465.x

574

575 Simões, C., Gomes, M.C., Neves, M.G.P.M.S., Cunha, A., Tomé, J.P.C., Tomé, A.C.T.,  
576 Cavaleiro, J.A.S., Almeida, A. and Faustino, M.A.F. (2016) Photodynamic inactivation of  
577 *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins – The charge number and charge  
578 distribution effects. *Catal Today* **266**, 197-204. Available  
579 at: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586115004228>>. [Accessed 27  
580 Nov. 2019]. Doi: 10.1016/j.cattod.2015.07.031

581

582 Simplício, F.I., Maionchi, F. and Hioka, N. (2002) Terapia fotodinâmica: aspectos  
583 farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quím*  
584 *Nova* **25**, 801-807. Available at: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000500016&script=sci_abstract&tlng=pt)  
585 [40422002000500016&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000500016&script=sci_abstract&tlng=pt)>. [Accessed 28 Nov. 2019]. Doi:  
586 10.1590/S0100-40422002000500016.

587

588 Shin, B. and Park, W. (2018) Zoonotic diseases and phytochemical medicines for microbial  
589 infections in veterinary science: current state and future perspective. *Front Vet Sci* **5**, 166.  
590 Available at: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2018.00166/full>>. [Accessed  
591 28 Nov. 2019].

592

593 Tasli, H., Akbiyik, A., Topaloğlu, N. Alptüzün, V. and Parlar, S. (2018) Photodynamic  
594 antimicrobial activity of new porphyrin derivatives against methicillin resistant *Staphylococcus*  
595 *aureus*. *J Microbiol* **56**, 828–837. Available at: <  
596 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30353469>>. [Accessed 28 Nov. 2019].  
597 Doi:10.1007/s12275-018-8244-7.

598

599 Zachary, J.F. (2013) Mecanismos das Infecções Microbianas. In: Zachary, J.F. *Bases da*  
600 *Patologia em Veterinária*. 5th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.147-241.

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613



614 **Table 1** The most prevalent bacteria in dogs with otitis identified at Laboratório de  
 615 Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria (LABAC/UFSM) from 2000 to 2018  
 616 that were resistant to one or more antimicrobial from different classes

617

Microorganism	Antimicrobial drug <sup>a</sup>	Number of resistant isolates/Total of isolates (%)	618 619
Gram-positive			
<i>Staphylococcus</i> sp.*	Ampicillin	7/11 (64)	620
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim	5/9 (55)	
	Erythromycin	3/11 (27)	621
	Rifampin	1/11 (0,1)	622
Coagulase-positive staphylococci	Penicillin G	10/11 (91)	
	Ampicillin	18/47 (38)	623
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim	14/42 (33)	
	Erythromycin	11/46 (24)	624
	Rifampin	5/47 (11)	625
Coagulase-negative staphylococci	Sulfamethoxazole/Trimethoprim	4/6 (67)	626
	Ampicillin	4/8 (50)	
	Erythromycin	3/8 (37)	627
Gram-negative			
<i>Proteus</i> sp.	Polymyxin B	25/30 (83)	628
	Ampicillin	15/31 (48)	629
	Rifampin	14/31 (45)	
	Streptomycin	12/30 (40)	630
	Sulfazotrim	8/28 (28)	
	Neomycin	7/32 (22)	631
	Gentamicin	3/32 (9)	632
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Ampicillin	51/54 (94)
Rifampin		51/54 (94)	
Sulfamethoxazole/Trimethoprim		34/43 (79)	634
Cephalexin		9/12 (75)	
Streptomycin		40/56 (71)	635
Chloramphenicol		15/22 (68)	
Neomycin		31/58 (53)	636
Gentamicin		16/57 (28)	
Amikacin		9/56 (20)	637

638 \*The coagulase test was not performed; <sup>a</sup>Antimicrobial drug used in the antimicrobial susceptibility test.

639

640

641

642 **Table 2** CFUs values for tetra-cationic porphyrins (H<sub>2</sub>TMeP and ZnTMeP) incubated with or  
 643 without ROS scavengers at light irradiation conditions (30 min to coagulase-positive  
 644 staphylococci and 90 min to *Proteus mirabilis*)

645

Microorganism	Porphyrin	Without scavengers	With ROS scavengers				
		Bacteria and porphyrin	Bacteria and medium*	Ascorbic acid <sup>a</sup>	Mannitol <sup>b</sup>	Potassium iodide <sup>c</sup>	DMSO <sup>d</sup>
Coagulase-positive staphylococci	H <sub>2</sub> TMeP	0	3.857	3.623	0	0	0
	ZnTMeP	0	3.942	3.732	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	H <sub>2</sub> TMeP	0	3.716	3.604	0	0	0
	ZnTMeP	0	3.770	3.778	0	0	0

646 \*Log<sub>10</sub> CFU/mL; <sup>a</sup>Scavenger of singlet oxygen; <sup>b</sup>Scavenger of hydroxyl radical.; <sup>c</sup>Scavenger of superoxide  
 647 species; <sup>d</sup>Scavenger of hydroxyl radical.

648

649

650

651

652

653

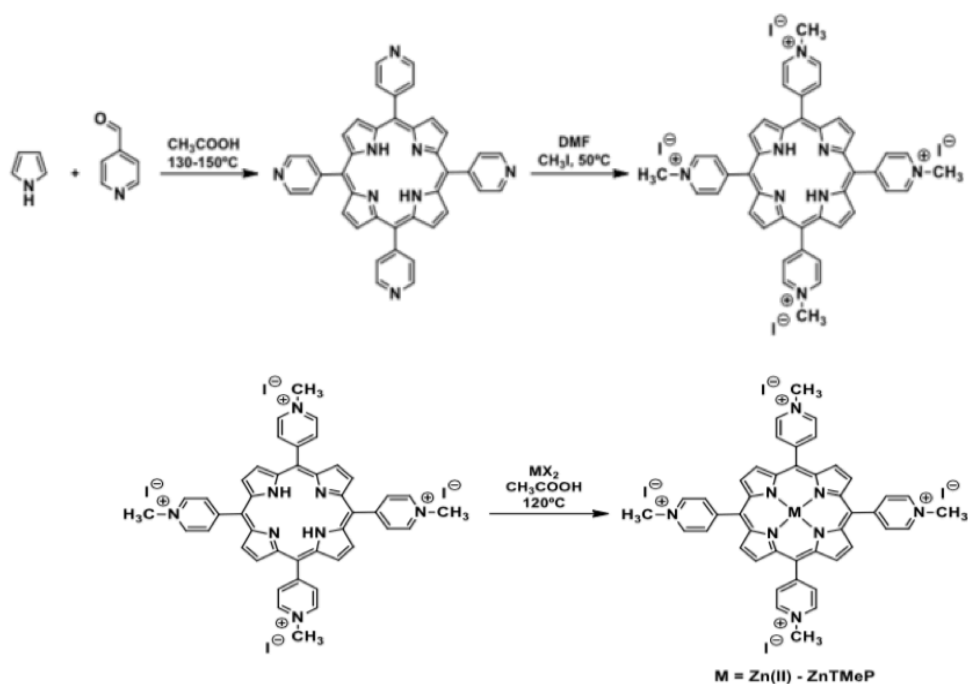
654

655

656

657

658



659

660 **Fig. 1** Synthetic route representation for H<sub>2</sub>TMeP and ZnTMeP porphyrins used in this study.

661 Source: Own authorship.

662

663

664

665

666

667

668

669

670

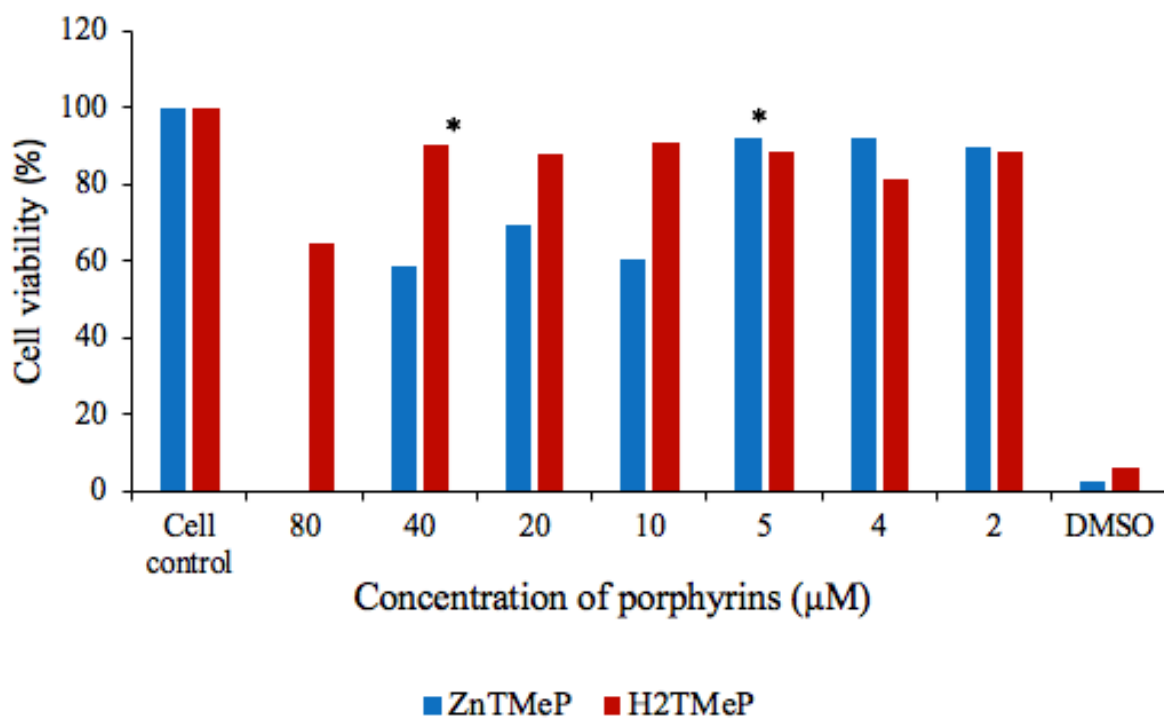
671

672

673

674

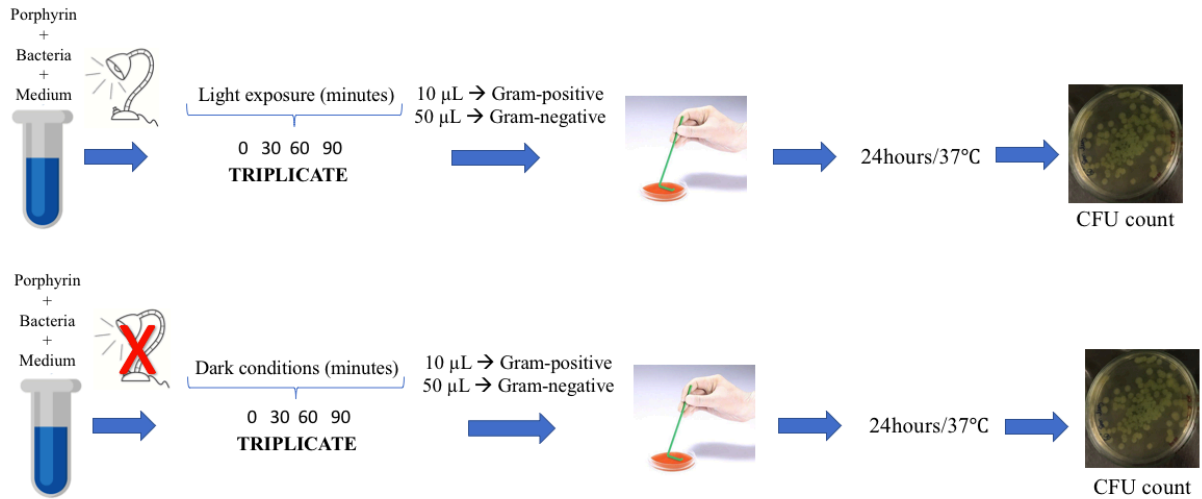
675



676  
677  
678  
679

**Fig. 2** Cell cytotoxicity test (MTT) using ZnTMeP and H<sub>2</sub>TMeP porphyrins in MDCK cells.  
\* Cell viability higher than 80%.

680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692



693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

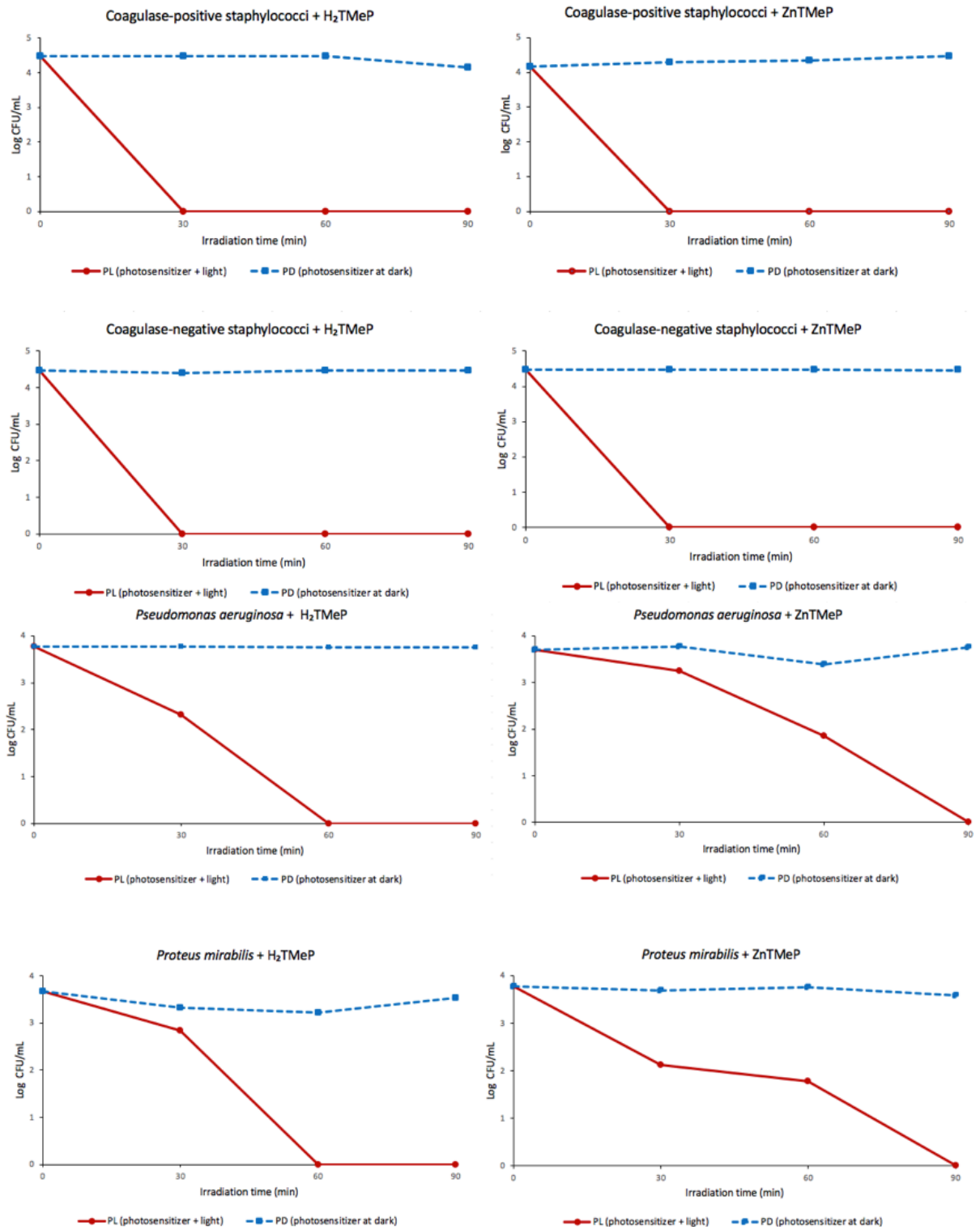
710

711

712

713

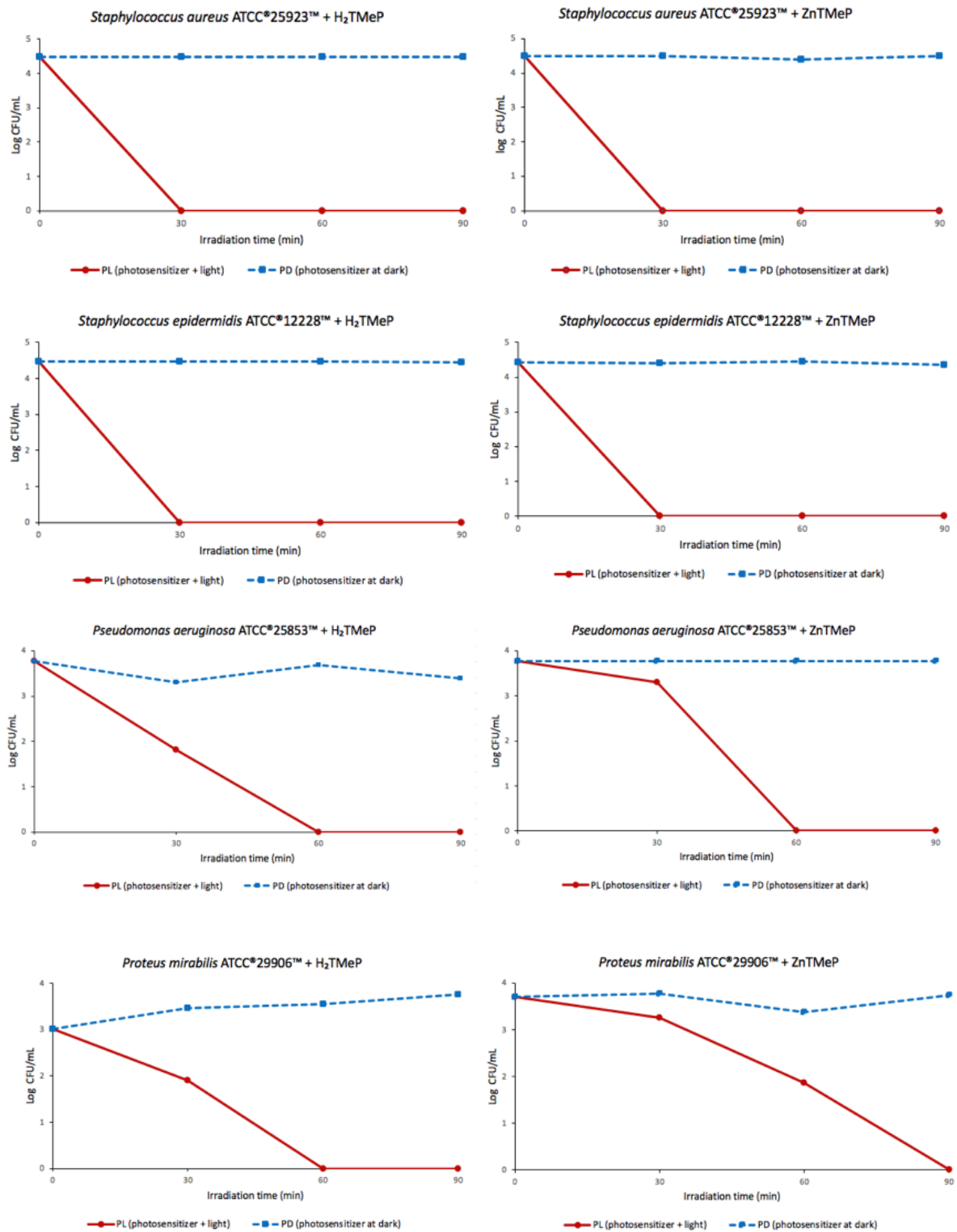
**Fig. 3** Assays of antimicrobial activity of porphyrin. Source: Own authorship.



714

715  
716

717 **Fig. 4** Antimicrobial activity of porphyrin H<sub>2</sub>TMeP (5 μM) and ZnTMeP (5 μM) against  
 718 coagulase-positive staphylococci, coagulase-negative staphylococci, *Pseudomonas aeruginosa*  
 719 and *Proteus mirabilis*.



720

721

722

723 **Fig. 5** Antimicrobial activity of porphyrin H<sub>2</sub>TMeP (5 μM) and ZnTMeP (5 μM) against

724

725 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228),

726

727 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) and *Proteus mirabilis* (ATCC 29906).

727

## 4 CONCLUSÃO

As porfirinas tetra-catiônicas ( $H_2TMeP$  e  $ZnTMeP$ ) podem ser consideradas como fotossensibilizadores promissores para a inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas envolvidas na otite canina e avaliadas nesse estudo. O provável mecanismo de ação dessas porfirinas é através da produção de oxigênio singleto. Ambas porfirinas demonstraram atividade bactericida na exposição à luz e baixa citotoxicidade nas células MDCK, tornando-se uma opção interessante para o desenvolvimento de futuras pesquisas *in vivo* na terapia fotodinâmica de cães com otite bacteriana.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.P.C. et al. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v.13, n.4, p.626–633. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24519439>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- ALMEIDA, A., FAUSTINO, M. A., TOMÉ, J. P. Photodynamic inactivation of bacteria: finding the effective targets. **Future Medicinal Chemistry**. v.7, n.10, p. 1221–1224. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26144260>>. Acesso em: 27 nov. 2019.
- ALVES, J. F. S. **Porfirinas e terapia fotodinâmica em neoplasias**. 2014. 84 p. Projeto de pesquisa (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- ALVES, E. et al. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**. v.22, p. 34-57. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389556714000392>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- AMOS-TAUTUA, B.M.; SONGCA, S. P.; OLUWAFEMI, O. S. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. **Molecules**, v.24. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6650910/>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v.11, p.1645-1658. 2018 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30349322>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- BECHET, D. et al. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends in Biotechnology**, v.26, n.11, p. 612-621. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804298>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- BIRCHARD, S. J; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003.
- BLAIR, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, n.1, p.42-51. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v13/n1/pdf/nrmicro3380.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2019.
- BLUE, J. L.; WOOLEY, R. E. Antibacterial sensitivity patterns of bacteria isolated from dogs with otitis externa. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.171, p. 362-363. 1977. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/893222>>. Acesso em: 28 nov. 2019.
- BOJRAB, M. J.; CONSTANTINESCU, G. M. Ouvido externo. In: BOJRAB, M. J. et al. **Técnicas atuais em cirurgias de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. 131- 133p.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 19-33, 1995.

BONNET, R. **Chemical aspects of photodynamic therapy**. Londres: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. 291 p.

BOURÉLY, C., et al. Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. **Epidemiology and Infection**, v.147, p.1–10. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30868979>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

BRANCO, T. et al. Single and combined effects of photodynamic therapy and antibiotics to inactivate *Staphylococcus aureus* on skin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.21, p. 285–293. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29307773>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

BROOKS, B. D; BROOKS, A. E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.78, p. 14-27. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25450262>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

BUDGEN, D.L. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. **Australian Veterinary Journal** v.91, p.43–46. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23356371>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

CARVALHO, C. M. B. et al. (2007). Photoinactivation of bacteria in astewater by porphyrins: bacterial beta-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.88, p. 112-118. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616398>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

CASTEEL, M. J. et al. Photoinactivation of hepatitis A virus by synthetic porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 2, p. 294-300, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15362943>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.6, p.170-188. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2811240/>>. Acesso em: 28 nov. 2019.

DEMIDOVA, T. N. et al. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. **Jornal of Photochemistry and Photobiology B**, v.81, p.15–25. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071690/>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

DEROSA, M.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v.233-234, p. 351–371. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010854502000346>>. Acesso em: 28 nov. 2019.

DEVRIESE, L. A., et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**,

v.55, n.4, p.1569-1573. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014483>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, D. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.3, n.5, p. 380-387. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724736>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

EHRENBERG, B.; MALIK, Z.; NITZAN, Y. Fluorescence spectral changes of hematoporphyrin derivate upon binding to lipid vesicles, Staphylococcus aureus and Escherichia coli cells. **Photochemistry and Photobiology**, v.41, p.429-435. 1985. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.1985.tb03508.x>>. Acesso em: 12 dez. 2019,

EZZARIAI, A. et al. Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. **Journal of Hazardous Materials**. v.359, p.465-481. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30071464>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

FRASER, G. (1965). Aetiology of Otitis Externa in the Dog. **Journal of Small Animal Practice** 6, 445-452. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-5827.1965.tb04362.x>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

GUTERRES, K.B. et al. Preliminary evaluation of the positively and negatively charge effects of tetra-substituted porphyrins on photoinactivation of rapidly growing mycobacteria. **Tuberculosis** v.117, p.45-51. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31378267>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? **Drug Development Research**, v.80, p. 48-67. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30070718>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

LEVY, S. B. Antibiotic resistance: consequences of inaction. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, n. 3, p.S124-S129. 2001. Disponível em: <[http://cid.oxfordjournals.org/content/33/Supplement\\_3/S124.full.pdf+html](http://cid.oxfordjournals.org/content/33/Supplement_3/S124.full.pdf+html)>. Acesso em: 27 dez. 2019.

LILENBAUM, W. et al. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 42-45. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10886613>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.90, p. 135-145. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5369031/>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p. 236-243. 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422000000200015&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422000000200015&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Acesso em: 26 nov. 2019.

MAISCH, T. et al. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.1542-1552. 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793136>>. Acesso em: 30 nov. 2019.

MALAYERI, H. Z.; JAMSHIDI, S.; SALEHJ, T.Z. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. **Veterinary Research Communications**, v.34, p. 435-444. 2010 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20526674>>. Acesso em: 17 nov. 2019.

MALIK, S.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 6, p. 1283–1293. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16313400>>. Acesso em: 19 nov. 2019.

MARCIEL, L. et al. An efficient formulation based on cationic porphyrins to photoinactivate *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Future Medicinal Chemistry**, v.10, p.1821-1833. 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30019927>>. Acesso em: 30 nov. 2019.

MARTIN, J. P.; LOGSDON, N. Oxygen radicals are generated by dye-mediated intracellular photooxidations: a role for superoxide in photodynamic effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.256, p.39–49. 1987. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3038028>>. Acesso em: 28 nov. 2019.

MARTINO, L. et al. An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** v. 6, p. 384-389. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169116302106>>. Acesso em: 19 nov. 2019

MEEROVICH, G. A. et al. Photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy based on tetracationic derivatives of synthetic bacteriochlorins. **Laser Physics Letters**, v.15, n.11. 2018. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1612-202X/aae03f/meta>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

MEKIĆ, S.; MATANOVIĆ, K.; ŠEOL, B. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. **Veterinary Record** v.169. 2011. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742683>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

MERCHAT, M. et al. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Jornal of Photochemistry and Photobiology B**, v.32, p.153-157. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622178>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

MONDAL, D.; BERA, S. Porphyrins and phthalocyanines: promising molecules for light-triggered antibacterial nanoparticles. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v.5. 2014. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2043-6262/5/3/033002>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, v.2016, n.9, 2016. Disponível

em:<[https://amrreview.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amrreview.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)>.  
Acesso em: 26 nov. 2010

PENNA, B. et al. *In vitro* antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine pyoderma in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 490-494. 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031392>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

QUINN, P. J. et al. **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2 ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. 912 p.

RAMALHO, K. M. et al. Treatment of herpes simplex labialis in macule and vesicle phases with photodynamic therapy. Report of two cases. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 2, p. 321-323, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770054>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

RIMINGTON, G.; KENNEDY, G. V. Porphyrins. In: FLORKIN, M.; MASON, H. S. **Comparative Biochemistry**. 4 ed., New York and London: Academic Press, 1962. p.557.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v.96, p.693-702. 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675913>>. Acesso em: 30 nov. 2019.

ROSYCHUK, R. A. W.; LUTTGEN, P. Doenças dos ouvidos. In: ETTINGER, J. S.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5. ed. 2. vol. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.1048-1053.

ROUGIER, S. et al. A comparative study of two antimicrobial / anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v.16, p. 299–307. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16238809>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

RYWKIN, S. et al. Importance of type I and type II mechanisms in the photodynamic inactivation of viruses in blood with aluminum phthalocyanine derivatives. **Photochemistry and Photobiology**, v. 56, p. 463-469. 1992. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.1992.tb02189.x>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

SCHWARZ, S.; NOBLE, W. C. Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice. **Veterinary Dermatology**, v.10, p. 163–176. 1999. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-3164.1999.00170.x>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

SHIN, B.; PARK, W. Zoonotic diseases and phytochemical medicines for microbial infections in veterinary science: current state and future perspective. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, p.166. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2018.00166/full>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v.29, n.4, p.844. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v29n4/30269.pdf>>. Acesso em: 1 dez. 2019.

SIMÕES, C. et al. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins – The charge number and charge distribution effects. **Catalysis Today**, v.266, p.197-204. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586115004228>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

SIMPLÍCIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v.25, p.801-807. 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422002000500016&script=sci\\_abstract&tlng=p](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422002000500016&script=sci_abstract&tlng=p)>. Acesso em: 26 nov. 2019.

SOBOTTA, L. et al. Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. **European Journal of Medical Chemistry**, v.175, p.72-106. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523419303757?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 nov. 2019.

TASLI, H. et al. Photodynamic antimicrobial activity of new porphyrin derivatives against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiology**, v.56, p.828–837. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30353469>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

TAVARES, A. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. **Marine Drugs**, v.8, p.91-105. 2010. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-3397/8/1/91>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

VATANSEVER, F. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v.37, p.955-989. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23802986>>. Acesso em: 30 nov. 2019.

ZACHARY, J. F. Mecanismos das Infecções Microbianas. In: ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 4, p.147-241.