

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA**

**Giovana Basso**

**ATIVIDADE VIRUCIDA DE PORFIRINAS TETRA-PLATINADAS  
FRENTE A VÍRUS DE BOVINOS**

Santa Maria, RS  
2018

**Giovana Basso**

**ATIVIDADE VIRUCIDA DE PORFIRINAS TETRA-PLATINADAS FRENTE A VÍRUS  
DE BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, RS  
2018

Giovana Basso

**ATIVIDADE VIRUCIDA DE PORFIRINAS TETRA-PLATINADAS FRENTE A  
VÍRUS DE BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 26 de fevereiro de 2018**

---

**Eduardo Furtado Flores, PhD. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Juliana Felipetto Cargnelutti**  
(Dr, UFSM)

---

**Deniz Anziliero**  
(Dr, IMED)

Santa Maria, RS  
2018

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, e ao meu irmão Guilherme por sempre apoiar minhas decisões. Obrigada por moldarem a pessoa que sou, pelas lições de perseverança, pela vida e pelo amor incondicional.

Ao meu orientador, Eduardo Furtado Flores, ao meu coorientador Bernado Iglesias e também ao professor Rudi Weiblen, pela experiência proporcionada e pela orientação e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora e amiga, Juliana Cargnelutti, pelo incentivo e apoio, por tantos conselhos e por todo carinho ao longo de nossa trajetória juntas. Juliana tu vai pro céu.

Aos amigos e colegas do SV/UFSM, por toda ajuda e companheirismo que tornaram os meus dias no laboratório mais felizes.

Aos amigos que a vida trouxe para perto de mim, que incessantemente estiveram ao meu lado dando apoio.

A UFSM por me proporcionar a realização deste trabalho.

## RESUMO

### ATIVIDADE VIRUCIDA DE PORFIRINAS TETRA-PLATINADAS FRENTE A VÍRUS DE BOVINOS

AUTORA: Giovana Basso

ORIENTADOR: Eduardo Furtado Flores

As porfirinas são substâncias fotossensibilizadoras (PS), ou seja, compostos que são ativados quando expostos à luz, reagindo com moléculas de oxigênio e produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS). As porfirinas são constituídas por quatro anéis de pirrol unidos entre si por pontes de metenil, formando um macrociclo tetrapirrólico aromático. A inativação fotodinâmica é um método simples e controlável, e baseia-se na produção de ROS, que podem ser radicais livres e/ou oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Este processo requer a ação combinada de oxigênio, luz e um fotossensibilizador (PS). A terapia fotodinâmica tem sido utilizada no tratamento de tumores e de infecções por micro-organismos. Devido à resistência microbiana a inúmeros medicamentos disponíveis comercialmente, a busca por novas drogas tem se tornado emergente, sendo que a utilização de porfirinas tem se mostrado uma alternativa promissora. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade virucida de duas porfirinas tetra-platinadas (3 e 4-PtTPyP) sobre diferentes vírus animais. A citotoxicidade do composto foi determinada pelo teste de MTT e, a partir da maior concentração não tóxica para células de cultivo, foram utilizadas concentrações inferiores de porfirinas nos testes de atividade virucida. Foram realizados ensaios com vírus de genoma DNA com envelope (herpesvírus bovino 1, BoHV-1) e sem envelope (adenovírus bovino, BAV), e com vírus RNA com envelope (vírus da diarreia viral bovina, BVDV) e sem envelope (enterovírus bovino, BEV). Além disso, a atividade virucida foi investigada frente aos vírus vaccínia (VACV, vírus DNA envelopado) e da estomatite vesicular (VSV, vírus RNA envelopado), que são vírus epiteliotrópicos que causam impacto econômico e sanitário na produção de bovinos. Para isso, suspensões virais contendo concentrações pré-determinadas de vírus foram incubadas com as porfirinas e expostas à luz por diferentes períodos (0, 15, 30 e 60 min). Após esse período, os títulos virais foram determinados por diluição limitante e comparados ao controle viral. Os ensaios de atividade virucida utilizando a porfirina 3-PtTPyP na maior concentração (9,1  $\mu$ M) resultou na inativação total dos vírus envelopados mesmo quando não exposto à luz. A utilização de 1/10 da dose da mesma porfirina (0,91  $\mu$ M) resultou em redução no título dos vírus BoHV-1, BVDV e VSV após 15 min de exposição à luz, sendo que a partir de 30 min, houve inativação total desses vírus. Para o VACV, a inativação viral total ocorreu a partir de 60 min de foto-ativação. O uso da 4-PtTPyP a 9,1  $\mu$ M também resultou em inativação total dos vírus envelopados BoHV-1 e VSV, mesmo sem foto-ativação. Para os vírus envelopados BVDV e VACV houve inativação viral total a partir dos 15 min de exposição à luz. Além disso, houve perda significativa da infectividade viral quando o vírus foi incubado com o composto sem fotoativação, porém a inativação viral foi parcial. Quando a 4-PtTPyP foi utilizada em menor concentração (0,91  $\mu$ M), foi verificada redução significativa e gradual nos títulos dos vírus envelopados, de acordo com o tempo de exposição à luz. Não foi observada atividade virucida de nenhum dos compostos sobre os vírus não envelopados. Os resultados indicaram que ambas porfirinas possuem atividade virucida sobre vírus envelopados, e podem agir

diretamente sobre a infectividade viral mesmo quando não ativadas pela luz, se utilizadas em concentrações elevadas.

**Palavras-chave:** Porfirinas, atividade virucida, fotossensibilizador.

## ABSTRACT

### VIRUCIDAL ACTIVITY OF TETRA-PLATINUM PORPHYRINS AGAINST BOVINE VIRUSES

AUTHOR: Giovana Basso  
ADVISER: Eduardo Furtado Flores

Porphyrins are photosensitizing (PS) substances, that is, compounds that are activated when exposed to light, reacting with oxygen molecules and producing reactive oxygen species (ROS). The porphyrins are composed of four pyrrole rings joined together by methenyl bridges, forming an aromatic tetrapyrrole macrocycle. Photodynamic inactivation is a simple and controllable method, and is based on ROS production, which can be free radicals and/or singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ). This process requires the combined action of oxygen, light and a photosensitizer (PS). Photodynamic therapy has been used in the treatment of tumors and infectious disease. Due to microbial resistance to many commercial drugs, the search for new drugs has become a necessity and the use of porphyrins has gained prominence. The objective of this work was to evaluate the virucidal activity of two tetra-platinized porphyrins (3 and 4-PtTPyP) in different animal viruses. The cytotoxicity of the compounds was determined by the MTT test and, from the higher non-toxic concentration for cultured cells, lower concentrations of porphyrins were used in the virucidal tests. Virucidal tests were performed with DNA viruses with envelope (bovine herpesvirus type 1, BoHV-1) or non-enveloped (bovine adenovirus, BAV) and RNA viruses with envelope (and bovine viral diarrhea virus, BVDV) and non-enveloped (bovine enterovirus, BEV). In addition, virucidal activity was investigated against vaccinia virus (VACV, DNA virus enveloped) and vesicular stomatitis (VSV, RNA virus enveloped), which are epitheliotropic viruses that cause important economic and sanitary impact on bovine production. For this, viral suspensions of known viral concentration were incubated with the porphyrins and exposed to light for different time periods (0, 15, 30 and 60 min). After this, viral titers were determined by limiting dilution and compared to viral control. Virucidal assays using 3-PtTPyP porphyrin at the highest concentration ( $9.1\mu\text{M}$ ) resulted in total inactivation of enveloped viruses even when not exposed to light. The use of 1/10 of the dose of the same porphyrin ( $0.91\mu\text{M}$ ) resulted in a reduction in the titer of BVDV and VSV virus after 15 min of light exposure, and total inactivation was observed after 30 min. For BoHV-1 and VACV, total inactivation occurred after 60 min of photoactivation. The use of  $9.1\mu\text{M}$  4-PtTPyP also resulted in total inactivation of the enveloped BoHV-1, BVDV and VSV, even without photoactivation. For the enveloped VACV complete inactivation occurred after 15 min of light exposure. When 4-PtTPyP was used in a lower concentration ( $0.91\mu\text{M}$ ) gradual reduction in infectivity of enveloped virus was observed according to the time of light exposure. In addition, there was a significant loss of viral infectivity when the virus were incubated with the compound without photoactivation, but viral inactivation was only partial. None of the porphyrins had virucidal activity on non-enveloped viruses. The results indicated that both porphyrins have virucidal activity on enveloped viruses, and can act directly on viral infectivity even when not activated by light, if used in high concentrations.

**Key words:** Porphyrins, virucidal activity, photosensitizer.

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

Figura 1 – Mecanismos de inativação fotodinâmica. .... 12

### Capítulo 1

Figura 1 – Estrutura das porfirinas tetraplatinadas, a estrutura da esquerda a platina se liga na posição para do anel aromático (4-PtTPyP) e na estrutura da direita a platina se liga na posição meta do anel aromático (3-PtTPyP). .....27

Figura 2 - Atividade virucida da porfirina 3-PtTPyP na concentração de 9,1 $\mu$ M. A figura apresenta a média dos títulos virais após diferentes tempos de exposição à luz..30

Figura 3 - Atividade virucida da porfirina 3-PtTPyP na concentração de 0,91 $\mu$ M. A figura apresenta a média dos títulos virais após diferentes tempos de exposição à luz. .... 30

Figura 4 - Atividade virucida da porfirina 4-PtTPyP na concentração de 9,1 $\mu$ M. A figura apresenta a média dos títulos virais após diferentes tempos de exposição à luz. .... 31

Figura 5 - Atividade virucida da porfirina 4-PtTPyP na concentração de 0,91 $\mu$ M. A figura apresenta a média dos títulos virais após diferentes tempos de exposição à luz. .... 32



## LISTA DE ABREVIATURAS

BAV	Adenovírus bovino
BEV	Enterovírus bovino
BoHV-1	Herpesvírus bovino do tipo 1
BPV	Parvovírus bovino
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CVSL	Controle de vírus sem luz
CoPPIX	Cobalt-protoporfirina IX
DMSO	Dimetilsulfóxido
DENV	Vírus da dengue
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
MDBK	Mardin-Darby Bovine Kidney
Metallo TPPS4	Tetrasulfonato de Meto-Tetrafenilporfirina
MTT	Brometo de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium
PCV	Circovírus suíno
PDT	Terapia fotodinâmica
PPV	Parvovírus suíno
PS	Fotossensibilizador
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SnPPIX	Estanho-protoporfirina IX
TAPP	5,10,15,20-tetraquis[4-(3-N,N-dimetilamoniumpropoxi) fenil]
VACV	Vírus da vaccínia
VARV	Vírus da varíola
VSV	Vírus da estomatite vesicular
YFV	Febre amarela

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
1.1	Mecanismos de ação fotodinâmica .....	11
1.2	Histórico da fototerapia .....	13
1.3	Ação das porfirinas sobre os micro-organismos .....	15
1.4	Vírus bovinos de importância sanitária e econômica .....	17
2	CAPÍTULO 1 .....	20
	INTRODUÇÃO .....	24
	MATERIAL E MÉTODOS .....	26
	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
	CONCLUSÃO .....	36
	REFERÊNCIAS .....	37
3	REFERÊNCIAS .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

As porfirinas são substâncias fotossensibilizadoras (PS), ou seja, compostos que são ativados quando expostos à luz, reagindo com moléculas de oxigênio e produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) (OCHSNER, 1996). Esses compostos têm sido utilizados em terapia antiviral e no tratamento de tumores (YAMAUCHI et al, 2016).

As porfirinas são constituídas por quatro anéis de pirrol unidos entre si por pontes de metenil, formando um macrociclo tetrapirrólico aromático. Porfirinas podem ser sintetizadas, mas também estão disponíveis na natureza. As porfirinas naturais mais conhecidas são o pigmento nos glóbulos vermelhos (heme) e a clorofila das plantas (FISCHER & ORTH, 1937; FISCHER & STERN, 1940). Essas porfirinas desempenham funções específicas em sistemas biológicos como é o caso da hemoglobina que atua no transporte de oxigênio, da clorofila no processo de fotossíntese e do citocromo P-450 que age na detoxificação hepática (MILGRON,1997).

Algumas estruturas tetrapirrólicas como porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas têm sido amplamente investigadas na PDT e vários compostos receberam aprovação para uso na clínica médica (ABRAHAMSE & HAMBLIN, 2016).

### 1.1 Mecanismos de ação fotodinâmica

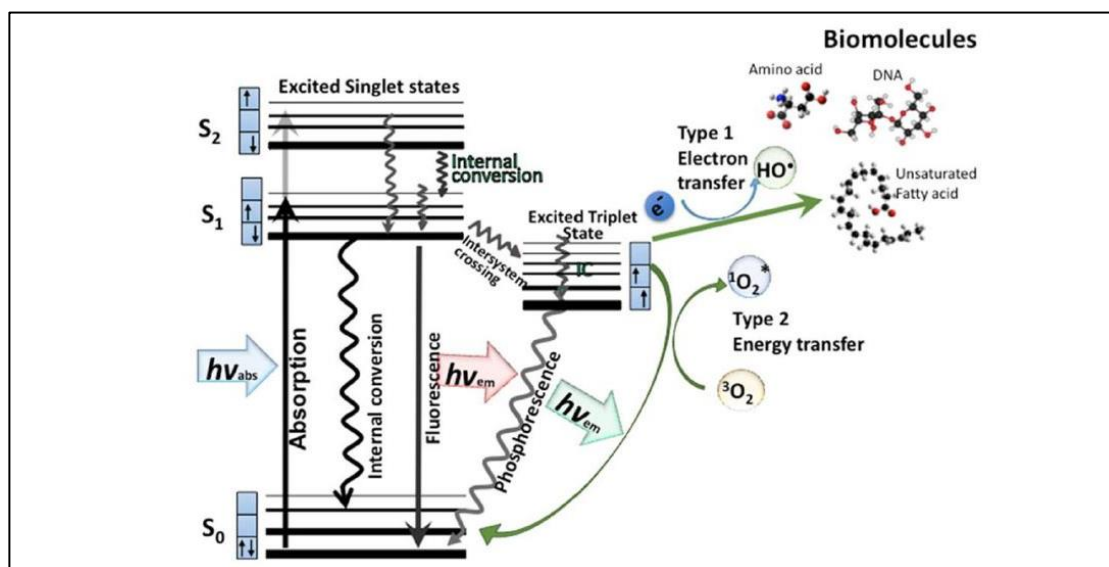
A inativação fotodinâmica é um método simples e controlável, baseado na produção de ROS, que podem ser radicais livres e/ou oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Esse procedimento requer a ação combinada de oxigênio, luz e um fotossensibilizador (PS), que absorve e utiliza a energia da luz para produzir as ROS (DEROSA & CRUTCHLEY, 2002). Algumas variáveis podem alterar os efeitos da ação fotodinâmica, como a estrutura e a concentração da molécula do PS, e as propriedades da luz utilizada (DEROSA & CRUTCHLEY, 2002; COSTA et al., 2010).

O mecanismo da inativação fotodinâmica é baseado na capacidade do PS de absorver energia da luz e a transferir para a molécula de oxigênio. Existem basicamente dois mecanismos de inativação fotodinâmica (Figura 1): no mecanismo tipo I, o PS no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e/ou com moléculas vizinhas (preferencialmente  $\text{O}_2$ ), produzindo radicais ou íons radicais por reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons. No mecanismo tipo II obtém-se oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), altamente reativo, pela transferência de energia do PS no estado

triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio ( $^3\text{O}_2$ ). Em razão das reações de transferência de energia serem mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons, o mecanismo tipo II é geralmente favorecido nas reações de fotoxidação (OCHSNER, 1996).

O PS ativado por luz transfere a sua energia de estado excitado para o tecido biológico circundante, via oxigênio singleto. Este, quando gerado, pode reagir com lipídeos insaturados (incluindo colesterol), aminoácidos (como o triptofano, histidina e metionina) e ácido nucleicos. Lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas. Portanto, as reações fotoxidativas frequentemente ocasionam alterações das membranas e, conseqüentemente, da permeabilidade celular (GORMAN et al., 2004).

Figura 1 – Mecanismos de inativação fotodinâmica. Quando a luz é absorvida pelo fotossensibilizador, o elétron se move de um estado de singleto-singleto de baixa energia não excitado para um estado singleto de alta energia. Este estado excitado pode perder energia através da emissão de um fóton (fluorescência) ou por conversão interna (decaência não radiativa). O processo conhecido como cruzamento inter-setorial envolve o deslize da rotação do elétron de alta energia, levando a um estado de triplete excitado de longa vida. Na presença de oxigênio molecular, superóxido e radicais hidroxila são formados em reações de Tipo I, e oxigênio singleto em uma reação de Tipo II



Fonte: (ABRAHAMSE & HAMBLIN, 2016).

## 1.2 Histórico da fototerapia

A fototerapia é a utilização de luz visível, ou próximo do visível, como agente terapêutico em medicina clínica. Esta prática é dividida em duas categorias: terapia direta, quando não há um PS administrado, sendo unicamente realizada pela ação de uma fonte de luz; e terapia indireta, quando o efeito é obtido pela administração de um PS absorvente de luz, que podem ser porfirinas ou seus derivados, que na presença de luz pode produzir espécies reativas de oxigênio, capazes de interagir com um substrato, causando oxidação (BONNETT, 1995; MACHADO, 2000; DOLMANS et al, 2003)

O conceito de PDT iniciou-se em 1900 em Munique (Alemanha). O estudante de medicina Oscar Raab, descobriu acidentalmente que o micro-organismo paramécio que havia sido incubado com determinados corantes, tinha sido inativado quando exposto à luz. A inativação não ocorreu quando o micro-organismo foi incubado no corante e mantido no escuro. Posteriormente, foi descoberto que o oxigênio atmosférico era essencial para a morte do parasita através deste mecanismo mediado pela luz, e assim, surgiu os termos "ação fotodinâmica" e "foto-ativação" (ABRAHAMSE & HAMBLIN, 2016),

O início do uso da fototerapia para o tratamento de doenças deve-se ao dinamarquês Finsen que, em 1901, tratou a dermatopatia *Lupus vulgaris* de forma direta, pelo uso de uma lâmpada. Este experimento concedeu a Finsen o prêmio Nobel de Medicina em 1903 (BONNETT, 1995). Desde o início do século 20, vários pesquisadores têm investigado o uso das porfirinas e seus derivados no tratamento de doenças. Trappeiner, em 1903, tratou um câncer de pele aplicando eosina e luz. A primeira estrutura de uma porfirina foi proposta por Küster em 1912, porém por ser um grande anel macrocíclico, acreditou-se não ser suficientemente estável. Em 1929, Hans Fischer e colaboradores obtiveram sinteticamente a porfirina heme (MMILGRON, 1997). Em 1913, durante experimentos de fototerapia, Meyer-Betz injetou-se 200 mg de hematoporfirina e não observou efeitos colaterais. No entanto, após expor-se à luz solar, apresentou fotossensibilidade, que persistiu por sete meses. Policard, em 1925, estudou os efeitos fototóxicos das porfirinas em tecidos, principalmente em tumores malignos. Já no início dos anos 1950, Schwartz demonstrou que o efeito fototóxico detectado no experimento de Meyer-Betz não era resultado da hematoporfirina, uma vez que ela rapidamente desaparecia do organismo, mas de uma mistura oligomérica do material derivado, que pode ocorrer durante o isolamento de hematoporfirina do sangue. Esta

parte oligomérica e, portanto, a propriedade fototóxica, foi enriquecida na preparação de Schwartz. Ele primeiro tratou a hematoporfirina com ácido sulfúrico e ácido acético, e posteriormente adicionou solução alcalina. Esta preparação foi denominada de “derivado de hematoporfirina”. Lipson, no início dos anos 1960, sob a orientação de Schwartz, investigou o acúmulo preferencial de fluorescência a partir do derivado de hematoporfirina, em tumores implantados em camundongos e ratos. A partir destas experiências, Lipson realizou o tratamento de uma mulher apresentando metástase de câncer de mama com o derivado de hematoporfirina e irradiação de luz seletiva no campo tumoral, resultando em remissão das células tumorais. Assim, no final da década de 1960, foi iniciado o uso da PDT para o tratamento do câncer (revisado por STERNBERG, 1998).

Embora as primeiras observações da ação da PDT em células cancerígenas foram obtidas nos experimentos de Von Tappeiner e Jesionek, realizados em 1903, as primeiras aplicações da PDT para o tratamento de pacientes com câncer ocorreram no início dos anos 70. Em 1972, Diamond e cols. postularam que as propriedades das porfirinas poderiam ser exploradas para matar células cancerígenas, pois observações dos seus estudos *in vivo* demonstraram que a PDT atrasou o crescimento de gliomas implantados em ratos. Um avanço significativo ocorreu em 1975, quando Thomas Dougherty e cols. relataram que a administração de um derivado de hematoporfirina ativado pela luz vermelha inibia completamente o crescimento de tumores mamários em ratos. No mesmo ano, Kelly e cols. relataram que a ativação do um derivado de hematoporfirina também eliminou o carcinoma da bexiga em ratos (DOLMANS et al., 2003).

A partir dessas observações e pesquisas iniciais, vários estudos foram realizados até a obtenção do primeiro agente fototerapêutico liberado por órgãos governamentais para uso na PDT em pessoas. Este agente, denominado Photofrin® (porfimer sodium), foi desenvolvido pela empresa QLT Photo-Therapeutics (Estados Unidos) no final da década de 80, e tem sido o agente fototerapêutico mais aplicado na terapia para o tratamento do câncer (MACHADO, 2000). Atualmente, existem outras porfirinas utilizadas comercialmente no tratamento do câncer como o Visudyne® (Reino Unido), Foscan® (Alemanha), FosPeg® (Estados Unidos), Photogem® (Rússia), Photosan® (Alemanha) TOOKAD® (Luxemburgo) e o Radachlorin® (União Européia) (BAYONA et al., 2017; ALVES et al., 2015).

### 1.3 Ação das porfirinas sobre micro-organismos

O surgimento da resistência microbiana é um grave problema global nas áreas clínicas e ambientais, portanto, o desenvolvimento de novas drogas capazes de inativar micro-organismos necessita ser investigado (ALVES et al., 2015).

A PDT tem se destacado neste sentido, devido ao seu potencial antimicrobiano, como já descrito para as porfirinas policatiônicas que podem foto-inativar bactérias gram-negativas como a *E. coli* (MATISUMOTO et al., 2017), a tetrahidroporfirina-tetratosilato que foi capaz de inativar bactérias gram-positivas e gram-negativas (SCHASTAK et al., 2010), a van-porfirina divalente (vancomicina-porfirina divalente) que inativa *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (XING et al., 2010) e os conjugados de poli-S-lisina e porfirinas meso-substituídas catiônicas, que foram capazes de inativar cepas de *E. coli* e de *S. aureus* resistentes a antibióticos convencionais (TOMÉ et al, 2004).

O uso de porfirinas catiônicas (5,10,15,20-tetraquis[4-(3-N,N-dimetilamoniumpropoxi) fenil], TAPP) para a inativação de culturas planctônicas e de biofilmes de *S. aureus* já foi investigado (MAMONE et al., 2016). A inativação de biofilmes de *S. aureus* exigiu maiores concentrações do PS e incidência de luz mais elevadas do que a inativação de culturas planctônicas. Para bactérias gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa*, o uso do TAPP foi menos eficiente, e somente as colônias planctônicas foram inativadas, exigindo doses do PS muito superiores às eficientes para *S. aureus*. Esses resultados demonstram que a ação do PS pode estar diretamente relacionada à estrutura do micro-organismo e ao seu formato de disposição na natureza.

A PDT também tem sido investigada para a inativação de fungos e leveduras, e no tratamento de dermatofitoses. O PS Photofrin®, comercialmente disponível para uso no tratamento de tumores, foi utilizado em ensaios *in vitro* para verificar a susceptibilidade de diferentes espécies patogênicas de *Candida* sp.. A absorção do Photofrin® pela *Candida* sp. e a sua posterior sensibilidade à irradiação foram influenciadas pelas condições da cultura. A absorção do PS foi pobre em blastoconídios de *C. albicans* cultivados em caldo nutritivo, mas houve captação do Photofrin® pelas formas filamentosas. Sob condições em que o Photofrin® foi efetivamente absorvido

pela *C. albicans*, estas foram eficientemente danificados após exposição à luz. Algumas espécies relativamente resistentes ao fluconazol, como a *C. krusei*, foram sensíveis ao Photofrin®, nas mesmas concentrações tóxicas para a *C. albicans*, demonstrando o potencial uso de PDT em micro-organismos resistentes a drogas de uso comum (QUIROGA et al., 2015). Por outro lado, existem porfirinas que falham em inativar fungos, como o composto Protoporphyrin IX, que foi ineficaz frente a biofilmes de *C. albicans*, provavelmente porque as cargas negativas dos proteoglicanos presentes na matriz extracelular dos fungos repelem as cargas negativas do PS, impedindo assim a sua difusão nas células (SOUSA et al., 2016).

A estrutura molecular do PS também pode interferir na inativação de micro-organismos. O uso de porfirinas catiônicas (5-(4-trifluorofenil)-10,15,20-tris (4-trimetilamonifenil) e p-tosilato de 5,10,15,20-tetra (4-N, N, N-trimetilamônio) e aniônicas (5,10,15,20-tetra (4-sulfonatofenil)) resultaram em diferentes efeitos *in vitro* sobre a viabilidade de *C. albicans*. As porfirinas catiônicas causaram atraso no crescimento das colônias e na viabilidade de *C. albicans* após PDT e 3h de exposição a irradiação, indicando inativação completa da levedura. No entanto, este efeito não foi observado em leveduras tratadas com porfirinas aniônicas (CORMICK et al., 2009).

A PDT também tem potencial no tratamento de infecções fúngicas superficiais da pele causadas por dermatófitos como o *Trichophyton rubrum*, uma vez que um isolado deste fungo foi inativado quando incubado com a porfirina tricloretoada 10,15-tris (4-metilpiridínio)-20-fenil-(21H,23H) e exposto à luz por 2h, mostrando que esse PS foi efetivo e seguro, podendo ser testado para uso em tratamentos clínicos (SMIJS et al., 2009).

A alta capacidade de mutação e o potencial de resistência a drogas antivirais que alguns vírus possuem, bem como a busca pelo desenvolvimento de novas drogas antivirais, tem motivado o estudo e a investigação das porfirinas como antivirais ou pela sua capacidade virucida (TAMALET et al, 2000).

Um estudo avaliou uma série de porfirinas naturais e sintéticas, que foram divididas em três classes: porfirinas naturais, derivados de tetrasulfonato de metotetrafenilporfirina (metallo-TPPS4), e derivados de tetra-arilporfirina sulfonados. Essas porfirinas foram testadas *in vitro* frente ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). O metallo-TPPS4, e uma série de derivados de tetra-arilporfirinas sulfonados foram capazes de eliminar completamente o HIV, em comparação com o as porfirinas naturais que reduziram a infecção em menos de 80%. Esses resultados sustentam a conclusão de



que as porfirinas modificadas apresentam maior atividade contra o HIV (VZOROV et al., 2002).

Um estudo *in vitro* investigou a utilização da hematoporfirina éter monometílico frente à partículas livres de HIV. Foi identificada foto-inativação eficiente após 40 min de exposição da suspensão viral à luz. Além disso, foi observado que esta porfirina atuou por ambos tipos de mecanismo da PDT (tipos I e II) (YIN et al., 2012).

Dentre as porfirinas investigadas com relação à sua atividade virucida e antiviral contra os vírus da dengue (DENV) e da febre amarela (YFV), estão o heme, a cobalt-protoporfirina IX e o estanho-protoporfirina IX (CoPPIX e SnPPIX), que são estruturas macrocíclicas compostas por um anel de tetrapirrole com íon metálico central. A incubação prévia de DENV e YFV com heme, CoPPIX e SnPPIX resultaram em inativação dose-dependente de partículas virais. O tratamento de células HepG2 com heme, CoPPIX e SnPPIX, após infecção por DENV reduziu as partículas infecciosas sem afetar o conteúdo viral de RNA em células infectadas. A redução da carga viral ocorreu apenas com o contato direto de DENV com porfirinas, sugerindo um efeito direto sobre as partículas víricas. Heme, CoPPIX e SnPPIX possuem capacidade de inativar DENV e YFV, prejudicando sua capacidade de infectar e induzir efeitos citopáticos nas células alvo (MIRANDA et al., 2016).

Também foi analisada a atividade antimicrobiana do derivado de porfirina TONS 504 [13,17-bis (1-carboxietil) carbamoil (3-metilpiridina) -3- (1,3-dioxano-2-il) metilideno-8-etenil-2-hidroxi-2,7,12,18 -tetrametil-clorina, iodeto de di-metilo (C<sub>51</sub>H<sub>58</sub>O<sub>5</sub>I<sub>2</sub>)], frente ao herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1) resistente ao aciclovir (ACV). A PDT foi eficaz em inativar/eliminar o vírus, sem causar danos às células hospedeiras, mostrando que poderá ser uma alternativa no tratamento de vírus resistentes à antivirais (LATIEF et al., 2015).

#### **1.4 Vírus bovinos de importância sanitária e econômica**

As infecções víricas são importantes causas de perdas econômicas em rebanhos comerciais de todo o mundo. Dentre os inúmeros vírus de bovinos, foram selecionados seis para a realização dos ensaios virucidas: vírus da diarreia viral bovina (BVDV), o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), o adenovírus bovino (BAV), o enterovírus bovino (BEV), o vírus vaccínia (VACV) e o vírus da estomatite vesicular (VSV). Esses vírus são representantes das principais classes biológicas e estruturais de vírus, ou seja, vírus

DNA (BoHV-1, BAV, VACV) e RNA (BVDV, BEV, VSV), com envelope (BoHV-1, VACV, BVDV, VSV) e não-envelopados (BAV e BEV).

O BoHV-1 é um vírus DNA envelopado, pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. Está associado com doença respiratória e/ou reprodutiva, conjuntivite e depressão do sistema imune (JONES & CHOWDHURY, 2007).

O BVDV é um vírus RNA envelopado, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, que causa problemas gastroentéricos, respiratórios e reprodutivos em bovinos, é de difícil erradicação e está presente em todos os continentes com exceção da Antártida (RIDPATH, 2010). Atua ainda como um importante contaminante de soro fetal bovino (SFB), que possui utilização universal em várias atividades laboratoriais de pesquisa, diagnóstico e produção de biológicos (GAGNIEUR et al., 2014).

O BEV é um vírus RNA não envelopado que pertence à família *Picornaviridae*. Esse vírus parece estar envolvido em doença gastroentérica de bovinos, altamente resistente no meio ambiente sendo frequentemente é identificado nas fezes de animais diarreicos (TSUCHIYAMA et al., 2017).

O BAV é um vírus DNA não envelopado, pertencente à família *Adenoviridae*, e a infecção de bovinos resulta em sinais clínicos que incluem diarreia grave, depressão, decúbito e morte principalmente em terneiros, resistente a condições ambientais (VAATSTRA et al., 2016).

O VACV pertence à família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae* e gênero *Orthopoxvirus* (ESPOSITO & FENNER, 2001). A sua origem é desconhecida, e por muitos anos esse agente foi utilizado como vírus vacinal para a erradicação da varíola humana, devido sua alta reatividade sorológica cruzada com o agente desta enfermidade, o vírus da varíola (VARV) (BAXBY, 1977).. O VACV causa doença vesicular e exantemática em bovinos leiteiros e, ocasionalmente em ordenhadores, e vários casos tem sido descritos em diversas regiões do país (DAMASO et al., 2000; LEITE et al., 2005; LOBATO et al., 2005; SANT'ANA et al., 2013).

O VSV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus*. É um vírus RNA de fita simples, polaridade negativa, com envelope com o formato de projétil. Além de importância econômica para animais de produção, o VSV possui importância sanitária, pois causa doença confundível com a febre aftosa (*Foot and mouth disease*, FMD) em ruminantes e suínos (RODRIGUEZ et al., 2012). O

VSV causa doença cutânea em bovinos e equinos, caracterizadas por vesículas e úlceras que coalescem, causando extensas lesões na pele e nas mucosas dos animais.

O estudo da investigação da atividade virucida das porfirinas tetraplatinadas 3 e 4-PtTPyP frente a esses vírus de bovinos será apresentado sob a forma de artigo científico, a seguir.

## **CAPÍTULO 1**

### **ATIVIDADE VIRUCIDA DE PORFIRINAS TETRA-PLATINADAS FRENTE A VÍRUS DE BOVINOS**

**Giovana Basso, Bernardo A. Iglesias, Juliana F. Cargnelutti, Rudi Weiblen,  
Eduardo F. Flores**

(Artigo a ser submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* – 2018)

### **Atividade virucida de porfirinas tetra-platinadas frente a vírus de bovinos**

Giovana Basso<sup>2</sup>, Bernardo A. Iglesias<sup>3</sup>, Juliana F. Cargnelutti<sup>2</sup>, Rudi Weiblen<sup>2</sup>, Eduardo

F. Flores<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.-** Basso G. Iglesias B.A., Cargnelutti J.F., Weiblen R. & Flores EF. 2018. [Virucidal activity of tetra-platinized porphyrins against bovine viruses]. Atividade virucida de porfirinas tetra-platinadas frente a vírus de bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 63A, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP 97105-900, Brazil. E-mail: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com).

Porphyrins are photosensitizers, that is, compounds that absorb the energy of light to produce reactive oxygen species that can alter molecules and cellular mechanisms. The use of porphyrins for virus inactivation has been investigated and it has been shown to have potential for *in vitro* and *in vivo* applications. The objective of this study was to investigate the virucidal activity of two tetra-platinized porphyrins (3 e 4- TPYP) in selected bovine viruses. The porphyrin cytotoxicity was first determined by MTT test and virucidal tests used non-toxic drug concentrations. DNA and RNA viruses, enveloped (bovine herpesvirus type 1, BoHV-1, and bovine viral diarrhea virus, BVDV) and non-enveloped (bovine adenovirus, BAV, and bovine enterovirus, BEV), respectively, were used in virucidal tests. Additionally, virucidal activity of porphyrins was investigated against two epitheliotropic viruses, vaccinia (VACV) and vesicular stomatitis virus (VSV), that cause sanitary and economic impact for livestock. Initially, viral suspensions were incubated with porphyrins at two different concentrations and exposed to light for 0, 15, 30 and 60 min. After that, the virus titers were determined by limiting dilution and compared with virus control titers. The virucidal activity test using

the 3-TPyP porphyrin at high concentration (9.1 $\mu$ M) resulted in total inactivation of enveloped viruses even when not exposed to light. The use of a lower dose (0.91  $\mu$ M) of the same porphyrin resulted in reduction of virus titers of BVDV and VSV after a 15min exposure to light, and after 30 min these viruses were totally inactivated. For VACV and BoHV-1, complete viral inactivation occurred after 60 min of photo-activation. Incubation of BoHV-1, BVDV and VSV with porphyrin 4-TPyP at 9.1  $\mu$ M resulted in complete virus inactivation even without light exposure. The enveloped virus VACV was completely inactivated after 15 min at photo-activation. Partial virus inactivation was detected after incubation with the porphyrin without light activation. The use of 4-TPyP at lower concentration resulted in gradual reduction of virus titers according to time of light exposure for all enveloped viruses. The virucidal effect of both porphyrins in non-enveloped viruses was not significant. These results indicated that both porphyrins have virucidal activity on enveloped viruses, and they can reduce viral infectivity without photo-activation when used at high concentrations.

INDEX TERMS: photodynamic therapy, photosensitizer, virus inactivation

<sup>1</sup>Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 63A, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP 97105-900. \* Autor para correspondência: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com).

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP 97105-900. \*

**RESUMO.-** As porfirinas são substâncias fotossensibilizadoras, ou seja, compostos que absorvem a energia da luz para a produção de espécies reativas de oxigênio que podem alterar moléculas e mecanismos celulares. A utilização de porfirinas para a inativação

viral vem sendo investigada e possui potenciais aplicações tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade virucida de duas porfirinas tetraplatinadas (3 e 4-PtTPyP) em alguns vírus de bovinos. A citotoxicidade dos compostos foi inicialmente determinada pelo teste de MTT e, a partir da maior concentração não tóxica, foram utilizadas concentrações inferiores das porfirinas nos testes de atividade virucida. Foram realizados ensaios com vírus de genoma DNA ou RNA, com envelope (herpesvírus bovino tipo 1, BoHV-1, e vírus da diarreia viral bovina, BVDV) e não envelopados (adenovírus bovino, BAV, e enterovírus bovino, BEV). Além disso, a atividade virucida foi investigada frente aos vírus vaccínia (VACV) e da estomatite vesicular (VSV), que são vírus epiteliotrópicos de grande impacto na bovinocultura. Para isso, suspensões virais foram incubadas com as porfirinas e expostas à luz por diferentes períodos de tempo (0, 15, 30 e 60 min). Após esse período, os títulos virais foram determinados por diluição limitante e comparados ao controle viral. Os ensaios de atividade virucida utilizando a porfirina 3-PtTPyP na maior concentração (9,1 $\mu$ M) resultou na inativação total dos vírus envelopados mesmo quando não expostos à luz. A utilização de 1/10 da dose da mesma porfirina (0,91  $\mu$ M) resultou em redução no título do BVDV e VSV após 15 min de exposição à luz, sendo que a partir de 30 min houve inativação completa. Para o BoHV-1 e VACV, a inativação total ocorreu a partir de 60 min de foto-ativação. O uso da 4-PtTPyP a 9,1  $\mu$ M também resultou em inativação completa dos vírus envelopados BVDV, BoHV-1 e VSV, mesmo sem foto-ativação. Para o VACV houve inativação viral total a partir dos 15 min de exposição à luz. Além disso, houve perda significativa da infectividade viral quando o vírus foi incubado com o composto sem fotoativação, porém a inativação foi parcial. Quando a 4-PtTPyP foi utilizada em menor concentração (0,91  $\mu$ M), foi verificada redução gradual nos títulos de vírus envelopados conforme o tempo de exposição à luz. Não foi detectada atividade

virucida de nenhuma das porfirinas contra os vírus não-envelopados. Os resultados indicaram que ambas porfirinas possuem atividade virucida sobre vírus envelopados, e podem agir diretamente sobre a infectividade viral mesmo quando não ativadas pela luz, se utilizadas em concentrações elevadas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Terapia fotodinâmica, fotossensibilizador, inativação viral

## INTRODUÇÃO

As porfirinas são compostos fotossensibilizadores que reagem com a luz, e têm sido utilizadas na terapia antiviral e no tratamento de tumores (Yamauchi et al. 2016). A utilização das porfirinas na fototerapia contra o herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1) foi demonstrada ser eficaz tanto *in vitro*, quanto *in vivo* no tratamento de pessoas com lesões orais (Ramalho et al. 2015; Silva et al. 2005).

A sensibilidade dos vírus aos procedimentos fotodinâmicos foi primeiramente relatada na década de 1930, onde observou-se a ação virucida do fotossensibilizador azul de metileno (Perdrau 1933). Nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas moléculas ativas e pelo incremento de tecnologias de luz (laser, LED, etc.), as técnicas fotodinâmicas para a inativação de vírus vêm sendo melhor exploradas (Costa et al. 2012). A inativação fotodinâmica é um método simples e controlável, e se baseia na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ser radicais livres e/ou oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Esta tecnologia requer a ação combinada de oxigênio, luz e um fotossensibilizador, que absorve e usa a energia da luz para produzir as ROS (Derosa & Crutchley 2002).

Diferentes porfirinas têm sido investigadas pelo seu potencial virucida. Há relatos do uso desses componentes para a inativação de vírus, como o causador da



hepatite A (Casteel et al. 2004), e do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Vzorov et al. 2002). A alta capacidade de mutação viral e o potencial de resistência a antivirais que alguns vírus possuem, bem como a busca pelo desenvolvimento de novas drogas antivirais, tem motivado o estudo e a investigação das porfirinas como antivirais ou pela sua capacidade virucida (Tamalet et al. 2000).

Além do uso de porfirinas e/ou outros fotossensibilizadores na terapia antiviral, é possível que esses componentes sejam úteis na inativação de vírus em soluções de uso em laboratórios de pesquisa e diagnóstico. O soro fetal bovino (SFB) e a tripsina são reagentes utilizados na cultura celular e têm sido a fonte de contaminação de produtos farmacêuticos e vacinas pelos vírus da diarreia viral bovina (BVDV), parvovírus bovino (BPV), circovírus suíno (PCV) e parvovírus suíno (PPV) (Oliveira 2013; Gagnieur et al. 2014). Embora a utilização de raios gama tem se mostrado eficiente para descontaminar essas soluções, essa técnica pode alterar importantes propriedades do soro e, assim, diminuir a sua qualidade (Nims et al 2011). Assim, é necessária a investigação e busca por novas alternativas terapêuticas e também para uso na descontaminação de reagentes e soluções de uso laboratorial. Outra possibilidade de aplicação da atividade virucida das porfirinas poderia ser como um possível inativante para vacinas víricas, substituindo os atuais que podem ocasionar alteração da conformação ou a acessibilidade da maioria dos epitopos durante o período inicial de inativação (Blackburn & Besselaar, 1991).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade virucida de duas porfirinas tetra-platinadas (4-PtTPyP e 3-PtTPyP) frente a vírus de bovinos. Para tal, foram escolhidos representantes das principais classes biológicas e estruturais de vírus: vírus com genoma DNA envelopados (herpesvírus bovino 1, BoHV-1; vírus da vaccínia, VACV) e não envelopados (adenovírus bovino, BAV); e vírus com genoma

RNA envelopados (vírus da diarreia viral bovina, BVDV; vírus da estomatite vesicular) ou sem envelope (enterovírus bovino, BEV).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Delineamento experimental.** O trabalho teve como objetivo avaliar a atividade virucida de duas porfirinas tetra-platinadas (3 e 4-PtTPyP) frente a vírus de bovinos, representativos das classes de vírus DNA e RNA, com e sem envelope, bem como contra os vírus vaccínia (VACV) e da estomatite vesicular (VSV) que possuem importância pelo impacto econômico e pelo potencial zoonótico. Inicialmente, foi determinada a dose citotóxica dos compostos pelo teste de MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) (Mosmann, 1983). A maior concentração dos compostos que não foi citotóxica foi utilizada como dose máxima nos testes virucidas. Além disso, 1/10 da dose máxima não citotóxica também foi utilizada nos ensaios a fim de verificar o potencial virucida dependente da foto-ativação do composto. Neste teste, os vírus foram incubados com as porfirinas e expostos à luz em diferentes tempos (0, 15, 30 e 60 min). A atividade virucida foi determinada pela mensuração dos títulos virais das amostras-teste em relação aos controles, após o período de exposição aos compostos na presença da luz.

**Vírus e células.** Foram utilizados os seguintes vírus de bovinos: vírus da diarreia viral bovina (BVDV), herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), enterovírus bovino (BEV) e adenovírus Bovino (BAV). Na categoria de vírus RNA envelopado foi utilizado o BVDV (cepa Singer); o BoHV-1 (cepa Cooper) como um vírus DNA envelopado, o BEV (isolado SV 89/91) como um vírus RNA não envelopado, e o BAV como vírus DNA não envelopado. Além desses, foram utilizados dois vírus de interesse veterinário,

devido ao potencial zoonótico (vírus da vaccínia [VACV]) e econômico-sanitário (vírus da estomatite vesicular [VSV]).

A amplificação e a quantificação dos vírus foram realizadas em células de rim de bovino (MDBK), mantidas com meio essencial mínimo (MEM), e suplementadas com antibióticos (penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL) e antifúngicos (anfotericina 250 µg/mL). O VACV será amplificado em células de rim de macaco-verde africano (VERO), mantidas com Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) e igualmente suplementadas com antibióticos e antifúngicos. Os vírus foram quantificados por diluição limitante, sendo os títulos virais calculados de acordo com Reed & Muench (1938). As células foram suplementadas com 10% de soro equino e mantidas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

**Obtenção das porfirinas.** As porfirinas (Figura 1) foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita por Naue et al. (2009), com modificações, pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (Tasso et al. 2017).

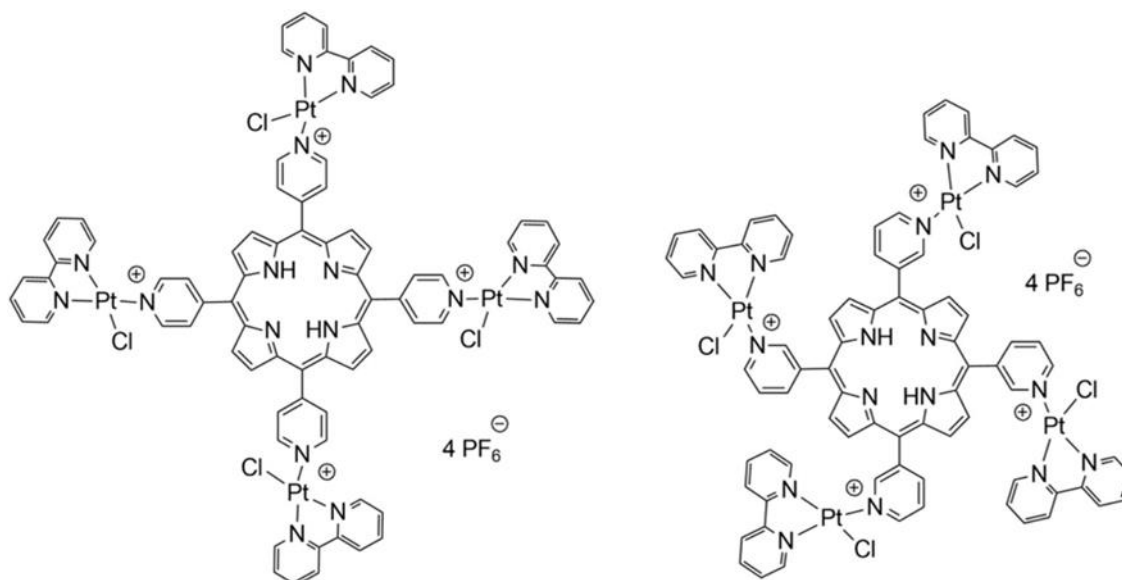


Fig.1. Estrutura das porfirinas tetraplatinadas, na estrutura da esquerda a platina se liga na posição para do anel aromático (4-PtTPyP), e na estrutura da direita a platina se liga na posição meta do anel aromático (3-PtTPyP).

**Testes de viabilidade celular/citotoxicidade (MTT).** A toxicidade das porfirinas em células MDBK foi avaliada pelo teste de MTT, conforme descrito por Mosmann (1983)

com modificações. Para isso, foram preparadas placas de 96 cavidades com células MDBK na concentração de  $1,8 \times 10^6$  célula/placa. Após 24h, foram adicionados os compostos em diferentes concentrações e as placas foram incubadas por 72h. Após este período, foi adicionado MTT (0,08%), e os cultivos foram incubados em estufa de CO<sub>2</sub> por 3h. Após a formação de coloração violácea foi removido o sobrenadante e acrescentado 200µl de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550nm, e os resultados foram analisados estatisticamente pelo método de análise de variância (ANOVA) utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 ( $p < 0,05$ : significância estatística).

**Ensaio de atividade virucida.** A atividade virucida das porfirinas foi avaliada pelo ensaio virucida utilizando a terapia fotodinâmica (PDT), que envolve a exposição de um determinado agente à um fotossensibilizador (3 e 4-PtTPyP) e a uma fonte de luz.

Os testes foram realizados com concentrações pré-determinadas de cada vírus (BVDV:  $10^{6,9}$  DICC<sub>50</sub>/ml, BoHV-1:  $10^{6,7}$  DICC<sub>50</sub>/ml, BEV:  $10^{7,3}$  DICC<sub>50</sub>/ml, BAV:  $10^{5,9}$  DICC<sub>50</sub>/ml, VACV:  $10^{5,5}$  DICC<sub>50</sub>/ml e VSV:  $10^{7,3}$  DICC<sub>50</sub>/ml) frente à doses baixas (0,91 µM) e altas (9,1 µM) de cada uma das porfirinas. Em microtubos, foram incubados 200ul de cada solução viral com 5ul na maior concentração e 0,5ul na menor concentração de cada uma das porfirinas. Essas soluções foram expostas à luz artificial compostas por fitas de LED contendo 4,28W, por 0, 15, 30 e 60 min. A distância entre a fonte de luz e a suspensão viral com o composto foi de 5 cm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando soluções contendo vírus e meio essencial mínimo (controle viral – CV), e vírus e composto sem exposição à luz (controle sem foto-ativação - CVSL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após cada período de exposição à luz, cada replicata foi submetida à quantificação viral por diluição limitante. Após 72h, foi determinado o potencial de

inativação viral das porfirinas, comparando-se os títulos virais das amostras incubadas com o composto e expostas à luz, com o título do CV e do CVSL. Os títulos virais de cada tempo de incubação foram calculados de acordo com Reed & Muench (1938). A capacidade de redução dos títulos virais nas soluções submetidas à terapia fotodinâmica (PDT) foi determinada pela análise de variância (ANOVA) utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 ( $p < 0,05$ : significância estatística).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambas as porfirinas (3 e 4-PtTPyP) apresentaram atividade virucida frente aos vírus envelopados (BoHV-1, BVDV, VACV e VSV), mas foram incapazes de inativar os vírus sem envelope (BAV, BEV). Inicialmente, os testes de atividade virucida foram realizados com a maior dose não citotóxica de ambas porfirinas (9,1  $\mu\text{M}$ ). Porém, nesta concentração os compostos apresentaram efeito virucida marcante mesmo sem exposição à luz. Assim, posteriormente foram realizados ensaios de atividade virucida utilizando uma concentração inferior (0,91  $\mu\text{M}$ ) das porfirinas, com a finalidade de avaliar a atividade virucida relacionada à foto-ativação do composto.

Os ensaios com a porfirina 3-PtTPyP na concentração de 9,1  $\mu\text{M}$  resultaram na inativação completa (ou até um nível indetectável de infectividade) dos vírus envelopados (Figura 2). A atividade virucida foi completa frente ao BVDV e VSV apenas pela exposição das suspensões virais ao composto, sem necessidade de foto-ativação. Para o BoHV-1 e VACV, a inativação completa foi observada após 15min de exposição à luz. A incubação do VACV com 9,1  $\mu\text{M}$  da porfirina 3-PtTPyP resultou em imediata redução de 4 logs do título viral e na inativação viral total a partir de 15 min de contato do composto, mesmo sem exposição à luz. Não foi observada atividade virucida frente aos vírus sem envelope (Figura 2).

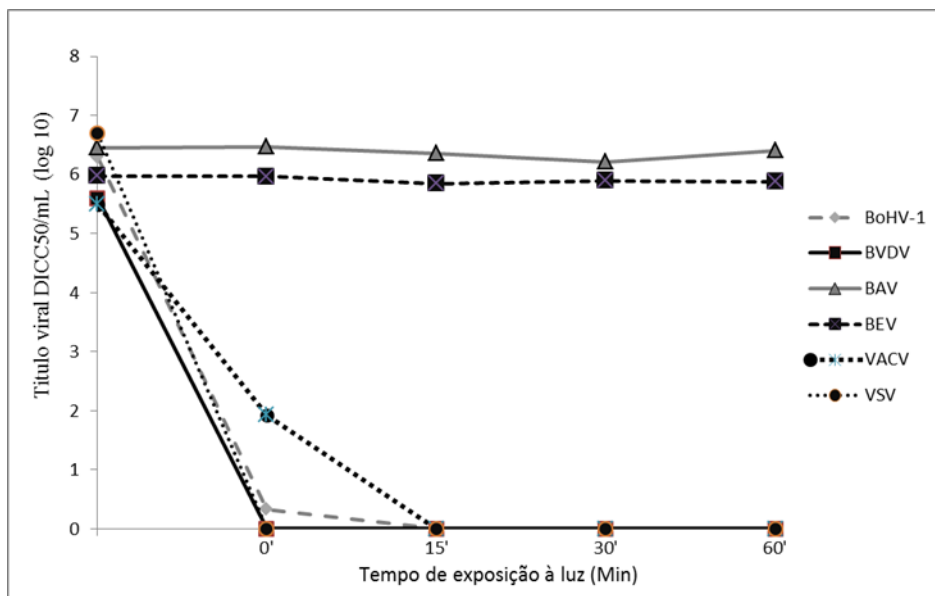


Fig.2. Atividade virucida da porfirina 3-PtTPyP na concentração de  $9,1\mu\text{M}$ . A figura apresenta a média dos títulos virais após diferentes tempos de exposição à luz.

Quando em concentração 10 vezes inferior ( $0,91\mu\text{M}$ ), a atividade virucida da porfirina 3-PtTPyP frente aos vírus envelopados foi dependente de exposição à luz (Figura 3).

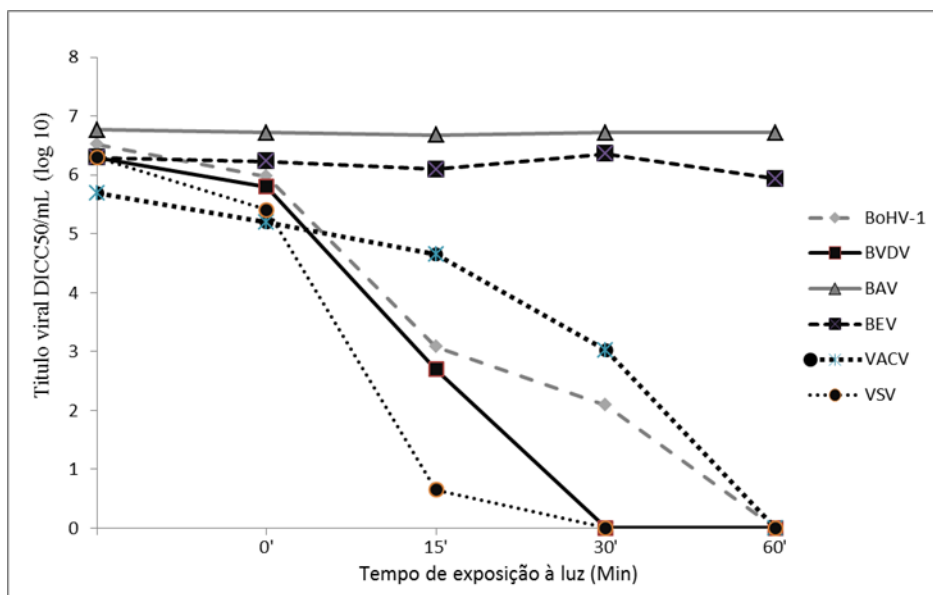


Fig.3. Atividade virucida da porfirina 3-PtTPyP na concentração de  $0,91\mu\text{M}$ . A figura apresenta a média dos títulos virais após diferentes tempos de exposição à luz.

Para os vírus envelopados a inativação foi detectada a partir de 15 min de fotoinativação, atingindo inativação completa do BVDV e VSV após 30 min. Para o VACV e

BoHV-1, a redução na infectividade foi observada gradualmente, a partir de 15min de exposição e atingindo inativação viral completa após 60min de exposição à luz. Não foi observada atividade virucida frente aos vírus sem envelope (Figura 3).

Esses resultados demonstram que, quando utilizada em altas concentrações, a porfirina 3-PtTPyP exerce atividade virucida frente a vírus envelopados independente da ativação pela luz. Essa atividade provavelmente ocorre devido à interação direta do composto com componentes do envelope viral, necessários à infectividade viral, pois não foi verificada frente a vírus não envelopados (Silva et al. 2005; Awad et al. 2016). Os ensaios com a porfirina 4-PtTPyP na concentração de  $9,1\mu\text{M}$  também resultaram na inativação de vírus envelopados mesmo na ausência de luz (Figura 4). Essa inativação foi completa para o BoHV-1, BVDV e VSV logo após a exposição das suspensões virais ao composto, e incompleta para o VACV. Para este vírus, a inativação completa da infectividade foi observada após 15 min de exposição à luz. Nenhuma redução de infectividade foi detectada nos vírus sem envelope, mesmo após 60 min de exposição (Figura 4).

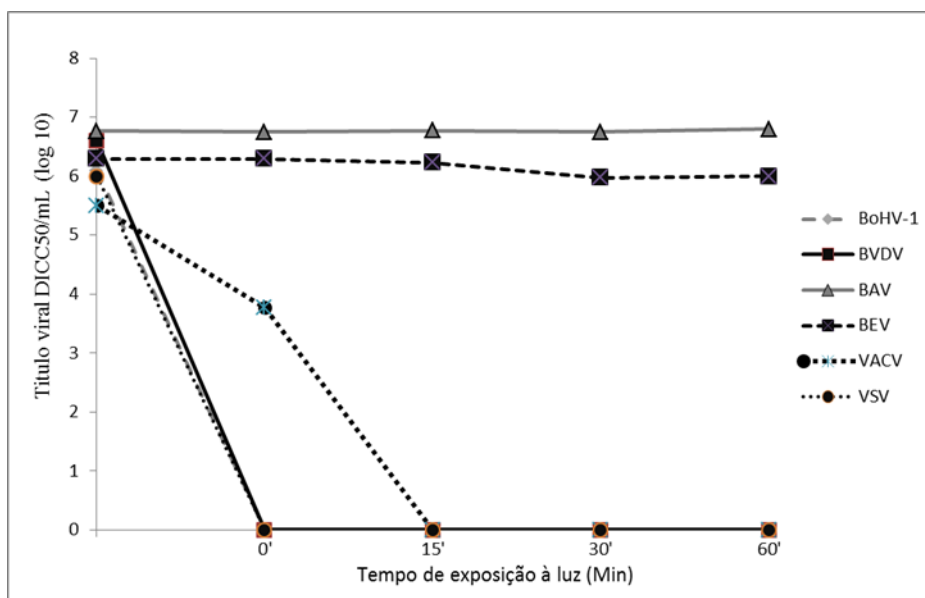


Fig.4. Atividade virucida da porfirina 4-PtTPyP na concentração de  $9,1\mu\text{M}$ . A figura apresenta a média dos títulos virais após diferentes tempos de exposição à luz.

Quando testada na concentração de  $0,91\mu\text{M}$ , a porfirina 4-PtTPyP produziu redução gradual de infectividade dos vírus envelopados, de acordo com o tempo de exposição à luz (Figura 5).

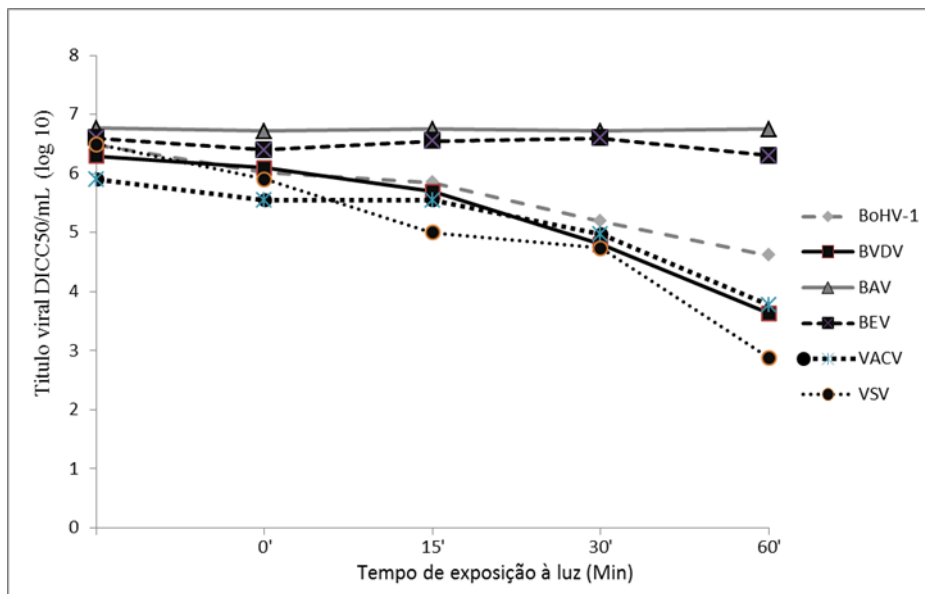


Fig.5. Atividade virucida da porfirina 4-PtTPyP na concentração de  $0,91\mu\text{M}$ . A figura apresenta a média dos títulos virais após diferentes tempos de exposição à luz.

Essa redução foi observada a partir dos 15 min e atingiu, aproximadamente, 2 log para o BoHV-1 e VACV, e aproximadamente 3 log para o BVDV e 4 log para VSV, após 60 min de foto-ativação. Novamente, nenhuma redução de infectividade foi observada para os vírus não envelopados, mesmo após 1h de exposição à luz (Figura 5). Esses resultados demonstram que a porfirina 4-PtTPyP, em altas concentrações, também possui atividade virucida frente a vírus envelopados na ausência da luz. Em concentrações 10 vezes menor ( $0,91\mu\text{M}$ ) esta porfirina possui atividade frente a estes vírus na dependência de exposição à luz, e que esta atividade é diretamente relacionada ao tempo de exposição.

O mecanismo da inativação fotodinâmica baseia-se na capacidade do fotossensibilizador de absorver energia da luz e transferi-la para a molécula de oxigênio (Costa et al. 2012). Essa transferência ocorre basicamente por dois mecanismos: o mecanismo do tipo I é caracterizado pela transferência de elétrons entre o composto



fotossensibilizador excitado e um substrato, gerando radicais livres, os quais podem reagir com o oxigênio e formar espécies reativas (como os radicais superóxido) que, quando protonados, podem levar a produção de peróxido de hidrogênio e oxigênio, ou radicais hidroxil altamente reativos. No mecanismo do tipo II, o fotossensibilizador excitado pode transferir o excesso de energia para a molécula de oxigênio, retornando ao seu estado basal e, assim, produzir um oxigênio singleto excitado, que é altamente eletrofílico. Este oxigênio singleto excitado pode interagir com enzimas, levando à inibição da síntese de proteínas e alterações no DNA, causando interferência com a sua transcrição e replicação, com consequente morte celular e/ou inativação viral (Costa et al. 2012). Em razão das reações de transferência de energia ocorrerem de forma mais rápida do que as reações de transferência de elétrons, o mecanismo do tipo II é geralmente favorecido nas reações de foto-oxidação (Ochsner 1996).

Semelhante ao que acontece com ácidos nucleicos e proteínas, os lipídeos insaturados são alvos do ataque de radicais livres e íons oxigênio ( $O_2$ ). As reações de peroxidação lipídica podem alterar a conformação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Costa et al. 2012). Já está estabelecido que as atividades de peroxidação, abstração de hidrogênio e a oxidação de resíduos de aminoácidos, podem resultar na peroxidação lipídica, *cross-linking* de peptídeos e degradação de proteínas que resultam no aumento da permeabilidade do envelope viral a íons  $Na^+$  (sódio) e  $K^+$  (potássio), destruição do envelope e alterações nas proteínas de superfície, levando à perda da infectividade viral (Wainwright, 2003).

O mecanismo pelo qual as porfirinas tetra-platinadas inativaram os vírus envelopados utilizados neste estudo não foi determinado. Na caracterização inicial, as duas porfirinas apresentaram alta produção de  $O_2$  singleto e fotocitotoxicidade quando irradiadas com luz verde em baixa dose ( $1J/cm^2$ ) (Tasso et al. 2017). Além disso, a

porfirina 3-PtTPyP apresentou maior anfifilicidade, o que lhe permitiu maior interação com membranas lipídicas do que a porfirina 4-PtTPyP (Tasso et al. 2017). Essa propriedade poderia explicar a atividade virucida mais pronunciada da porfirina 3-PtTPyP em relação à porfirina 4-PtTPyP sobre os vírus com envelope, já que os lipídios formam a base estrutural da membrana lipoproteica que constitui o envelope dos vírus (Flores 2012). Assim, sugere-se que a ação dessas porfirinas ocorra sobre o envelope viral, produzindo alterações conformacionais e/ou químicas nos lipídios e proteínas do envelope, resultando em redução da capacidade das partículas víricas em interagir com os receptores celulares para penetrar e iniciar a replicação. Essa hipótese é fortalecida pelo fato de que a ação dos compostos foi observada apenas nos vírus envelopados. A inativação de vírus envelopados das famílias *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae* e *Arenaviridae* foi comprovada após o uso da clorofilida, uma porfirina alquilada (Guo et al. 2011). Assim, como observado no uso das porfirinas tetra-platinadas, a clorofilida não apresentou atividade antiviral contra o adenovírus, sugerindo que o composto é menos ativo ou inativo contra vírus não envelopados.

Não foi observado efeito virucida das porfirinas tetra-platinadas em vírus não envelopados, independentemente do tipo de ácido nucleico (BAV e BEV). Embora resultados semelhantes tenham sido observados em experimentos com vírus não envelopados (Guo et al. 2011), o uso de duas porfirinas catiônicas (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) foram eficazes em inativar, ao limite de detecção, dois bacteriófagos não envelopados de genoma RNA e DNA (T4-like e Qb) após 60, 90 e 180 min de exposição à luz (Costa et al. 2012, 2013). O mecanismo de inativação desses compostos é, provavelmente, diferente dos desencadeados pelas porfirinas tetra-platinadas e, possivelmente, deriva de danos causados nos ácidos nucleicos desses vírus (Costa et al. 2012).

Além da atividade virucida dependente da exposição à luz, quando usadas em altas concentrações, as duas porfirinas apresentaram atividade virucida independente de luz contra vírus envelopados. O efeito virucida independente do estímulo luminoso já foi demonstrado para o vírus da hepatite A, e sugere-se que seja o resultado de mudanças conformacionais na estrutura de proteínas do capsídeo viral induzidas por determinadas porfirinas (Casteel et al. 2004). Além disso, já foi demonstrado que a inativação enzimática na ausência de luz resulta de mudanças conformacionais induzidas pelo contato direto das porfirinas nas proximidades ou nos sítios catalíticos de enzimas (Afonso et al. 1999).

A atividade fotodinâmica por porfirinas para inativar patógenos no sangue, plasma ou plaquetas para uso em hemoterapia já tem sido explorada há anos (Matthews et al. 1992). O tratamento fotodinâmico do sangue resulta em inativação do vírus do herpes simplex 1 (HSV-1), HIV-1, citomegalovírus e vírus da imunodeficiência dos símios, sem danificar eritrócitos, fatores de complemento e imunoglobulinas (Matthews et al. 1992). Além desses vírus, os vírus das hepatites A, B e C, parvovírus humano B19 e vírus linfotrópico tipos I e II também tem sido inativados *in vitro* por tratamentos fotodinâmicos (Cheng et al. 2010, North et al. 1992, Morh et al. 1997). Assim, considerando a eficácia da atividade fotodinâmica frente a importantes vírus humanos em produtos biológicos, a atividade virucida das porfirinas pode apresentar importantes aplicações na pesquisa, diagnóstico, tratamento e indústria de desenvolvimento em virologia. Essa atividade pode ser explorada como alternativa aos métodos atuais de inativação viral em ambientes, equipamentos (incubatórios, ordenhadeiras) e, como método de inativação viral na produção de vacinas inativadas. Também pode ter aplicação na inativação de agentes virais contaminantes de produtos biológicos como soro fetal bovino (SFB) e tripsina (Gagnieur et al, 2014). Além disso, a atividade

virucida de porfirinas pode ser explorada no tratamento tópico de lesões causadas por vírus epiteliotrópicos como o VACV e herpesvírus bovinos, entre outros.

### **CONCLUSÃO**

As porfirinas 3 e 4-PtTPyP apresentaram atividade virucida frente a vírus envelopados de bovinos após ativação fotodinâmica, e quando em concentrações elevadas, atuaram diretamente sobre a infectividade viral mesmo não ativadas pela luz. As porfirinas tetra-platinadas não apresentaram atividade virucida frente a vírus não envelopados.

## REFERÊNCIAS

Afonso, S. G., Enriquez de Salamanca, R., & Batlle, A. D. C. 1999. The photodynamic and non-photodynamic actions of porphyrins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32(3): 255-266.

Awad, M. M., Tovmasyan, A., Craik, J. D., Batinic-Haberle, I., & Benov, L. T. 2016. Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17): 7679-7688.

Blackburn, N. K., Besselaar, T. G. 1991. A study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins using monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods* 33 (3): 367-374.

Casteel, M. J., Jayaraj, K., Gold, A., Ball, L. M., & Sobsey, M. D. 2004. Photoinactivation of hepatitis A virus by synthetic porphyrins. *Photochemistry and Photobiology*, 80(2): 294-300.

Cheng, Y., Tsou, L. K., Cai, J., Aya, T., Dutschman, G. E., Gullen, E. A., Grill S. P., Chen, A. P., Lindenbach, B. D., Hamilton A. D. & Cheng, Y. C. 2010. A novel class of meso-tetrakis-porphyrin derivatives exhibits potent activities against hepatitis C virus genotype 1b replicons in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1): 197-206.

Costa, L., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P., Cunha, Â., & Almeida, A. 2012. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses*, 4(7): 1034-1074.

Costa, L., Faustino, M. A., Tomé, J.P.C., Neves, M. G.M.S., Tomé, A.C. Cavaleiro, J.A.S., Cunha A., & Almeida, A. 2013. Involvement of type I and type II

mechanisms on the photoinactivation of non-enveloped DNA and RNA bacteriophages. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 120: 10-16.

Derosa, M. C. & Crutchley, R. J. 2002. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* 233: 351-371.

Flores, E.F. 2012 Estrutura e composição dos vírus. p.15-24. In: *Virologia veterinária*. 2º ed. Editora UFSM, Santa Maria.

Gagnieur, L., Cheval, J., Gratigny, M., Hébert, C., Muth, E., Dumarest, M., & Eloit, M. 2014. Unbiased analysis by high throughput sequencing of the viral diversity in fetal bovine serum and trypsin used in cell culture. *Biologicals*, 42(3): 145-152.

Guo, H., Pan, X., Mao, R., Zhang, X., Wang, L., Lu, X., Chang, J., Guo, J., Passic, S., Krebs, F.C., Wigdahl, B., Warren, T.K., Retterer, C.J., Bavari, S., Xu, X., Cuconati, A., & Block, T.M. 2011. Alkylated porphyrins have broad antiviral activity against hepadnaviruses, flaviviruses, filoviruses, and arenaviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(2): 478-486.

Matthews, J. L., Sogandares-Bernal, F., Judy, M., Gulliya, K., Newman, J., Chanh, T., & Marengo-Rowe, A. 1992. Inactivation of viruses with photoactive compounds. *Blood Cells* 18(1): 75-88.

Mohr, H., Bachmann, B., Klein - Struckmeier, A., & Lambrecht, B. 1997. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochemistry and Photobiology* 65(3): 441-445.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55-63.

Naue, J. A., Toma, S. H., Bonacin, J. A., Araki, K., & Toma, H. E. 2009. Probing the binding of tetraplatinum (pyridyl) porphyrin complexes to DNA by means of surface plasmon resonance. *Journal of inorganic biochemistry* 103(2): 182-189.

Nims, R. W., Gauvin, G., & Plavsic, M. 2011. Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and mollicutes—a review. *Biologicals* 39(6): 370-377.

North, J. Freeman, S., Overbaugh, J., Levy, J., Lansman, R. 1992. Photodynamic inactivation of retrovirus by benzoporphyrin derivative: A feline leukemia virus model. *Transfusion* , 32:121–128.

Ochsner, M. 1996. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 39(1): 1-18.

de Oliveira, T. F. P., Fonseca, A. A., Camargos, M. F., de Oliveira, A. M., Cottorello, A. C. P., dos Reis Souza, A., Almeida, I.G. & Heinemann, M. B. 2013. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*, 41(6): 407-414.

Perdrau, J. R. & Todd, C.. 1933. The photodynamic action of methylene blue on certain viruses. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 112 (777): 288-298.

Ramalho, K. M., Rocha, R. G., Correa-Aranha, A. C., de Barros Cunha, S. R., Simões, A., Campos, L., & de Paula Eduardo, C. 2015. Treatment of herpes simplex labialis in macule and vesicle phases with photodynamic therapy. Report of two cases. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 12(2): 321-323.

Reed, L. J.; H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* 27(3):493-497.

Silva, E. M., Giuntini, F., Faustino, M. A., Tomé, J. P., Neves, M. G., Tomé, A. C., Silva, A.M.S., Santana-Marques, M.G. & Ferrer-Correia, A.J. 2005. Synthesis of

cationic  $\beta$ -vinyl substituted meso-tetraphenylporphyrins and their in vitro activity against herpes simplex virus type 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15(14): 3333-3337.

Tamalet, C., Pasquier, C., Yahi, N., Colson, P., Poizot - Martin, I., Lepeu, G., Gallais, H., Massip, P., Puel, J., & Izopet, J. 2000. Prevalence of drug resistant mutants and virological response to combination therapy in patients with primary HIV - 1 infection. *Journal of Medical Virology*, 61(2): 181-186.

Tasso, T. T., Tsubone, T. M., Baptista, M. S., Mattiazzi, L. M., Acunha, T. V., & Iglesias, B. A. 2017. Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. *Dalton Transactions*, 46(33): 11037-11045.

Vzorov, A. N., Dixon, D. W., Trommel, J. S., Marzilli, L. G., & Compans, R. W. 2002. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by porphyrins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12): 3917-3925.

Wainwright, M. 2003. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21 510 /520 .

Yamauchi, M. Honda, N., Hazama, H., Tachikawa, S., Nakamura, H., Kaneda, Y., & Awazu, K. 2016. Effective photodynamic therapy in drug-resistant prostate cancer cells utilizing a non-viral antitumor vector (a secondary publication). *Laser Therapy*. 25 (1): 55-62.



### 3 REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, H. & HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364. 2016.
- 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.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I., et al. Inactivation of Dengue and Yellow Fever viruses by heme, cobalt-protoporphyrin IX and tin-protoporphyrin IX. **Journal of Applied Microbiology**, v.120, n.3, p.790-804. 2016.
- BAXBY, D. The origins of vaccinia virus. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 136, n. 3, p. 453-455, Sep.1977.
- BAYONA, A. M. P. et al. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 89, n. 2, p. 192-206, 2017. doi: 10.1111/cbdd.12792.
- BLISS, J. M. et al. Susceptibility of Candida species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2000-2006, 2004. doi: 10.1128/AAC.48.6.2000-2006.2004
- CARGNELUTTI, J.F. et al. Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**,,, Columbia, v. 26, p.788-794, 2014. doi: 10.1177/1040638714553428.
- CORMICK, M. P. et al. Photodynamic inactivation of Candida albicans sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1592-1599, 2009. doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.07.026
- DAMASO, C. R. et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. **Virology**, New York, v. 277, n. 2, p. 439-449, Nov. 2000.
- DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. **Nature**, v. 3, p. 380 – 387, 2003.
- ESPOSITO, J. J. & FENNER, F. Poxviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFINET, D. E. **Fields Virology**. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2001. p. 2885-2981. Identification of a novel bovine enterovirus possessing highly divergent amino acid sequences in capsid protein. **BMC microbiology**, 17(1), 18.

GORMAN, A. et al. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 34, p. 10619-10631, 2004. Doi: 10.1021/ja047649e

JONES, C., & CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2007. doi:10.1017/S146625230700134X

LATIEF, M. A. et al. Inactivation of acyclovir-sensitive and-resistant strains of herpes simplex virus type 1 in vitro by photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Molecular Vision**, v. 21, p. 532, 2015.

LEITE, J. A. et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 11, n. 12, p. 1935-1938, Dec. 2005.

LOBATO, Z. I. P. et al. Outbreak of exantemal disease caused by vaccinia virus in human and cattle in Zona da Mata region, Minas Gerais. 2005. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 423-429, 2005.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Química Nova**. v. 23, p. 237 - 243, 2000.

MAMONE, L. et al. Photodynamic inactivation of planktonic and biofilm growing bacteria mediated by a meso-substituted porphyrin bearing four basic amino groups. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 222-229, 2016. Doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.05.026

MATSUMOTO, J. et al. Additive effect of heparin on the photoinactivation of Escherichia coli using tricationic P-porphyrins. **Bioorganic & Medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 23, p. 5258-5261, 2017. Doi: 10.1016/j.bmcl.2017.10.032

MILGROM, L. R. **The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds**. New York: Oxford University Press, 1997.

QUIROGA, E. D. et al. Photodynamic inactivation of Candida albicans by a tetracationic tentacle porphyrin and its analogue without intrinsic charges in presence of fluconazole. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 334-340, 2016. Doi:10.1016/j.pdpdt.2015.10.005

REHFELD, I. S. et al. Subclinical bovine vaccinia: An important risk factor in the epidemiology of this zoonosis in cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 233-235, 2017. doi:10.1016/j.rvsc.2017.03.022

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 105-121, 2010. doi:10.1016/j.cvfa.2009.10.007

RODRIGUEZ, L.L., et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. Cap.28, p.795-830.

ROSENDO, A.R.G.V. et al. Estomatite vesicular no município Umarizal, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.11, n. 3, 2013.

SANT'ANA, F.J.F. et al. Outbreaks of vesicular disease caused by *Vaccinia virus* in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010-2012). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 860-866, 2013.

SCHASTAK, S. et al. Efficient photodynamic therapy against gram-positive and gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11674, 2010. doi.org/10.1371/journal.pone.0011674.

SMIJS, T. G. et al. Preclinical Studies with 5, 10, 15-Tris (4-Methylpyridinium)-20-Phenyl-[21H, 23H]-Porphine Trichloride for the Photodynamic Treatment of Superficial Mycoses Caused by *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 3, p. 733-739, 2009. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00468.

SMITH, G. L. Genus orthopoxvirus: vaccinia virus. In: MERCER, A. A.; SCHMIDT, A.; WEBER, O. **Poxviruses**. Birkhauser Verlag Basel: Berlin, 2007. p. 1-33.

SOUSA, A. S. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: influence of the radiant energy and photosensitizer charge. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 111-114, 2016. Doi:10.1016/j.pdpdt.2016.03.004

STERNBERG, E. D.; et al. Christian. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.

TOMÉ, J. P. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of New Poly-S-lysine–Porphyrin Conjugates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 26, p. 6649-6652, 2004. DOI: 10.1021/jm040802v

VAATSTRA, B. L. et al. Clinicopathological features of 11 suspected outbreaks of bovine adenovirus infection and development of a real-time quantitative PCR to detect bovine adenovirus type 10. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 64, n. 5, p. 308-313, 2016. Doi:10.1080/00480169.2016.1198280

XING, B. et al. Multifunctional divalent vancomycin: the fluorescent imaging and photodynamic antimicrobial properties for drug resistant bacteria. **Chemical Communications**, v. 47, n. 5, p. 1601-1603, 2011. doi:10.1039/C0CC04434B

YIN, H. et al. Photoinactivation of cell-free human immunodeficiency virus by hematoporphyrin monomethyl ether. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 5, p. 943-950, 2012. doi 10.1007/s10103-011-1013-z

