

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

Carolina Gonzalez Urquhart

**FOTOINATIVAÇÃO DE BIOFILMES de *Pseudomonas aeruginosa*
UTILIZANDO PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS**

Santa Maria, RS
2022

Carolina Gonzalez Urquhart

**FOTOINATIVAÇÃO DE BIOFILMES de *Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO
PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêutica**.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Urquhart, Carolina
FOTOINATIVAÇÃO DE BIOFILMES de Pseudomonas aeruginosa
UTILIZANDO PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS / Carolina
Urquhart.- 2022.
52 f.; 30 cm

Orientador: Roberto Christ Vianna dos Santos
Coorientador: Bernardo Almeida Iglesias
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Biofilme 2. Porfirinas tetra-catiônicas 3.
Pseudomonas aeruginosa 4. Terapia fotodinâmica I. Christ
Vianna dos Santos, Roberto II. Almeida Iglesias,
Bernardo III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, CAROLINA URQUHART, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Carolina Gonzalez Urquhart

**FOTOINATIVAÇÃO DE BIOFILMES de *Pseudomonas aeruginosa*
UTILIZANDO PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 21 de setembro de 2022.

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

Bernardo Almeida Iglesias, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Leonardo Quintana Soares Lopes, Dr (CNEC)
(Videoconferência)

Patrícia Kolling Marquezan, Dr^a (UFSM)
(Videoconferência)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço, ao meu orientador professor Roberto Christ Vianna Santos, por me acolher em seu grupo de pesquisa desde a Iniciação Científica, e pela oportunidade e dedicação para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador professor Bernardo Inglesias por ceder as porfirinas para esse estudo e pelo comprometimento com esse trabalho.

Agradeço, principalmente aos meus pais Flávia Macedo Gonzalez e Pablo David Urquhart Perez, pelo amor, compreensão, incentivo e por não medirem esforços para me ajudar durante toda esta trajetória. Vocês são meus heróis, amo vocês!

Aos meus irmãos Camila e Diego pelos momentos de descontração, que ajudaram a esquecer o cansaço que o mestrado trás, pois sempre de alguma forma tentaram me ajudar, seja rindo ou simplesmente implicando um com o outro. Amo vocês!

Aos meus avós Ruby Urquhart e Olma Perez (*in memoriam*), por me iluminarem de onde estão. E minha avó Maria Virgínia pelo apoio. Amo vocês!

Ao grupo LAPEMICRO, pelo convívio diário e pela amizade. Em especial a minha amiga Ticiane Pinheiro por me ajudar de todas formas possíveis para a realização do trabalho e deixar esses anos mais leves.

Ao meu namorado Augusto, pelo carinho, amor, companheirismo, atenção e paciência. Obrigada por alegrar meus dias com as tuas palhaçadas diárias, amo você!

A Universidade Federal de Santa Maria, por proporcionar a realização do Mestrado em Ciências farmacêuticas.

A Capes e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, pelo suporte financeiro.

RESUMO

FOTOINATIVAÇÃO DE BIOFILMES de *Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS

AUTORA: Carolina Gonzalez Urquhart

ORIENTADOR: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna dos Santos

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista, que pode ser encontrado em diversos ambientes e está frequentemente associado a infecções graves em pacientes imunocomprometidos. Esse microrganismo possui uma notória capacidade de formar biofilmes, podendo assim colonizar dispositivos médicos, feridas e queimaduras. O biofilme é caracterizado como comunidade bacteriana envolta por uma matriz extracelular. Esse fenômeno torna os microrganismos mais resistentes resultando na diminuição da eficácia do tratamento com agentes antimicrobianos. Com isso, novos tratamentos estão sendo desenvolvidos para reduzir essa problemática, como a terapia fotodinâmica. Esse processo baseia-se no emprego de um fotossensibilizador e a subsequente aplicação de luz visível para geração de espécies reativas de oxigênio, acarretando assim, na morte celular. Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de porfirinas tetra-catiônicas frente a *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) e isolados clínicos. As determinações da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) das porfirinas **3-H₂TMePor** e **4-H₂TMePor** frente PA01 foram realizadas por ensaios de atividade antibacteriana em diferentes concentrações, sendo submetidas a condições de escuro e irradiação com luz branca por 120 minutos. O fotossensibilizador (FS) **4-H₂TMePor** foi escolhido para os demais testes, pois apresentou melhor atividade de CIM e CBM. O mecanismo de fotoinativação majoritário na utilização do FS foi mediado por oxigênio singleto. No ensaio de curva de viabilidade celular a porfirina **4-H₂TMePor** sob irradiação com luz branca na concentração de 2xCIM inibiu o crescimento bacteriano em 60 minutos e a CIM em 90 minutos. A porfirina **4-H₂TMePor** associada ao antimicrobiano Imipenem (IMP) frente a PA01 apresentou atividade sinérgica. Os biofilmes foram formados com cepa padrão PA01 e três isolados clínicos. Para avaliar a atividade antimicrobiana do FS sobre o biofilme formado se realizou o ensaio de destruição do biofilme, utilizando concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM referente a cada microrganismo. O FS associado ao IMP potencializou a destruição do biofilme frente PA01 quando comparado ao controle positivo. O ensaio de citotoxicidade com a porfirina **4-H₂TMePor** demonstrou ser atóxica frente as células saudáveis de queratinócitos humanos e fibroblastos de camundongos. A microscopia de força atômica apresentou morfologia comum para PA01. As propriedades nanomecânicas foram testadas comparando PA01 sem e com ½CIM de tratamento. O controle tratado apresentou menor força de adesão, maior deformação da parede celular e maior energia de dissipação comparando com PA01 não tratada, indicando interferência da porfirina diretamente com a parede celular do microrganismo mesmo em concentração abaixo da CIM. Diante desses resultados, a porfirina tetra-catiônica solúvel em água apresentou uma excelente atividade antimicrobiana e antibiofilme, além de apresentar boa segurança de uso, mostrando ser um potencial fotossensibilizador contra infecções causada por *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Biofilmes. Porfirinas tetra-catiônicas. *Pseudomonas aeruginosa*. Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

PHOTOINACTIVATION OF *Pseudomonas aeruginosa* BIOFILMS USING TETRA-CATIONIC PORPHYRINS

AUTHOR: Carolina Gonzalez Urquhart
ADVISOR: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna dos Santos
CO-ADVISOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that can be found in diverse environments and is often associated with serious infections in immunocompromised patients. This microorganism has a notorious ability to form biofilms, thus being able to colonize medical devices, wounds and burns. Biofilms are characterized as bacterial communities surrounded by an extracellular matrix. This phenomenon makes microorganisms more resistant, resulting in a decrease in the effectiveness of treatment with antimicrobial agents. As a result, new treatments are being developed to reduce this problem, such as photodynamic therapy. This process is based on the use of a photosensitizer and the subsequent application of visible light to generate reactive oxygen species, thus causing cell death. In this context, the present work aims to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activities of tetra-cationic porphyrins against *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) and clinical isolates. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of porphyrins **3-H₂TMePor** and **4-H₂TMePor** front PA01 were performed by assays of antibacterial activity in different concentrations, being submitted to dark conditions and irradiation with white light for 120 minutes. The photosensitizer (PS) **4-H₂TMePor** was chosen for the other tests, as it showed better MIC and MBC activity. The main photoinactivation mechanism in the use of PS was mediated by singlet oxygen. In the cell viability curve assay, **4-H₂TMePor** porphyrin under white light irradiation at a concentration of 2xMIC inhibited bacterial growth in 60 minutes and MIC in 90 minutes. Porphyrin **4-H₂TMePor** associated with the antimicrobial Imipenem (IMP) against PA01 showed synergistic activity. Biofilms were formed with standard strain PA01 and three clinical isolates. To evaluate the antimicrobial activity of PS on the biofilm formed, the biofilm destruction assay was performed, using concentrations of MIC, 2xMIC and 4xMIC for each microorganism. The PS associated with the IMP potentiated the destruction of the biofilm against PA01 when compared to the positive control. The cytotoxicity assay with porphyrin **4-H₂TMePor** proved to be non-toxic against healthy human keratinocyte cells and mouse fibroblasts. Atomic force microscopy showed a common morphology for PA01. The nanomechanical properties were tested comparing PA01 without and with ½MIC treatment. The treated control showed lower adhesion strength, greater cell wall deformation and greater dissipation energy compared to untreated PA01, indicating interference of porphyrin directly with the cell wall of the microorganism even at concentration below the MIC. In view of these results, water-soluble tetra-cationic porphyrin showed excellent antimicrobial and antibiofilm activity, in addition to presenting good safety of use, showing to be a potential photosensitizer against infections caused by *P. aeruginosa*.

Keywords: Biofilms. *Pseudomonas aeruginosa*. Photodynamic therapy. Tetra-cationic porphyrins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
3.1.1 Biofilme	12
3.1.2 Resistência antimicrobiana de <i>P.aeruginosa</i>	14
3.2 IMIPENEM.....	14
3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA E MECANISMO DE FOTOINATIVAÇÃO.....	15
3.4 FOTOSSENSIBILIZADORES PORFIRÍNICOS	18
4 MANUSCRITO.....	21
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
6. REFERÊNCIAS.....	46

APRESENTAÇÃO

As seções **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** apresentam tópicos com os assuntos investigados nesse estudo. A presente dissertação originou um **MANUSCRITO**, que aborda os itens: **Materias e Métodos**, **Resultados e Discussão** e **Referências**. O **MANUSCRITO** foi submetido para revista **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** que possuiu Fator de impacto: 3.577 e Qualis: B1. A seção **CONSIDERAÇÕES FINAIS** estão expostos as conclusões deste trabalho. Na seção **REFERÊNCIAS** abordam somente as citações que aparecem nas seções **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) é uma bactéria Gram-negativa de forma bacilar conhecida por ser um patógeno de enorme relevância clínica. Acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, vítimas de queimaduras e pacientes que fazem uso de dispositivos médicos invasivos (PACZKOWSKI et al., 2017; AZAM, 2019). O microrganismo apresenta fatores de virulência e secreta substâncias que contribuem para patogênese da doença (DRISCOLL et al 2007; BALASUBRAMANIAN et al., 2013; BOTELHO, 2019). A produção de fatores de virulência confere a *P. aeruginosa* o desenvolvimento de mecanismos de resistência frente aos antimicrobianos disponíveis no mercado (HIRSCH, 2010).

A bactéria apresenta uma notória capacidade de formar biofilme, assim sendo uma das principais causas de infecções persistente de *P. aeruginosa* (RÖMLING, 2012; PASICH et al., 2013; ASATI, 2017; THI, 2020). Os biofilmes são comunidades de microrganismos que se agrupam formando uma matriz de exopolissacarídeo (RYBTKE et al., 2015; RUMBAUGH, 2020). Diante disso, biofilmes bacterianos possuem estrutura complexa, resultando na resistência antimicrobiana, pois os fármacos enfrentam dificuldades para penetrar na sua estrutura (SHARMA et al., 2014). Nesse sentido, as infecções por *P. aeruginosa* são consideradas um grande problema de saúde pública.

Uma alternativa ao uso de antimicrobianos é a Terapia Fotodinâmica (TFD), que se baseia na combinação de um composto fotossensibilizador, que é ativado quando exposto a luz em um determinado comprimento de onda, gerando espécies reativas de oxigênio, causando oxidação dos componentes celulares resultando na morte bacteriana. Existem dois tipos de mecanismo, em ambos são geradas as chamadas espécies reativas de oxigênio (SHIBATA et al., 2000; CALIXTO, 2016). Essa terapia apresenta diversas vantagens em relação aos antimicrobianos, destacando-se o amplo espectro de ação, pois o fotossensibilizador pode agir em bactérias, fungos, vírus e protozoários (HAMBLIN, 2004; JORI et al., 2006).

As porfirinas são compostos fotossensibilizadores formados por um macrociclo tetrapirrólico, amplamente distribuídos na natureza e contribuem em diversas funções metabólicas de organismos vivos. Juntamente com esses aspectos, as porfirinas com a inserção de cargas em sua estrutura estão em destaque, pois possuem potencial antimicrobiano com TFD (JORI, 2004; BRAGA et al., 2014; GAMELAS et al., 2020). Modificações realizadas na estrutura das porfirinas como a inclusão de cargas positivas, alteram a cinética e

a aumentam a afinidade com as membranas celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ALVES, 2009; SIMÕES et al., 2016; MARCIEL et al., 2018).

Dessa forma, a TFD com porfirinas catiônicas pode ser uma alternativa ao uso de antimicrobianos, ou ainda, potencializar a ação destes agentes comercialmente disponíveis e, como consequência, reduzir o desenvolvimento da resistência bacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de porfirinas tetra-catiônicas frente à *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) e isolados clínicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima das porfirinas **3-H₂TMePor** e **4-H₂TMePor** frente PA01;
- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima da porfirina **4-H₂TMePor** frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Determinar a concentração inibitória mínima do antimicrobiano Imipenem frente PA01;
- Avaliar o possível mecanismo de fotoinativação da porfirina **4-H₂TMePor**;
- Avaliar a viabilidade celular da porfirina **4-H₂TMePor**;
- Avaliar o sinergismo do antimicrobiano Imipenem com a porfirina **4-H₂TMePor**;
- Verificar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de PA01 e isolados clínicos;
- Avaliar a atividade da porfirina **4-H₂TMePor** sobre biofilmes formados;
- Visualizar a morfologia da PA01 com e sem tratamento;
- Avaliar a citotoxicidade da porfirina **4-H₂TMePor**.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um Gram-negativo que se apresenta na forma de bacilo não esporulado, com dimensões entre 1,5 e 3 µm de comprimento e 0,5 µm de largura, conhecida por não utilizar glicose através de vias fermentativas (NÓUER, 2005; DRISCOLL et al., 2007). Esse microrganismo está presente no meio ambiente podendo ser encontrado em solo, água, vegetal e alguns animais (AZAM, 2019). Clinicamente é conhecida por ser um patógeno oportunista nosocomial que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, vítimas de queimaduras e pacientes que fazem uso de dispositivos como, cateteres, próteses, sondas dentre outros. Além disso, *P. aeruginosa* está frequentemente associada a infecções do trato urinário e do sistema respiratório, assim como dermatites, infecções dos tecidos moles, bacteremia e uma variedade de infecções sistêmicas (PACZKOWSKI et al., 2017; AZAM, 2019).

A habilidade de *P. aeruginosa* causar diversas infecções em diferentes grupos de pacientes e em indivíduos saudáveis é atribuída à sua versatilidade metabólica (BALASUBRAMANIAN et al., 2013). As infecções por *P. aeruginosa* são invasivas, toxigênicas e são caracterizadas pela produção de diversos produtos extracelulares que contribuem para a virulência e patogênese das doenças (DRISCOLL et al., 2007). Diante disso, os fatores de virulência relacionados a bactéria são lipopolissacarídeos, pili e flagelos. Flagelo e pili são responsáveis pela motilidade desse microrganismo facilitando a invasão e a aderência às células epiteliais do hospedeiro, ligando-se a receptores específicos (GOLOVKINE, 2016; MURRAY, 2010).

Os lipopolissacarídeos são os componentes da célula localizados na membrana externa, os quais estão inseridos na bicamada lipídica através de um domínio hidrofóbico, conhecido por lipídeo A, que está ligado a uma cadeia de açúcares chamada antígeno O. O lipídeo A e o antígeno O são responsáveis por provocar significativos processos inflamatórios no hospedeiro (STRATEVA, 2011; HUSZCZYNSKI, 2020; JURADO-MARTÍN, 2021).

P. aeruginosa produz e secreta fatores de virulência como: alginato, exoenzimas, elastases, *Quorum sensing* (QS), pigmentos entre outras substâncias. Diante disso, esse microrganismo possui alto grau de virulência (BALASUBRAMANIAN et al., 2013; BOTELHO, 2019; WAGENER, 2021). A produção de alginato confere a característica

mucoide de *P. aeruginosa*, tornando esse microrganismo ainda mais virulento e propício para formação de biofilme (RAMSEY, 2005; DRISCOLL et al., 2007).

O *Quorum sensing* é um sistema complexo de comunicação célula-célula que regula vários genes de microrganismos formadores de biofilmes. Essas moléculas são constantemente produzidas e recebidas em nível basal na célula bacteriana, quando a densidade populacional das bactérias aumenta, conseqüentemente a concentração de N-acil-homoserina lactonas (AHLs) também aumenta, e, então, elas se difundem e se acumulam no ambiente circundante formando o biofilme. Quando atinge um limiar (nível de QS), essas moléculas difundem-se novamente para o interior da célula microbiana e induzem a expressão de um conjunto de genes alvo, que alteram o comportamento do microrganismo (PACZKOWSKI et al., 2017; RASMUSSEN et al., 2005).

O sistema QS é responsável por controlar mais de 300 genes de *P. aeruginosa*, no qual regula diversas funções fisiológicas desse microrganismo, sendo as principais: virulência, capacidade de locomoção, esporulação, luminescência e formação de biofilme. A ativação da cascata QS promove a formação de biofilme no local da infecção, o que torna as condições mais favoráveis à persistência da *P. aeruginosa*. (SAUVAGE, 2020).

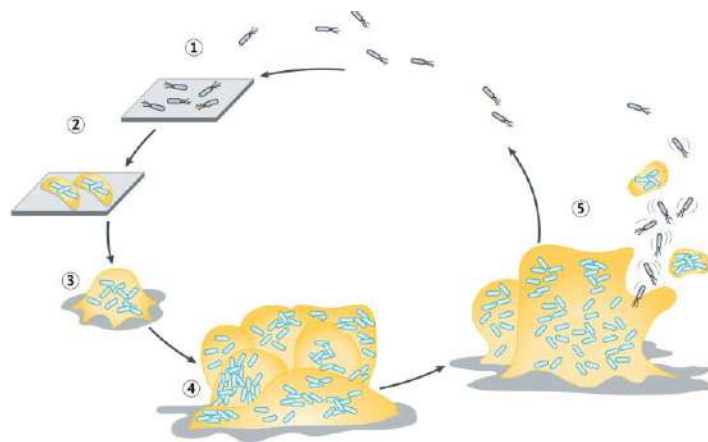
3.1.1 Biofilme

Os biofilmes são comunidades de bactérias que se ligam a uma superfície e são impermeáveis aos fármacos. Formam populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, sendo assim, essas estruturas podem ser constituídas por bactérias, fungos e/ou protozoários. Em consequência da associação entre os microrganismos, ocorre a formação de uma matriz de polímeros orgânicos extracelulares (RYBTKE et al., 2015). Através de análises microscópicas em ecossistemas aquáticos naturais, observou-se que mais de 99,9% das bactérias crescem em biofilmes e em tese, praticamente não existe superfície seja ela natural ou sintética que não possa vir a ser colonizada (HALL-STOODLEY, 2004).

A estrutura de um biofilme é dinâmica e está em permanente evolução para promover a disseminação das células bacterianas. O processo de formação do biofilme está ilustrado na figura 1, indicado pelas fases 1, 2, 3, 4 e 5. Na fase inicial, as células planctônicas se aderem a uma superfície sólida por meio de adesinas, flagelos e pili, em resposta a sinais ambientais (1). Na fase de desenvolvimento, as células sofrem alterações nos seus fenótipos, reprimindo a expressão dos flagelos e pili e iniciam a formação da matriz exopolissacarídica do biofilme, passando a ficar “irreversivelmente” aderentes à superfície (2). Logo, as células sésseis

agrupam-se mais e multiplicam-se levando a um maior amadurecimento do biofilme e ao início da sua “arquitetura” (3). Na fase seguinte, ocorre o amadurecimento total da arquitetura do biofilme, que apresenta em alguns locais o formato tipo cogumelo, característica dos biofilmes de *P. aeruginosa* (4). A disseminação ocorre na fase 5 no interior do biofilme, local onde algumas células readquirem estruturas de mobilidade, assim o biofilme se rompe e libera essas células para o meio ambiente (STOODLEY et al., 2002; ALVES, 2016; RUMBAUGH, 2020).

Figura 1: Esquema representativo das etapas de formação e desenvolvimento de biofilme de *P. aeruginosa*



Fonte: (Adaptado de RUMBAUGH, 2020).

Em geral, *P. aeruginosa* é conhecida pela sua capacidade de formar biofilme em diversos ambientes (THI, 2020). Esse patógeno coloniza e se desenvolve preferencialmente em implantes de dispositivos de uso clínico, superfícies inertes, tecidos mortos ou em tecidos vivos, como ocorre nas endocardites. Apesar dos biofilmes de *P. aeruginosa* normalmente estarem relacionados a infecções associadas a dispositivos médicos, encontram-se também em pacientes com queimaduras (RÖMLING, 2012; PASICH et al., 2013; ASATI, 2017).

Geralmente, as infecções por biofilme são mais lentas em comparação a células planctônicas na produção de sintomas evidentes. Mesmo em indivíduos com excelentes respostas imunológicas, os anticorpos não serão capazes de eliminar as bactérias que compõem o biofilme (PASICH et al., 2013). A estrutura complexa dos biofilmes dificulta o tratamento das infecções, pois substâncias tóxicas às células microbianas, como por exemplo, os antimicrobianos e antissépticos, enfrentam dificuldades para penetrar na estrutura (SHARMA et al., 2014).

3.1.2 Resistência antimicrobiana de *P.aeruginosa*

O microrganismo *P.aeruginosa* faz parte do grupo chamado ESKAPE, onde abrange seis patógenos que são responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais, dentre eles: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter ssp.* Esses microrganismos possuem cromossomos, plasmídeos e/ou transposons modificados com genes de resistência antimicrobiana (BOUCHER, 2009; AZAM, 2019). A Organização Mundial da Saúde, em 2017 divulgou uma lista de patógenos onde a bactéria *P.aeruginosa* inclui-se na lista classificada em agente crítico, como prioridade para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos (BOTELHO, 2019).

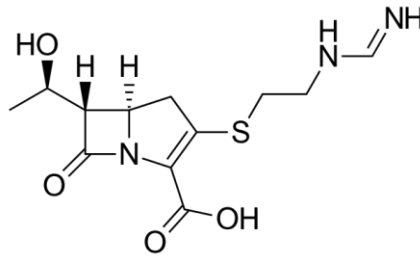
O uso extensivo dos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis contribui, de forma preponderante, para a rápida aquisição da resistência microbiana aos tratamentos, acarretando no aumento dos índices de mortalidade e morbidade de pacientes com infecções microbianas (FRIEDRICH et al., 2016). No caso da *P. aeruginosa*, a resistência aos fármacos é predominante, pelo fato de que este microrganismo possui diversos mecanismos de resistência (HIRSCH, 2010).

Os principais mecanismos de resistência utilizados por *P. aeruginosa* são classificados em: resistência intrínseca, adquirida e adaptativa. Resistência intrínseca inclui baixa permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo que expõem os antimicrobianos para fora da célula e a produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos. Quando a resistência ocorre por mutação e transferência dos genes entre os microrganismos através de plasmídeos, transposons ou profagos é chamada de resistência adquirida (BREIDENSTEIN, 2011). Já na resistência adaptativa envolve fatores ambientais, como falta de nutrientes, pH, e a presença de antimicrobianos assim, o microrganismo procura outra maneira de se defender como a formação de biofilme, que serve como uma barreira física para limitar o acesso de antimicrobianos às células bacterianas (DRENKARD, 2003).

3.2 IMIPENEM

Em 1970, a Tienamicina foi descoberta como um agente carbapenêmico de amplo espectro, mas possuía uma elevada instabilidade química. Diante disso, sua estrutura foi estabilizada com a adição do grupo N-formimidoil, resultando no surgimento do Imipenem (IMP), sua estrutura química está ilustrada na figura 2. (KAHAN, 1979; BUSH, 2016).

Figura 2: Estrutura química do Imipenem



Fonte: (Adaptado de BUSH, 2016).

O Imipenem é um antimicrobiano carbapenêmico da classe dos β -lactâmicos, possui um amplo espectro de ação e bom perfil de segurança contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BUSH, 2016; ALBUQUERQUE, 2020). Esse medicamento é comercializado em conjunto com cilastatina e teve sua aprovação em 1985 pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, para utilização em unidades de terapia intensiva, pneumonias e outra infecções. A cilastatina inibe a enzima desidropeptidase-I, impedindo o metabolismo renal do IMP assim, aumentando sua concentração no trato urinário e no plasma (CHIODINI, 1895; RHEE, 2018).

Os carbapenêmicos como o IMP, tem sua ação através da parede celular bacteriana. O agente antimicrobiano atravessa a parede celular através das porinas presentes na membrana externa da célula ligando a receptores PBPs (*Penicillin Binding Protein*), assim inibindo as reações de síntese da parede celular. Diante disso, a formação da parede celular é um desenvolvimento de formação e autólise ocorrendo ao mesmo tempo, quando inibe as PBPs, a autólise prevalece, portanto isso leva a um estresse celular, resultando na morte da célula bacteriana (PAPP-WALLACE, 2011; WILHELM, 2016).

3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA E MECANISMO DE FOTOINATIVAÇÃO

A Terapia Fotodinâmica é definida como uma reação fotoquímica empregada para promover a morte celular, por combinação de fotossensibilizadores, intermediários citotóxicos de oxigênio e luz em um determinado comprimento de onda. Este tratamento, é considerado ancestral, pois há relatos que os egípcios já utilizavam a luz solar em conjunto com compostos fotoreativos existentes em plantas para tratar lesões de pele como vitiligo. Comumente as plantas eram secas e reduzidas a pó, para serem aplicadas nas lesões e com a exposição ao sol

os compostos eram ativados e a pele adquiria a pigmentação normal (BONNETT, 2014; MCDONAGH, 2001).

Herman Von Tappeiner e Oscar Rabb estudaram a origem da TFD e relataram os efeitos decorrentes de fotossensibilização em paramécio e observaram a morte rápida desse protozoário, logo após a exposição à luz na presença do corante acridina. Posteriormente, Tappeiner expandiu os estudos com outros experimentos e sugeriu que a presença do oxigênio era essencial para que ocorresse a ação fotodinâmica (RABB 1900; VON TAPPEINER, 1903).

Contudo, o uso da luz ultravioleta (UV) e visível começou a ser melhor estudada nos séculos XIX e XX, resultando no prêmio Nobel de medicina em 1903 para Niels Ryberg Finsen pelos promissores resultados no combate de *Lupus vulgaris* por luz UV (HÖNIGSMANN, 2013). Nesse mesmo ano, Tappeiner e Jesionek realizaram a primeira aplicação clínica da TFD com o uso tópico de um corante denominado eosina e luz solar para tratar um câncer de pele (VON TAPPEINER, 1903).

Na década de 60, Lipson e Schwartz iniciaram estudos de uma nova substância sintetizada a partir da hematoporfirina (Hp), chamado HpD, a mesma foi testada em camundongos e ratos onde foi observado um acúmulo preferencial desse fármaco em células tumorais. Posteriormente, Lipson expos resultados positivos no tratamento de doenças tumorais, utilizando HpD e irradiação, assim no fim de 1960 ocorreu a aprovação da utilização da TFD como uma opção no tratamento de câncer (LIPSON, 1967; KALKA, 2000; NOGUEIRA, 2011).

A terapia fotodinâmica, em 1990, foi revitalizada por Kennedy e colaboradores, sendo considerado um marco para TFD em dermatologia, onde houve a introdução do ácido 5-aminolevulinico (ALA), um precursor metabólico que gera um acúmulo de fotossensibilizante endógeno, a protoporfirina IX (PpIX), sendo esse um potente fotossensibilizante que é degradada durante o processo de irradiação com fonte de luz específica (KENNEDY, 1990; ZHAO, 2010). Dessa forma, a TFD passou a ser uma alternativa para diversos tratamentos de câncer, doenças ginecológicas, periodontais, dermatológicas e infecções (DOLMANS, 2003; HONGCHARU et al., 2000; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; MAISCH, 2015).

A TFD obteve maior aplicação clínica no tratamento de câncer, dermatologia e oftalmologia, embora sua utilização no campo da microbiologia ocorresse de maneira mais lenta, pois em 1940, as penicilinas marcaram o início da utilização dos antimicrobianos, assumindo um papel importante no tratamento de doenças. No entanto, em 1945, obteve-se relatos de bactérias resistentes à penicilina, assim o fenômeno de resistência bacteriana

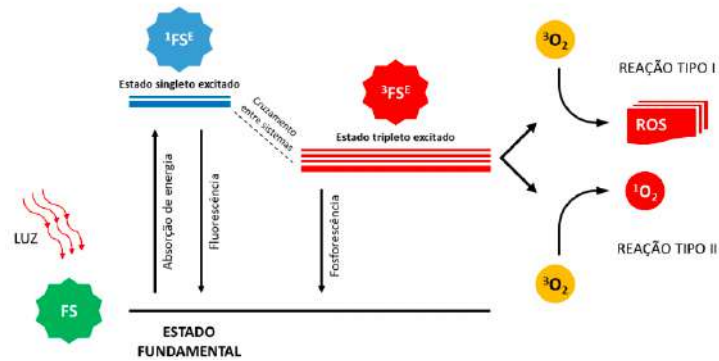
começou a ser observado. No início, esse problema foi resolvido com a introdução de novos antimicrobianos, entretanto com o passar dos anos foram marcados pela busca de agentes que não causassem resistência bacteriana (NIKAIDO, 2009; KHARKWAL et al., 2011; GAYNES, 2017).

Na década de 90, houve um aumento de microrganismos resistentes, resultante, em parte, do uso extensivo de antimicrobianos, assim a TFD ganhou um recomeço com finalidade antimicrobiana. Nesta mesma década, vários ensaios foram realizados com diversos fotossensibilizadores para fotoinativar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo os corantes fenotiazínicos os que mais evidenciaram a inativação microbiana. Posteriormente nos anos 2000, o desenvolvimento de ensaios *in vitro* e clínicos, utilizando TFD antimicrobiana aumentaram, assim diversos experimentos com bactérias, fungos e vírus, foram eficientes (HAMBLIN, 2004; WAINWRIGHT, 1998).

A inativação fotodinâmica de microrganismo apresenta algumas vantagens, por ser um método não invasivo, indolor e de implementação fácil. Mas para que essa terapia seja empregada de forma eficaz, alguns parâmetros devem ser instituídos, como a concentração, o tamanho do fotossensibilizador, sua lipofilicidade, presença ou não de algum íon metálico, os parâmetros de irradiação e eficácia na produção de oxigênio singlete. O efeito antimicrobiano baseia-se na utilização de um fotossensibilizador, que é ativado pela luz em determinado comprimento de onda e é capaz de formar espécies reativas de oxigênio ou oxigênio singlete, sendo responsável pela fotoinativação de células microbiana (MAISCH, 2007; SANTIN et al., 2014). Os métodos relacionados com a inativação por fotossensibilizador (FS) se caracteriza pelo acúmulo do mesmo na superfície da célula, assim como na distribuição pelo citoplasma, visto que, ambos os casos podem levar a morte da bactéria, por meio de danos no DNA ou na membrana. Assim, diversos compostos revelaram ter eficiência na fotoinativação de bactérias Gram-positivas, ao mesmo tempo em que em bactérias Gram-negativas a TFD parece ser mais resistente ao processo, por possuírem uma membrana externa (LUKSIENE, 2005; HAMBLIN, 2004).

O mecanismo de fotoinativação inicia-se quando um FS sofre um estímulo por luz e com a presença de oxigênio, o FS atua como espécie capaz de absorver luz, resulta em reações de transferência de energia intermolecular. Os dois mecanismos principais são: a foto-oxidação por espécies radicalares (Tipo I) e a foto-oxidação das moléculas de oxigênio a oxigênio singlete (Tipo II), demonstrado na figura 3 (SHIBATA et al, 2000; CALIXTO, 2016).

Figura 3: Diagrama dos mecanismos de fotoinativação



Fonte: (CALIXTO, 2016).

O FS absorve a luz em determinado comprimento de onda sendo excitado para o estado singleto ($^1\text{FS}^*$), assim podendo retornar ao seu estado fundamental por fluorescência ou passar pelo processo de inversão de “spin” chamado cruzamento de intersistemas partindo para o estado tripleto ($^3\text{FS}^*$), o mesmo pode retornar ao seu estado fundamental de energia por fosforescência. Assim, em ambos os mecanismos podem ser geradas espécies reativas de oxigênio (EROs). No estado tripleto, o mecanismo tipo I, as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem oxidar substratos orgânicos e/ou biomoléculas através de reações redox, por espécies do tipo ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, causando a destruição do microrganismo (LUKSIENE, 2003; NOWAK et al., 2013; CALIXTO, 2016). Já no mecanismo do tipo II, no estado tripleto excitado se forma diretamente, por transferência de energia, oxigênio singleto, sendo esta espécie extremamente reativa (OLIVEIRA et al., 2015).

3.4 FOTOSSENSIBILIZADORES PORFIRÍNICOS

Fotossensibilizadores são uns dos principais componentes da TFD podendo ser aplicado localmente ou sistematicamente. Esses compostos podem ser tóxicos ou atóxicos, sendo ativados, quando expostos a luz na região do visível, assim excitando-se e realizando uma série transferências moleculares de energia. Diversas substâncias são empregadas como FS, tendo em maioria pigmentos naturais. Uma das principais característica que um FS possui é produzir agentes citotóxicos para levar a morte celular (SHARMAN et al., 1999; RAGÀS, 2010). A fonte de luz utilizada no processo de fotossensibilização pode ser: lasers, diodos emissores de luz, lâmpadas incandescentes e fluorescentes. A escolha dessas fontes tem como

objetivo excitar o FS, provocando um efeito adverso mínimo nas células que não são alvos (BRANCALEON, 2002; PERUSSI, 2008).

Algumas propriedades e condições são necessárias para potencializar a ação e se obter um FS ideal como: síntese com alta pureza química; alto coeficiente de absorvidade molar na região do visível; baixa tendência à agregação em meio aquoso; especificidade pela célula-alvo; alta capacidade de produção de oxigênio singlete; ausência de toxicidade no escuro e na presença da luz (CALZAVARA et al., 2005; PERUSSI, 2008).

Os FS são classificados em determinadas famílias de compostos heterocíclicos, dentre eles, os mais comuns em TFD antimicrobiano são: fenotiazinas (azul de toluidina B, azul de metileno), acridinas, cianinas, merocianinas, macrociclos tetrapirrólicos (porfirinas, clorinas, ftalocianinas, naftalocianinas), psoralenos (furanocoumarinas), entre outros (WAINWRIGHT, 1998). Assim como, a membrana celular é o principal alvo dos FS, o mesmo penetra nas células, ou fica adsorvido à superfície para posteriormente ser ativado pela luz e ocorrer a destruição do microrganismo, por isso não é desenvolvido mecanismo de resistência (WINEKLER, 2007).

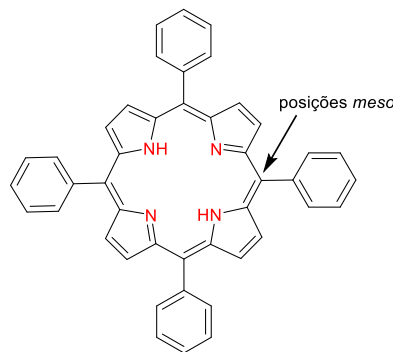
O grupo conhecido como primeira geração de FS são as hematoporfirinas, uma porfirina derivada do sangue. Já os de segunda geração parecem ser mais efetivos na produção de oxigênio singlete, pois são derivados de porfirinas ou de porfirinas sintéticas. Os de terceira geração ocorrem a variação na incorporação de conjugados, como anticorpos ou proteínas receptoras (PRAŽMO et al., 2016; STRATEN et al., 2017). Assim, o primeiro FS autorizado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de câncer foi o Photofrin[®], constituído por macrociclos porfirínicos derivados da hematoporfirina (HpD) (DEMIDOVA, 2004).

É extremamente importante escolher um FS ideal, para que o efeito fotodinâmico consiga permear a célula bacteriana e gerar EROs. A estrutura e composição química da bactéria está relacionada pelos diferentes modos de ligação e acúmulo das substâncias fotossensibilizadoras, podendo influenciar nos tempos de adsorção necessários para a acumulação do composto antes da irradiação. O FS interage com mais facilidade para inativar bactérias Gram-positivas, pois a membrana está rodeada por uma camada porosa de peptidoglicano e ácidos lipoprotéicos. No entanto, em Gram-negativas a membrana externa é formada por lipopolissacarídeos (LPS) tornando-a mais complexa, assim formando uma barreira física e funcional entre a célula e o ambiente, tornando mais difícil a penetração do fotossensibilizador (HAMBLIN, 2004; TANG et al., 2007; MAISCH, 2009).

As porfirinas são substâncias que contribuem em diversas funções metabólicas de vários organismos vivos, como na forma de hemoglobina e mioglobina no transporte de oxigênio, na fotossíntese, em etapas de transferência de elétrons com o citocromo C e nas reações de vitamina B₁₂. Além disso, esses compostos têm estado em evidência pelo seu potencial antimicrobiano no tratamento de TFD (BRAGA et al., 2014).

As porfirinas são um grupo de moléculas cromóforas, constituída por um macrociclo tetrapirrólico, formados por quatro anéis de pirróis ligados entre si por pontes metálicas (CH) conhecidos como posições *meso*-carbono (Figura 4). Contudo, essas substâncias, possuem uma banda de maior intensidade na região entre 420-450 nm, denominada banda Soret e outras de menor intensidade localizada em maiores comprimentos de onda 500-650 nm, chamadas de bandas Qs (JORI, 2004).

Figura 4: Representação estrutural de uma porfirina



A estrutura química de um FS porfirínico possui grande relevância clínica, pois modificações podem ser realizadas na estrutura, definindo assim o efeito fotodinâmico na célula bacteriana (GAMELAS et al., 2020). A inserção de substituintes catiônicos na estrutura da porfirina afeta a cinética e o alcance da ligação na célula bacteriana tornando mais suscetível a penetração em bactérias Gram-positivas e principalmente em Gram-negativas (ALVES, 2009; MARCIEL et al., 2018; SIMÕES et al., 2016).

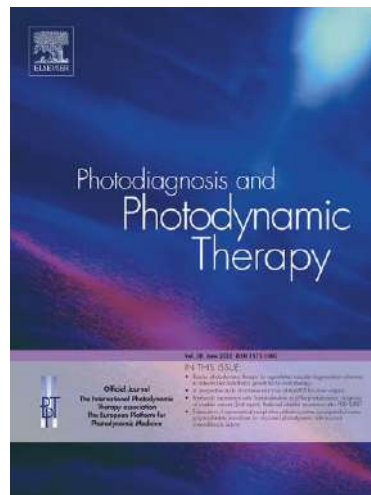
As bactérias Gram-positiva possuem sua parede celular mais porosa composta por peptideoglicano e ácido lipoteicóico o que facilita a passagem de fotossensibilizadores neutros, aniônicos e catiônicos. No entanto, para as bactérias Gram-negativas os fotossensibilizadores catiônicos são mais eficientes pois interagem com os cátions bivalentes de Ca²⁺ e Mg²⁺ presentes na membrana externa dos Gram-negativos, fazendo com que haja uma interação com os lipopolissacarídeos, deixando a membrana externa fragilizada e assim umentando a ação do FS catiônico na célula bacteriana (DAI, 2009; SIMÕES et al., 2016; GAMELAS et al., 2020).

4 MANUSCRITO

Título: Biofilm inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) approaches by water-soluble tetra-cationic porphyrins

Carolina Gonzalez Urquhart^a, Ticiane da Rosa Pinheiro^a, Jean Lucas Gutknecht da Silva^b, Daniela Bitencourt Rosa Leal^b, Thiago Augusto Lima Burgo^c, Bernardo Almeida Iglesias^{d*} and Roberto Christ Vianna Santos^{a*}

O manuscrito abaixo, foi submetido para revista *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (Fator de impacto: 3. 577, Qualis: B1)



1 **Biofilm inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* using antimicrobial**
2 **photodynamic therapy (aPDT) approaches by water-soluble tetra-cationic**
3 **porphyrins**

4
5
6 Carolina Gonzalez Urquhart^a, Ticiane da Rosa Pinheiro^a, Jean Lucas Gutknecht da Silva^b,
7 Daniela Bitencourt Rosa Leal^b, Thiago Augusto Lima Burgo^c, Bernardo Almeida Iglesias^{d*}
8 and Roberto Christ Vianna Santos^{a*}

9
10
11 *^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,*
12 *Departamento de Microbiologia e Parasitologia – LAPEMICRO, Universidade Federal de Santa*
13 *Maria, RS, Brasil*

14 *^bLaboratório de Imunologia Experimental e Aplicada (LABIBIO), Universidade Federal de Santa*
15 *Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.*

16 *^cLaboratório Coulomb de Eletrostática e Mecanoquímica, Universidade Federal de Santa Maria*
17 *(UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.*

18 *^dLaboratório de Bioinorgânica e Materiais Porfirínicos (LBMP), Departamento de Química,*
19 *Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.*

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47 *Corresponding author to: Santos, R.C.V. (robertochrist@gmail.com) and Iglesias, B.A.
48 (bernardopgq@gmail.com; bernardo.iglesias@ufsm.br).

49 **Highlights:**

- 50 • Use of water-soluble tetra-cationic porphyrins against Gram-negative bacteria;
- 51 • Antimicrobial and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*;
- 52 • The water-soluble tetra-cationic porphyrin **4-H₂TMePor** is highly effective in
53 photoinactivating PA01;
- 54 • **4-H₂TMePor** was not cytotoxic against human keratinocytes and fibroblasts.

55

56

57 **Abstract**

58 This manuscript presents the cytotoxicity, antimicrobial activity, antibiofilm properties, and
59 associated therapy with commercial drugs using water-soluble tetra-cationic porphyrins
60 against *Pseudomonas aeruginosa*. Two commercial tetra-cationic porphyrins were tested
61 against a standard strain of *P. aeruginosa* 01 (PA01) in antibacterial activity assays under
62 dark conditions and irradiated with white light for 120 min. Porphyrin **4-H₂TMePor** showed
63 better antimicrobial activity and was chosen for further tests. Increased minimum inhibitory
64 concentration was observed in the presence of reactive oxygen species, suggesting that
65 photooxidation was mediated by the singlet oxygen production. In the time-kill curve assay,
66 **4-H₂TMePor** inhibited bacterial growth in 90 min of irradiation. The checkerboard assay
67 revealed synergistic interactions. Biofilms of the standard PA01 strain and three clinical
68 isolates were formed. The biofilm destruction assay was more efficient for PA01,
69 significantly reducing the biofilm formed compared to the positive control. The associated
70 treatment to destroy the biofilm potentiated a significant decrease in the biofilm compared to
71 the positive control. The photosensitizer did not damage human keratinocytes or mouse
72 fibroblasts in the cytotoxicity assays, demonstrating the safety of using **4-H₂TMePor**. Atomic
73 force microscopy indicated lower adhesion force, higher cell wall deformation, and higher
74 dissipation energy in the treated control compared to untreated PA01. Given our findings, it is
75 evident that water-soluble tetra-cationic porphyrins have excellent antimicrobial and
76 antibiofilm activity against Gram-negative bacteria, proving to be a potential photosensitizer
77 for clinical use.

78

79 **Keywords:** *Porphyrins; Cationic porphyrins; Pseudomonas; Biofilm; aPDT;*

80

81

82

83 **1. Introduction**

84 Antimicrobial resistance represents a health risk worldwide, leading to a considerable
85 increase in mortality and morbidity rates in patients with some type of infection [1]. This
86 phenomenon is associated with several mechanisms, such as the transfer of resistance genes
87 between bacteria and the ease of microorganisms preventing the action of existing
88 antimicrobials resulting from indiscriminate use in society and hospital environments [2,3].

89 *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic pathogen with a certain
90 metabolic diversity and may be ubiquitous in the environment [4]. This bacteria causes
91 serious infections in immunocompromised individuals, burn victims, and patients using
92 devices such as catheters and probes. In addition, *P. aeruginosa* is associated with various
93 respiratory, urinary tract, and systemic infections [5,6]. This pathogen is one of the six
94 microorganisms of the “ESKAPE” group, which is composed of six highly virulent and
95 antibiotic-resistant bacterial pathogens, namely: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus*
96 *aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and
97 *Enterobacter* spp. [7–10].

98 This microorganism forms biofilms on surfaces of medical devices, wounds, and
99 burns. The biofilm consists of the adhesion of microorganisms to biotic or abiotic surfaces
100 forming an exopolysaccharide layer that provides a protective network preventing the
101 penetration of drugs, increasing antimicrobial resistance [11–14].

102 Thus, an alternative therapy to the use of antimicrobials is antimicrobial photodynamic
103 therapy (aPDT), which has as its principle the use of a photosensitizing compound that is
104 activated at a certain wavelength by absorbing light, generating reactive oxygen species
105 (ROS) such as singlet oxygen and free radicals, resulting in cell death [15–17]. Porphyrin
106 derivatives are groups of photosensitizer molecules consisting of a central tetrapyrrolic
107 macrocycle. Cationic porphyrins have been used for microbial photoinactivation of Gram-
108 negative bacteria because they are water-soluble compounds, which facilitates their
109 penetration into bacterial cells [18–22].

110 Given the above, this study sought to evaluate the cytotoxicity and antimicrobial and
111 antibiofilm activity of water-soluble tetra-cationic porphyrins against *P. aeruginosa*.

112

113 **2. Materials and methods**

114 *2.1. Irradiation source*

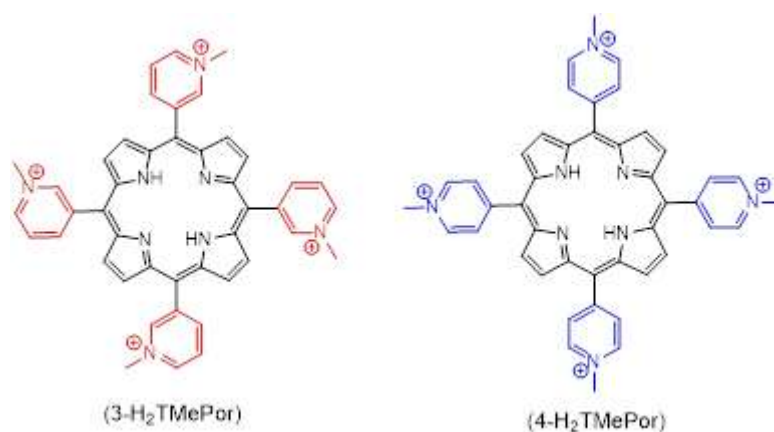
115 The aPDT experiments were performed under white-light LED irradiation (visible
 116 range; 400–800 nm) at irradiance of 50 mW/cm² and light dosage 360 J/cm² for 120 min
 117 [18,23]. All experiments were performed in triplicate and independently.

118

119 2.2. *Tetra-cationic porphyrins*

120 The isomeric water-soluble tetra-cationic porphyrins *meso*-tetra(3-N-methylpyridyl)
 121 porphyrin (**3-H₂TMePor**) and *meso*-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrin (**4-H₂TMePor**) were
 122 purchased from Frontier Scientific® (Logan, Utah, USA); the chemical representative
 123 structures are shown in [Figure 1](#).

124



125

126 **Figure 1.** Representative structures of the tetra-cationic porphyrins **3-H₂TMePor** and **4-H₂TMePor**. The
 127 counter-ions chloride (Cl⁻) are omitted for more clarity.

128

129 2.3. *Microorganisms, storage conditions, and bacterial inoculum production*

130 A standard *P. aeruginosa* PA01 strain belonging to the Research Laboratory in Oral
 131 Microbiology (LAPEMICRO) of the Federal University of Santa Maria (UFSM) and three
 132 clinical isolates provided by the University Hospital of Santa Maria (HUSM) were used. This
 133 study was authorized by the Federal University of Santa Maria Research Ethics Committee
 134 and approved by the Certificate of Presentation for Ethical Evaluation
 135 (12114713.1.0000.5346).

136 The microorganisms were kept in tryptic soy broth culture medium and glycerol and
 137 frozen at -80 °C. To perform the tests, the microorganisms were reactivated in brain heart
 138 infusion broth, seeded on MacConkey agar, and incubated for 24 h at 37 °C. After the
 139 incubation time, two to three isolated colonies were added to a sterile 0.9% saline solution,
 140 and the turbidity was adjusted in a densitometer (DEN-1) on the 0.5 McFarland scale [24].

141

142

143 2.4. *Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations*

144 The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the porphyrins **3-H₂TMePor** and **4-**
145 **H₂TMePor** and the antimicrobial imipenem (IMP) against PA01 were determined using the
146 broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [24].
147 Each porphyrin was diluted with 3.0 mL of distilled water, obtaining stock solutions of 333
148 µg/mL (406 µM). Mueller-Hinton broth (MHB) and serial dilutions of porphyrins (166.5
149 µg/mL – 20.81 µg/mL; 203–25.3 µM) and IMP (64 µg/mL – 4.0 µg/mL; 78–4.9 µM) were
150 used in the treatment wells. Subsequently, 10 µL of bacterial inoculum was added to all wells
151 except for the negative control, which only received culture medium. The positive control was
152 only performed with MHB and the bacterial inoculum without treatment. This assay was
153 performed in triplicate, in which two plates were irradiated with a white-light LED source for
154 120 min and subsequently incubated for 24 h at 37 °C; the other two plates were incubated
155 without exposure to irradiation (dark cycle) for 24 h at 37 °C. The MIC was defined as the
156 one that did not show visible bacterial growth compared to the positive control. The minimum
157 bactericidal concentration (MBC) was determined by removing 1.0 µL from each well in
158 which there was no bacterial growth and seeded on MacConkey agar plates. The plates were
159 incubated for 24 h at 37 °C. Subsequently, we observed if there was bacterial growth and
160 defined the MBC where there was none [24].

161

162 2.5. *Time-Kill curve test*

163 The death curve assay was performed to determine the exact time the treatment could
164 inhibit the growth of PA01 strain [18,27]. In this assay, the predetermined MIC and 2xMIC
165 were used in the broth microdilution assay. The assay was briefly performed in a 96-well
166 plate containing MHB, the respective porphyrin concentrations, and the bacterial inoculum.
167 Subsequently, the plate was irradiated with white light for 120 min. The 10-µL aliquots were
168 removed at 0, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 min and plated on MacConkey agar with a
169 drigalski loop. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. Subsequently, colony forming
170 units/mL (CFU/mL) were counted. In addition, positive and negative controls were
171 performed. The assay was performed in triplicate.

172

173 2.6. *Reactive oxygen species determination*

174 In order to evaluate the possible mechanism of photoinactivation of the treatment
175 against PA01, the MIC of each substance described in the literature used as a ROS scavenger
176 was determined, namely: ascorbic acid (AA; singlet oxygen species), *tert*-butanol (*t*-BuOH;

177 hydroxyl radical), dimethyl sulfoxide (DMSO; superoxide species), N-acetylcysteine (NAC;
178 hydroperoxyl radical), and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; ion chelators) [18,25,26].
179 The MIC was performed as described elsewhere [24]. Serial dilutions of the porphyrin were
180 added at subinhibitory concentrations of each scavenger, and bacterial inoculum was added to
181 all wells except for the negative control that only received culture medium. The positive
182 control received inoculum and culture medium. The plate was irradiated with white light for
183 120 min and then incubated for 24 h at 37 °C. The MIC value was determined by the lowest
184 concentration at which there was no visible bacterial growth in the well.

185

186 2.7. Checkerboard assay

187 The interaction of porphyrin with the commercial antimicrobial IMP against PA01 was
188 performed by the checkerboard assay [18,28,29]. For this assay, 50 µL of MHB was added to
189 a 96-well plate. Then, an IMP solution four times more concentrated was prepared, and 50 µL
190 was placed in all row 2 performing a serial dilution up to well 10. Separately, twice as
191 concentrated concentrations of porphyrin were prepared, and 50 µL of each concentration was
192 arranged horizontally in rows B, C, D, E, F, G, and H. Finally, 10 µL of the bacterial
193 inoculum was added to all wells except for column 11, which received only MHB as a
194 negative control. Column 12 only received MHB and inoculum as a positive control. The
195 plate was irradiated with white light for 120 min and incubated for 24 h at 37 °C. The assay
196 was performed in triplicate on different days. The possible interaction of the porphyrins with
197 the antimicrobial was analyzed using the fractional inhibitory concentration index (FICI),
198 which was calculated using the following formula: $FIC_A + FIC_B = (MIC_{A \text{ in association}} / MIC_{A \text{ alone}}) + (MIC_{B \text{ in association}} / MIC_{B \text{ alone}})$. Next, the possible interaction was classified as synergistic
199 ($FICI \leq 0.5$), indifferent ($0.5 < FICI < 4.0$), or antagonistic ($FICI \geq 4.0$).

200

201 2.8. Biofilm formation assay

202 The biofilm formation assay against PA01 and clinical isolates was performed in a 96-
203 well plate containing 100 µL of MHB and 10 µL of bacterial inoculum, the negative control
204 was performed only with the MHB. The plate was incubated for 24 h at 37 °C to promote cell
205 adhesion and biofilm formation. The biofilm formed was revealed by the crystal violet
206 technique [31]. The supernatant contained in the wells was removed, and the wells were
207 washed with distilled water three times to remove non-adherent cells. The biofilm contained
208 in the plate was placed in an oven at 60 °C for 60 min. Then, 200 µL of 1.0% crystal violet
209 was added to each well for 15 min. After staining, the contents were aspirated and washed
210

211 again with distilled water three times. The adhered biofilm was solubilized with 200 μ L of
212 95% ethanol for 10 min. This solution was transferred to a new 96-well plate, and the optical
213 density (OD) was read at 570 nm in a spectrophotometer; the assay was performed in
214 triplicate. Next, the mean OD values were calculated for each microorganism tested and
215 negative control. The cut-off value (OD_c) was defined as the mean of the OD of the negative
216 control + 3x the standard deviation of the negative control. The mean of positive controls was
217 also calculated. Subsequently, the values obtained were classified according to their biofilm
218 formation capacity: non-biofilm forming ($OD \leq OD_c$), weak ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$),
219 moderate ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$), and strong ($4 \times OD_c < OD$) [13,30].

220

221 2.9. *Biofilm destruction*

222 In order to perform the biofilm destruction assay against PA01 and the clinical
223 isolates, it was necessary to perform the biofilm formation described in section 2.8. After the
224 biofilm formation, the supernatant was aspirated and washed with distilled water three times.
225 Then, 100 μ L of porphyrin was added at the concentrations of 4xMIC, 2xMIC, and MIC. The
226 positive control was performed with the culture medium and the bacterial inoculum of each
227 microorganism and the negative control only with the culture medium. After adding the
228 treatment, the plate was irradiated with white light for 120 min. The plate was incubated for
229 24 h at 37 °C. The following day, biofilm destruction was quantified using the crystal violet
230 method described in section 2.8. The destruction of the pre-formed biofilm with the associated
231 treatments was also tested [31,32].

232

233 2.10. *Atomic force microscopy analysis*

234 Atomic force microscopy (AFM) was used to characterize the morphology of *P.*
235 *aeruginosa* and its photodamage caused by tetra-cationic porphyrin. The microbial suspension
236 was added to a freshly cleaved mica and dried in air for 24 h.

237 Samples were imaged in a Park NX10 microscope (Park Systems, Suwon, Korea)
238 equipped with the SmartScan software (version 1.0. RTM13c2020-1). Topography, adhesion
239 force, deformation, and energy dissipation images were simultaneously acquired using
240 PinPoint nanomechanical AFM mode with a high-frequency silicon tip (TAP300-G Budget
241 Sensors, Bulgaria), a nominal resonance frequency of 300 kHz, and force constant of 40 N/m.
242 All measurements were made at room temperature (21 ± 5 °C) and relative humidity of $55 \pm$
243 10%. The images were processed offline using the XEI software (version 4.3.4
244 Build22.RTM1) [26,34,54].

245 2.11. Cytotoxicity

246 The cytotoxicity assay was performed using murine fibroblast cells (L929) and human
247 keratinocytes (HCAT) acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (RJCB). Dermal cells were
248 chosen for their involvement in the healing process of wounds and burns [52]. Cells were
249 cultured in low glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with
250 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin (100 U/L), and incubated at 37 °C in a
251 humidified atmosphere containing 5.0% CO₂.

252 For the *in vitro* assay, L929 and HCAT cells were seeded in 96-well plates containing
253 3.0×10^4 cells/well of L929 and 4.0×10^4 cells/well of HCAT. The plates were pre-incubated
254 for 24 h at 37 °C. The cells were then treated with different concentrations of **4-H₂TMePor**,
255 and the plates were irradiated for 120 min and finally incubated for 24 h at 37 °C. After
256 incubation, the reagent 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
257 was added, and the plates were incubated at 37 °C for 4 h. The medium was removed, and
258 DMSO was added to each well to dissolve the formed formazan crystals. Lastly, plate
259 absorbances were read at 570 nm using a microplate reader [51]. The results were expressed
260 as a percentage of controls.

261

262 2.12. Statistical analysis

263 One-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Tukey's test, using
264 the GraphPad Prism 8.0.1 software. All tests were performed in triplicate and in three
265 independent experiments.

266

267 3. Results and discussion

268 3.1. Photoinactivation of *P. aeruginosa* by tetra-cationic porphyrins

269 Photodynamic therapy has been widely used to circumvent antimicrobial resistance,
270 leading to the inactivation of a broad spectrum of microorganisms [16,19,22,25]. Thus, water-
271 soluble tetra-cationic porphyrin photosensitizers is highly promising for Gram-negative
272 microorganisms as they interact with the negatively charged lipopolysaccharides present in
273 the cell wall, producing ROS and leading to cell death [33,35,41,42]. The MIC and MBC
274 results of two tetra-cationic porphyrin derivatives (**3-H₂TMePor** and **4-H₂TMePor**) in the
275 dark and under white-light irradiation conditions against PA01 are listed in [Table 1](#). Under
276 dark conditions, **3-H₂TMePor** and **4-H₂TMePor** porphyrins were less effective. However,

277 the assay that received white-light dosage for 120 min obtained better MIC and MBC results
278 for porphyrin **4-H₂TMePor**, which was the porphyrin of choice for the other assays.

279

280 **Table 1.** MIC and MBC ($\mu\text{g/mL}$; μM) of the tetra-cationic porphyrins **3-H₂TMePor** and **4-H₂TMePor** against
281 *Pseudomonas aeruginosa* PA01 under dark and white-light LED conditions (120 min; 50 mW/cm² and 360
282 J/cm²).

PA01		
Porphyrin	MIC ($\mu\text{g/mL}$; μM) – dark conditions	MIC ($\mu\text{g/mL}$; μM) – light conditions
3-H₂TMePor	> 166.5; > 203	41.62; 50.7
4-H₂TMePor	> 166.5; > 140	20.81; 17.5
Porphyrin	MBC ($\mu\text{g/mL}$; μM) – dark conditions	MBC ($\mu\text{g/mL}$; μM) – light conditions
3-H₂TMePor	> 166.5; > 203	83.25; 101.5
4-H₂TMePor	> 166.5; > 140	20.81; 17.5

283

284 The results of MIC and MBC of **4-H₂TMePor** against the three clinical isolates tested
285 are described in **Table 2**.

286

287 **Table 2.** MIC and MBC ($\mu\text{g/mL}$; μM) of **4-H₂TMePor** against clinical isolates of *P. aeruginosa* under dark and
288 white-light LED conditions (120 min; 50 mW/cm² and 360 J/cm²).

4-H ₂ TMePor		
Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$; μM) – dark conditions	MIC ($\mu\text{g/mL}$; μM) – light conditions
Clinical isolate 15	> 166.5; > 140	41.62; 35.0
Clinical isolate 20	> 166.5; > 140	20.81; 17.5
Clinical isolate 22	> 166.5; > 140	20.81; 17.5
4-H ₂ TMePor		
Strain	MBC ($\mu\text{g/mL}$; μM) – dark conditions	MBC ($\mu\text{g/mL}$; μM) – light conditions
Clinical isolate 15	> 166.5; > 140	41.62; 35.0
Clinical isolate 20	> 166.5; > 140	20.81; 17.5
Clinical isolate 22	> 166.5; > 140	20.81; 17.5

289

290 The results of MIC and MBC of the antimicrobial IMP against PA01 are presented in
291 **Table 3**. The results obtained in these assays corroborate other studies that described the
292 positive charge of cationic porphyrin interacting with the negative charge of the outer
293 membrane of Gram-negative bacteria, thereby increasing its efficiency in photodynamic
294 therapy [18,19,20,22,50].

295

296 **Table 3.** MIC and MBC ($\mu\text{g/mL}$; μM) of the antimicrobial imipenem (IMP) against *P. aeruginosa* PA01 under
297 white-light LED conditions (120 min; 50 mW/cm² and 360 J/cm²).

Imipenem (IMP)		
Microorganism	MIC ($\mu\text{g/mL}$; μM)	MBC ($\mu\text{g/mL}$; μM)
PA01	4.0; 12.6	4.0; 12.6

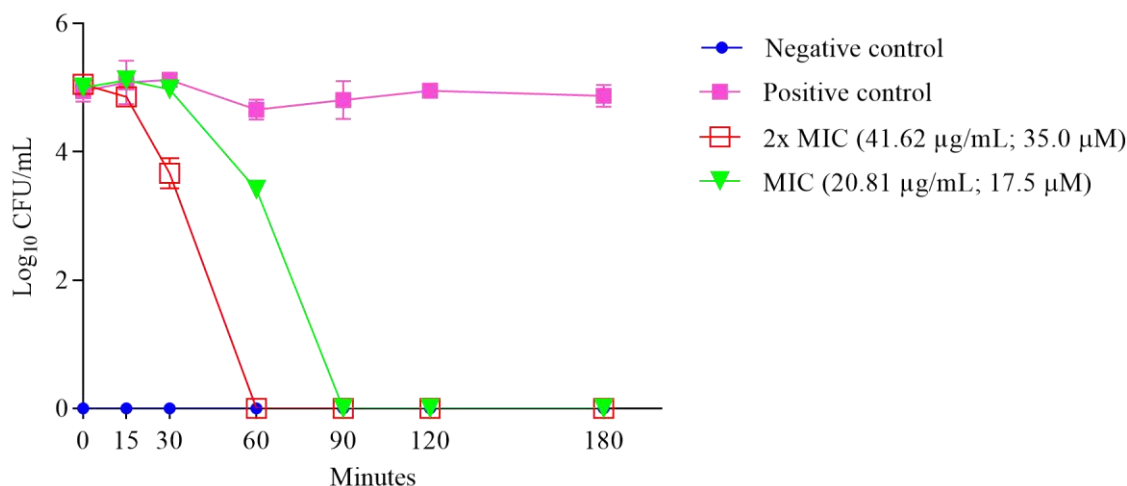
298

299

300

301 3.2 Time-Kill curve test

302 After treatment with the *para* isomer porphyrin **4-H₂TMePor** at MIC (20.81 µg/mL;
 303 17.5 µM) and 2xMIC (41.62 µg/mL; 35 µM), we observed the exact time **4-H₂TMePor**
 304 inhibited the growth of the PA01 strain by counting the viable colonies represented in
 305 CFU/mL (Figure 2). The concentration of 2xMIC inhibited bacterial growth in the first 60
 306 min of white-light exposure, while MIC inhibited bacterial growth after 90 min of irradiation.



307

308 **Figure 2.** Death curve of PA01 against different concentrations of **4-H₂TMePor** under white-light LED
 309 irradiation (120 min; 50 mW/cm² and 360 J/cm²). Values were expressed as mean ± standard deviation.
 310 *Positive control: culture medium with bacterial inoculum. Negative control: only culture medium. Both were
 311 submitted to irradiation under white-light conditions.

312

313 3.3. ROS photoinactivation mechanism

314 Five ROS scavengers were used to investigate which reactive oxygen species
 315 participated in the photoinactivation mechanism of **4-H₂TMePor** against the PA01 strain,
 316 among them: AA, *t*-BuOH, DMSO, NAC, and EDTA, respectively. Table 4 lists the results of
 317 the ROS scavenger test. In the presence of NAC, EDTA, and DMSO, the MIC values
 318 decreased compared to MIC in the absence of ROS scavengers. In the presence of *t*-BuOH,
 319 the MIC prevailed compared to the MIC value in the absence of ROS. Furthermore, an
 320 increase in MIC is observed in the presence of AA; thus, it is implied that the ROS prevailing
 321 in the photoinactivation mechanism is singlet oxygen (Table 4). These results corroborate the
 322 literature, with the production of singlet oxygen (Type II) being the major mechanism of tetra-
 323 cationic porphyrins [18,22,25,26,27].

324

325

326 **Table 4.** MIC values ($\mu\text{g/mL}$; μM) in the absence and the presence of ROS scavengers of **4-H₂TMePor** against
 327 *P. aeruginosa* PA01 under white-light LED conditions (120 min; 50 mW/cm² and 360 J/cm²).

Porphyrin	MIC values against PA01 ($\mu\text{g/mL}$; μM)					
	Absence	AA (¹ O ₂)	t-BuOH (•OH)	DMSO (O ₂ ⁻)	NAC (•OOH)	EDTA (ion chelating)
4-H₂TMePor	20.81; 17.5	166.5; 140	20.81; 17.5	2.60; 2.19	10.4; 8.76	1.30; 2.00

328

329 3.4. Checkerboard assay

330 The synergistic activity between **4-H₂TMePor** and IMP against the PA01 strain was
 331 performed using the checkerboard assay [18,28,29]. The synergistic potential between the
 332 antimicrobial and porphyrin was evaluated by the value obtained in the FICI. The synergistic
 333 potential was observed when the antimicrobial was associated with the porphyrin
 334 photosensitizer (Table 5).

335 The antimicrobial imipenem is a carbapenem belonging to the β -lactam class, which
 336 has inhibitory action against peptidoglycan crosslinking during cell wall synthesis; tetra-
 337 cationic porphyrins are highly efficient against Gram-negative bacteria because they interact
 338 with the charges of the plasma membrane, thus promoting the entry of porphyrins into the
 339 membrane, consequently generating ROS [37,38,40]. Given this, it is possible to relate the
 340 synergism resulting from this association. This is a promising discovery as it enables one to
 341 associate antimicrobials with porphyrins in order to be an alternative for treatment against *P.*
 342 *aeruginosa* [36].

343

344 **Table 5.** MIC values ($\mu\text{g/mL}$; μM) of **4-H₂TMePor** in the presence of imipenem (IMP) against *P. aeruginosa*
 345 PA01 under white-light conditions (120 min; 50 mW/cm² and 360 J/cm²).

Microorganism	MIC values of the checkerboard assay ($\mu\text{g/mL}$)					FICI*	Interaction
	4-H₂TMePor	4-H₂TMePor + IMP	IMP	IMP + 4-H₂TMePor			
PA01	20.81; 17.5	2.6; 2.18	4; 12.6	0.5; 1.57		0.249	Synergism

346 *FICI - Fractional inhibitory concentration index;

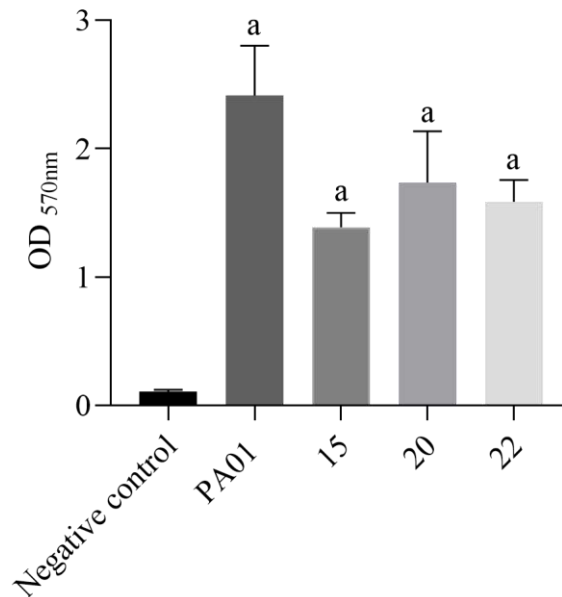
347

348 3.5. Biofilm formation and destruction by 4-H₂TMePor porphyrin

349 *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen with various virulence
 350 mechanisms, including the biofilm [47]. The biofilm is a complex structure composed of an
 351 exopolysaccharide matrix, proteins, lipids, DNA, RNA, ions, and water. The agent
 352 responsible for the morphology, structure, cohesion, and functional integrity of the biofilm is
 353 the exopolysaccharide matrix. Therefore, antimicrobials have difficulty penetrating this
 354 structure, causing resistance to antimicrobials [46,47,48].

355 Photodynamic therapy is seen for its antibacterial action by using porphyrins under
 356 light irradiation. Tetra-cationic porphyrins have been evidenced in the literature regarding

357 their antibacterial action against Gram-positive and Gram-negative bacteria [21,22,43,44,45].
 358 Hence, the effect of water-soluble tetra-cationic porphyrin **4-H₂TMePor** on biofilms formed
 359 from *P. aeruginosa* was observed. The biofilm formation assay by PA01 and the clinical
 360 isolate strains are described in [Figure 3](#). The results were calculated for the biofilm formation
 361 capacity according to Stepanović and co-workers [30], being classified as strong biofilm
 362 formers.

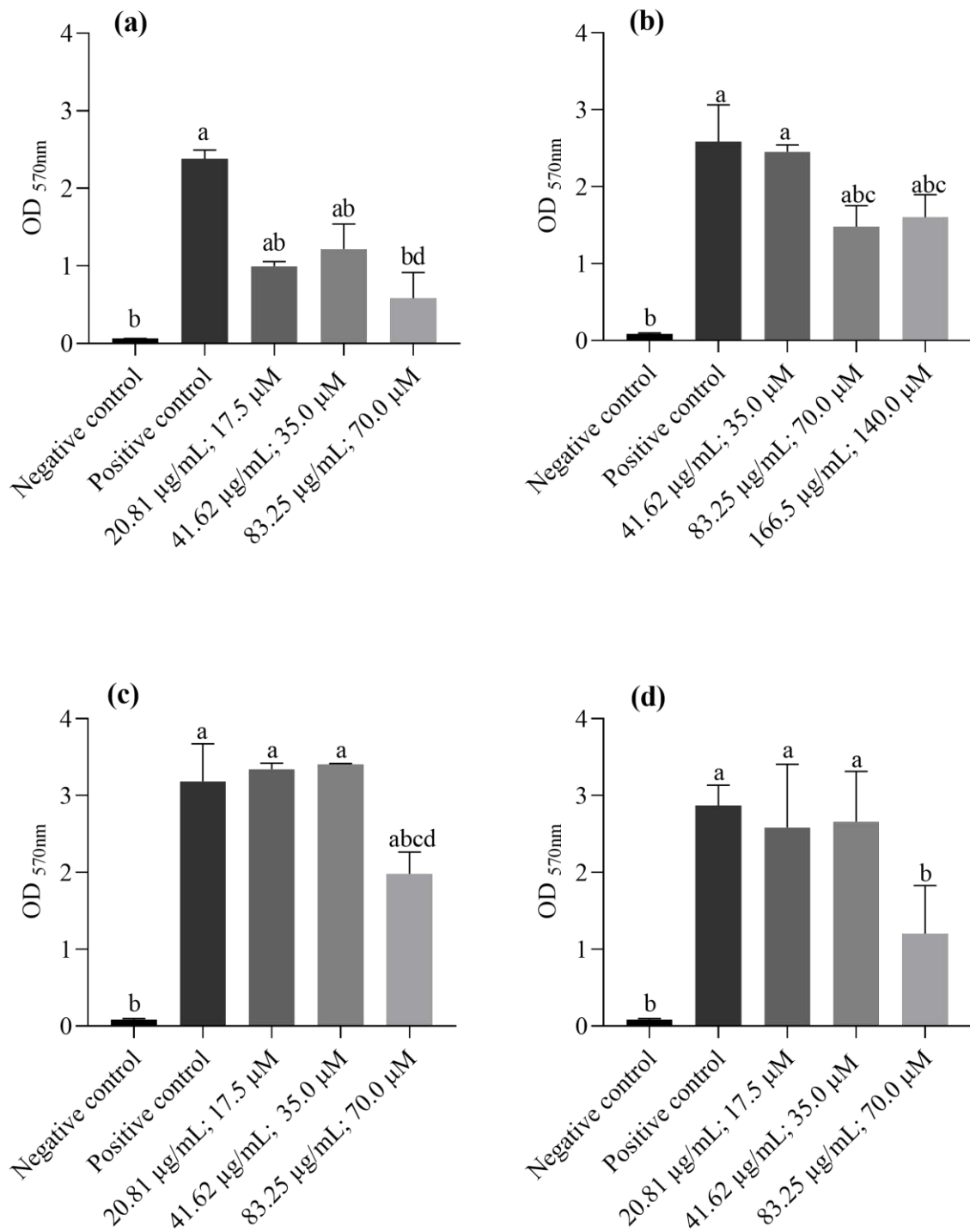


363
 364 **Figure 3.** Biofilm formation of PA01 and clinical isolates 15, 20, and 22 in 24 h. Values are expressed as mean \pm
 365 standard deviation considering statistical difference when $p < 0.05$ compared with the negative control.

366

367 The assay of the destruction of biofilms formed with PA01 and clinical isolates 15, 20,
 368 and 22 treated with porphyrin **4-H₂TMePor** and exposed to a white-light LED source for 120
 369 min are illustrated in [Figure 4](#). In [Figure 4a](#), we observe that there was a significant reduction
 370 of preformed biofilms at 20.81 (17.5 μ M), 41.62 (35 μ M), and 83.25 μ g/mL (70.2 μ M)
 371 compared to the positive control of the PA01 strain.

372 In clinical isolate 15, the two highest concentrations of treatment tested significantly
 373 reduced the biofilms formed compared to the positive control ([Figure 4b](#)). In contrast, for
 374 clinical isolates 20 and 22, only the highest treatment concentration tested significantly
 375 reduced biofilm compared to the positive control ([Figures 4c-d](#)).



376

377

378

379

380

381

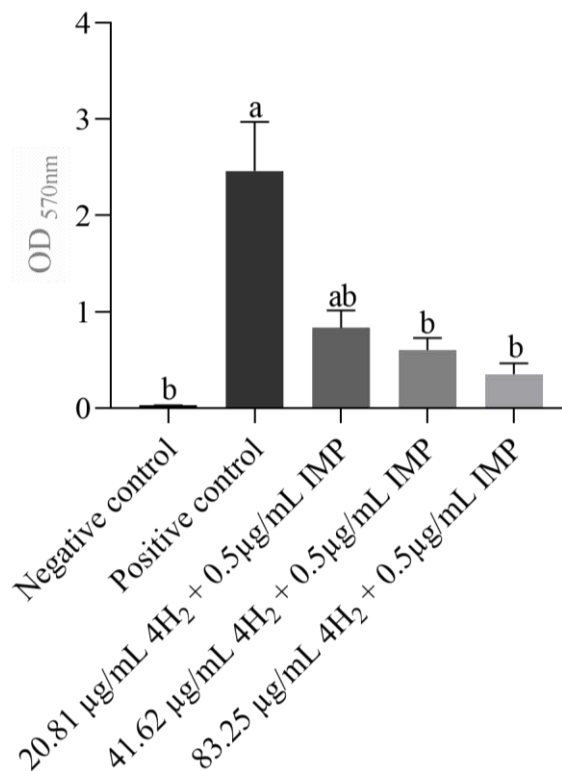
382

383

Figure 4. Biofilm destruction in (a) PA01, (b) clinical isolate 15, (c) clinical isolate 20, and (d) clinical isolate 22 using porphyrin **4-H₂TMePor** under white-light LED conditions (120 min; 50 mW/cm² and 360 J/cm²). Values were expressed as mean \pm standard deviation considering statistical difference when $p < 0.05$ compared with the negative, positive control, and treatment concentrations, respectively.

384 3.6. *PA01 biofilm destruction with combination treatment*

385 As with the outer membrane, crossing the exopolysaccharide matrix of biofilms is
 386 challenging. We observed that **4-H₂TMePor** alone reduced the biofilm formed at the
 387 concentrations tested (Figure 4a), although the combination of **4-H₂TMePor** and IMP (Figure
 388 5) potentiated biofilm destruction, showing that the extracellular matrix is a possible target of
 389 the photo-oxidative process [39,49]. Although the total detachment of the biofilm did not
 390 occur, we can suggest that the positive charge of the tested porphyrin played a fundamental
 391 role in interacting with the biofilm matrix formed by exopolysaccharides, producing ROS that
 392 resulted in the disorganization of this protection and favoring the permeation of the biofilm
 393 antibiotic into the bacterial cell.



394

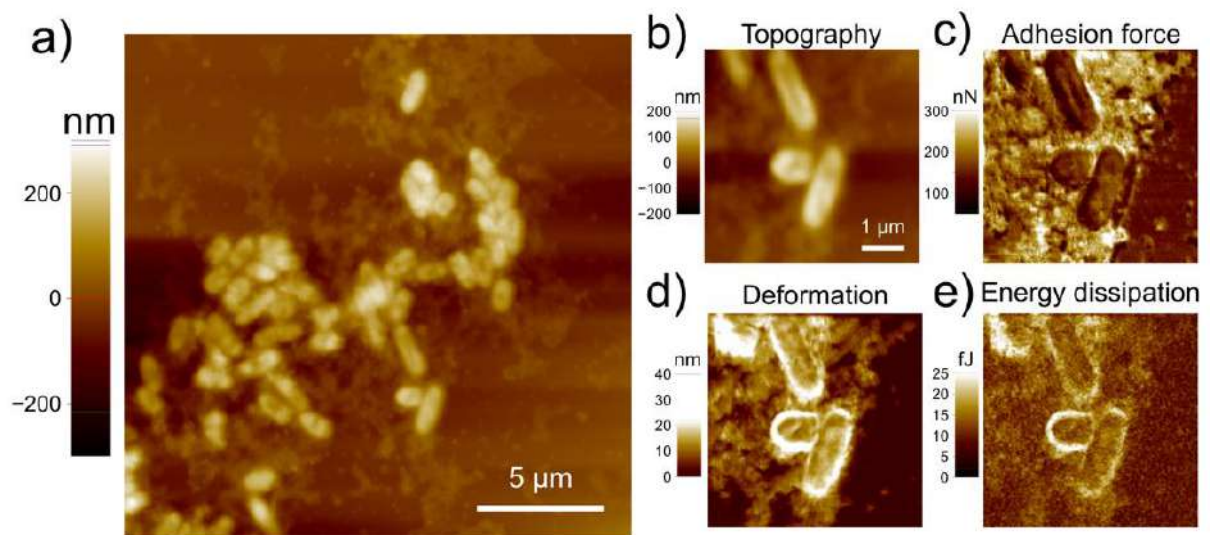
395 **Figure 5.** Destruction of PA01 biofilm with **4-H₂TMePor** in association with imipenem under white-light LED
 396 conditions (120 min; 50 mW/cm² and 360 J/cm²). Values were expressed as mean ± standard deviation
 397 considering statistical difference when $p < 0.05$ compared with the negative and positive control, respectively.

398

399 3.7. *Atomic force microscopy*

400 The AFM topography and nanomechanical images of *Pseudomonas aeruginosa* PA01
 401 are shown in Figure 7. The topography images presented at two different scales (20 x 20 µm²
 402 and 5.0 x 5.0 µm²) show that the positive control displays the common morphology for *P.*
 403 *aeruginosa*, with the bacillus assuming a rod-shaped structure. The morphology that

404 underwent the treatment with **4-H₂TMePor** (½MIC) showed no remarkable topographical
 405 differences. Thus, we further investigated the nanomechanical properties (Figure 7c–e). The
 406 bacilli on the positive control have high adhesive forces (in relation to the AFM tip), while the
 407 bacteria deformation is roughly 15 nm in the cell walls. Moreover, the energy dissipation
 408 map, which measures how much mechanical energy is converted into another form of energy
 409 during the loading and unloading tip indentation curve, shows that 14 fJ is dissipated at the
 410 center of the cell wall. The nanomechanical results are summarized in Table 6, which presents
 411 the data extracted from force-distance curves on *P. aeruginosa* treated with *para* isomer of **4-**
 412 **H₂TMePor**. Firstly, there is a decrease in the adhesive forces down to 133 nN. Although the
 413 AFM adhesive force results from tip-to-sample interactions, the adhesion of *P. aeruginosa* on
 414 substrates must also be much less effective after porphyrin treatment. Moreover, bacteria cell
 415 walls that underwent the treatment are more deformable during tip indentation, highlighted by
 416 the increase in deformation and energy dissipation data.



417
 418 **Figure 7.** Representative AFM images of *P. aeruginosa* positive control. (a–b) Topography images were
 419 acquired simultaneously with the nanomechanical maps of (c) adhesion force, (d) deformation, and (e) energy
 420 dissipation.

421

422 **Table 6.** Nanomechanical properties recorded on *P. aeruginosa* before and after **4-H₂TMePor** treatment
 423 (½MIC) under white-light conditions (120 min; 50 mW/cm² and 360 J/cm²).

Treatment	Adhesion (nN)	Deformation (nm)	Energy dissipation (fJ)
Positive control	174 ± 16	14.77 ± 1.73	14.19 ± 1.61
½ MIC	133 ± 13	15.58 ± 1.94	17.65 ± 2.08

424

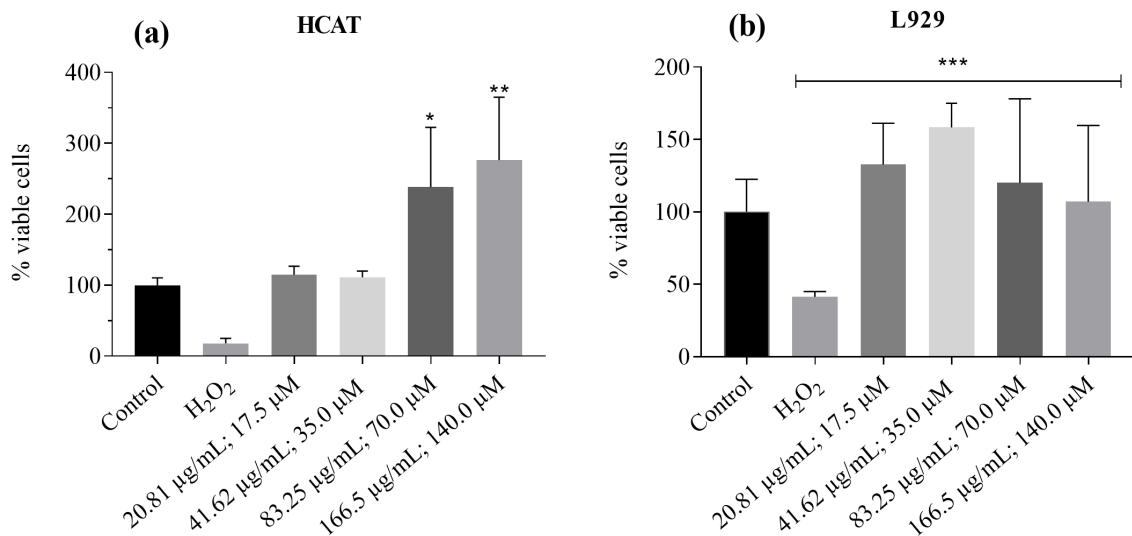
425

426

427 3.8. Cytotoxicity

428 Photodynamic therapy has a high antimicrobial potential, so it is crucial to evaluate its
 429 cytotoxic effects against healthy cells, such as those participating in the healing process (i.e.,
 430 keratinocytes and fibroblasts) [52]. The porphyrin **4-H₂TMePor** had no cytotoxic activity
 431 against HCAT cells, as shown in [Figure 6a](#). Furthermore, exposure to higher concentrations of
 432 the porphyrin (83.25 and 166.5 µg/mL; 70.0 and 140 µM) increased cellular metabolic
 433 activity, as expressed as cell viability by the MTT assay. Thus, treatment with **4-H₂TMePor**
 434 did not cause cellular damage in human keratinocytes but stimulated their cellular activity.
 435 Therefore, these results corroborate Vizzotto and co-workers [53], where ruthenium porphyrin
 436 was not toxic to HCAT cells.

437 Treatments using **4-H₂TMePor** against the L929 cell line are shown in [Figure 6b](#),
 438 where we noticed no cytotoxic activity against mice fibroblast cells. Therefore, these findings
 439 corroborate Lambrechts and co-workers [52], who demonstrated that cationic porphyrins are
 440 not toxic to fibroblast cells.



441

442 **Figure 9.** Cell viability of HCAT and L929 using **4-H₂TMePor** under white-light LED conditions (120 min; 50
 443 mW/cm² and 360 J/cm²). Values were expressed as mean ± standard deviation considering statistical difference
 444 when $p < 0.05$ compared with the control of viable cells (100%). Control (viable cells); H₂O₂ (negative control/
 445 non-viable cells).

446

447 4. Conclusions

448 This study evaluated the antimicrobial and antibiofilm activity of *P. aeruginosa* using
 449 water-soluble tetra-cationic porphyrins. The porphyrin **4-H₂TMePor** under irradiation
 450 conditions with white light proved to be efficient against clinical isolates of *P. aeruginosa* and

451 PA01. Therefore, we observed that **4-H₂TMePor** against the microorganism PA01 at 2xMIC
452 concentration inhibited bacterial growth in the first 60 min, and at MIC concentration, it
453 inhibited growth in 90 min. The photoinactivation mechanism prevalent in using **4-**
454 **H₂TMePor** is governed via singlet oxygen due to increased MIC when the AA scavenger is
455 added. The synergistic activity between **4-H₂TMePor** and IMP proved to be of great
456 relevance, suggesting the use of this combination in treatments of infections caused by
457 *P.aeruginosa*. It was evident that **4-H₂TMePor** destroyed the biofilms formed by PA01 and
458 the clinical isolates 15, 20, and 22. What is more, we observed, through AFM, that when
459 PA01 is treated with **4-H₂TMePor**, the cell wall of this microorganism becomes more
460 deformable. Therefore, this porphyrin is highly promising and safe as it does not present
461 cytotoxicity to L929 cells and HCAT. It is indisputable how much water-soluble tetra-cationic
462 porphyrins are great photosensitizers and, therefore, an excellent alternative therapy to
463 antimicrobial resistance.

464

465 **5. Ethical approval**

466 This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University
467 of Santa Maria and the Certificate of Presentation for Ethical Evaluation
468 (12114713.1.0000.5346).

469

470 **6. Author contributions**

471 C.G. Urquhart, T.R. Pinheiro, B.A. Iglesias, and R. C. V. Santos idealized this study.
472 C.G. Urquhart and T.R. Pinheiro conducted the microbiological assays. J.L.G. Silva and
473 D.B.R. Leal conducted the MTT assays. T.A.L. Burgo conducted the AFM analysis. R. C. V.
474 Santos, B.A. Iglesias, T.R. Pinheiro, and C.G. Urquhart wrote and corrected the manuscript.

475

476 **7. Declaration of competing interest**

477 The authors declare that they do not have conflicts of interest.

478

479 **8. Acknowledgments**

480 This study was financed by CNPq, CAPES, and FAPERGS. Bernardo A. Iglesias is
481 grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq –
482 Brazil; Universal Grants 409150/2018–5 and 304711/2018–7) and FAPERGS (PQ-Gaúcho
483 21/2551-0002114-4). We would also like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de

484 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Thiago A. L. Burgo thanks
 485 MCTIC/CNPq (465452/2014-0), FAPESP (2014/50906-9), INCT/INOMAT (National
 486 Institute for Complex Functional Materials), and MCT/Finep/CT-Infra 02/2010. Carolina G.
 487 Urquhart and Ticiane da R. Pinheiro thank CAPES. R. C. V. Santos also thanks CNPq (PQ –
 488 310360/2019-6) and FAPERGS (PqG – 17/2551-0001075-2). The authors are also grateful to
 489 Atlas Assessoria Linguística for language editing.

490

491 **9. References**

492

493 [1] R.C. de Melo, B.C. de Araújo, M.C. de Bortoli, T.S. Toma. Prevention and control of
 494 antimicrobial stewardship: a review of evidence. *Rev Panam Salud Publica* .44 (2020)
 495 35. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.35>

496

497 [2] O. Van Hecke, K. Wang, J. Lee, N.W. Roberts, C.C. Butler. Implications of Antibiotic
 498 Resistance for Patients' Recovery From Common Infections in the Community: A Systematic
 499 Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 65 (2017) 371–382.
 500 <https://doi.org/10.1093/cid/cix233>

501

502 [3] A.K. Guitor, G.D. Wright. Antimicrobial Resistance and Respiratory Infections. *Chest*.
 503 154 (2018) 1202-1212. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.06.019>

504

505 [4] S.L. Gellatly, R.E.W. Hancock. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights in to pathogenesis
 506 and host defenses. *Pathogens and Disease*. 67 (2013) 159-173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>

507

508 [5] J. E. Paczkowski, et al. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through
 509 allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 292
 510 (2017) 4064-4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>

511

512 [6] J. Botelho, F. Grosso, L. Peixe. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* –
 513 Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*. 44 (2019) 26-47.
 514 <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>

515

516 [7] M.S. Mulani, Et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of
 517 Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 10 (2019)
 518 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

519

520 [8] Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial de Saúde. OMS publica lista
 521 de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente.
 522 [https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-](https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos)
 523 [necessitam-novos-antibioticos](https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos) , 2017 (accessed 07 June 2022)

524

525 [9] C. Spalding, E. Keen, D.J. Smith, A.M. Krachler, S. Jabbari. Mathematical modelling of
 526 the antibiotic-induced morphological transition of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Comput.*
 527 *Biol.* 14 (2018) e1006012. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006012>

528

- 529 [10] E. Breidenstein, C. Fuente-Núñez, R. Hancock. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead
 530 to resistance. Trends in Microbiology. 19 (2011) 419-426.
 531 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
 532
- 533 [11] J.P. Horcajada, M. Montero, A. Oliver, L. Sorlí, S. Luque, S.Z. Gomez, N. Benito, S.
 534 Grau. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant
 535 *Pseudomonas aeruginosa* infections. Clinical Microbiology Reviews. 32 (2019) e00031-19.
 536 <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>
 537
- 538 [12] T. Rasamiravaka, Q. Labtani, P. Duez, M. El Jaziri. The formation of biofilms by
 539 *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with
 540 control mechanisms. BioMed Research International. 2015
 541 (2015) e759348. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
 542
- 543 [13] P.C. Bonez, G.G. Rossi, J.R. Bandeira, A.P. Ramos, C.R. Mizdal, V.A. Agertt, E.S.S.
 544 Dalla Nora, M.E. de Souza, C.F. Dos Santos Alves, F.S. Dos Santos, A. Gündel, R. de
 545 Almeida Vaucher, R.C.V. Santos, M.M.A. de Campos. Anti-biofilm activity of A22 ((S-3,4-
 546 dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride) against *Pseudomonas aeruginosa*: Influence on
 547 biofilm formation, motility and bioadhesion. Microbial Pathogenesis. 11 (2017) 6-13.
 548 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.008>
 549
- 550 [14] V.T. Orlandi, E. Martegani, F. Bolognese, N. Trivellin, F. Garzotto, E. Caruso.
 551 Photoinactivation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm by Dicationic Diaryl-
 552 Porphyrin. International Journal of Molecular Sciences. 22 (2021) e6808.
 553 <https://doi.org/10.3390/ijms22136808>
 554
- 555 [15] A.S. Garcez, S.C. Nuñez, M.R. Hamblin, M.S. Ribeiro. Antimicrobial effects of
 556 photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. Journal of
 557 Endodontics. 34 (2008) 138-42. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.10.020>
 558
- 559 [16] L.Q.S. Lopes, A.P. Ramos, P.M. Copetti, T.V. Acunha, B.A. Iglesias, S.R.C. Vianna,
 560 A.K. Machado, M.R. Sagrillo. Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra
 561 (4-pyridyl) platinum (II) porphyrin. Microb. Patogo. 28 (2019) 47-54.
 562 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.038>
 563
- 564 [17] B. M. Amos-Tautua, S. P. Songca, O. S. Oluwafemi. Application of porphyrins in
 565 antibacterial photodynamic therapy. Molecules. 24 (2019) 2456.
 566 <https://doi.org/10.3390/molecules24132456>
 567
- 568 [18] S.C. Pinto, T.V. Acunha, M.J. Santurio, B.L. Denardi, A.B. Iglesias. Investigation of
 569 powerful fungicidal activity of tetra-cationic platinum(II) and palladium(II) porphyrins by
 570 antimicrobial photodynamic therapy assays. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 36
 571 (2021) e102550. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102550>
 572
- 573 [19] C. Simões, M.C. Gomes, M.G.P.M.S. Neves, A. Cunha, J.P.C.
 574 Tomé, A.C.T. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, A. Almeida, M.A.F. Faustino. Photodynamic
 575 inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins – The charge number
 576 and charge distribution effects. Catalysis Today. 266 (2016) 197-204.
 577 <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.07.031>

- 578 [20] L. Marciel, M.Q. Mesquita, R. Ferreira, B. Moreira, M.G.P.M.S. Neves, M.A.F.
579 Faustino, A. Almeida. An efficient formulation based on cationic porphyrins to
580 photoinactivate *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Future Med.Chem.* 10 (2018)
581 1821-1833. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0010>
582
- 583 [21] A.S. Riesa, J.F. Cargnelutti, G. Basso, T.V. Acunha, B.A. Iglesias, E.F. Flores, R.
584 Weiblen. Water-soluble tetra-cationic porphyrins display virucidal activity against Bovine
585 adenovirus and Bovine alphaherpesvirus 1. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 31
586 (2020) e101947. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101947>
587
- 588 [22] M.G. Seeger, A.S. Ries, L.T. Gressler, S.A. Botton, B.A. Iglesias, J.F. Cargnelutti. In
589 vitro antimicrobial photodynamic therapy using tetra-cationic porphyrins against multidrug-
590 resistant bacteria isolated from canine otitis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 32
591 (2020) e101982. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101982>
592
- 593 [23] G. Basso, J.F. Cargnelutti, A.L. Oliveira, T.V. Acunha, R. Weiblen, E.F. Flores, B.A.
594 Iglesias, Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-
595 platinated porphyrins, *J. Porphyr. Phthalocyanines* 23 (2019) 1041–1046,
596 <https://doi.org/10.1142/S1088424619500767>.
597
- 598 [24] CLSI, M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria
599 That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. (2015)
600
- 601 [25] D.C. Jornada, R.Q. Garcia, C.H. da Silveira, L. Misoguti, C.R. Mendonça, R.C.V.
602 Santos, L. De Boni, B.A. Iglesias. Investigation of the triplet excited state and application of
603 cationic meso-tetra(cisplatin)porphyrins in antimicrobial photodynamic therapy.
604 *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 35 (2021) e102459.
605 <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102459>
606
- 607 [26] K.B. Guterres, G.G. Rossi, M.M.A. De Campos, S.K. Moreira, L.T.A. Burgo, A.B.
608 Iglesias. Nanomolar effective report of tetra-cationic silver(II) porphyrins against non-
609 tuberculous mycobacteria in antimicrobial photodynamic approaches. *Photodiagnosis and*
610 *Photodynamic Therapy.* 38 (2022) e102770. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102770>
611
- 612 [27] C.H.D. Silveira, V. Vieceli, D.J. Clerici, R.C.V. Santos, B.A. Iglesias. Investigation of
613 isomeric tetra-cationic porphyrin activity with peripheral [Pd(bpy)Cl]⁺ units by antimicrobial
614 photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 31 (2020) e101920.
615 <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101920>
616
- 617 [28] L.S. Garcia, H.D. Isenberg, Synergism Testing: broth microdilution checkerboard and
618 broth macrodilution methods. *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* Washington
619 ASM Press (2007), pp. 1-23.
620
- 621 [29] A.L. Bidaud, P. Schwarz, G. Herbreteau, E. Dannaoui. Techniques for the Assessment of
622 In Vitro and In Vivo Antifungal Combinations. *Journal of Fungi.* 7 (2021) 113.
623 <https://doi.org/10.3390/jof7020113>
624
- 625 [30] S. D. Stepanović, V.Vuković, G. Hola, S. Di Bonaventura, I. Djukić, F.R. Cirković.
626 Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical

- 627 recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. 115 (2007) 891-
 628 899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
 629
- 630 [31] J. H. Merritt, D. E. Kadouri, G. A. O'Toole. Growing and analyzing static biofilms.
 631 Current Protocols in Microbiology. (2011). SUPPL. 22.
 632 <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s22>
 633
- 634 [32] L.Q.S. Lopes, R. de Almeida Vaucher, J.L. Giongo, A. Gündel, R.C.V. Santos.
 635 Characterisation and anti-biofilm activity of glycerol monolaurate nanocapsules against
 636 *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Pathog. 130 (2019) 178-185.
 637 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.007>
 638
- 639 [33] E. Alves, M.A. Faustino, J.P. Tomé, M.G. Neves, A.C. Tomé, J.A. Cavaleiro, A. Cunha,
 640 N.C. Gomes, A. Almeida. Nucleic acid changes during photodynamic inactivation of bacteria
 641 by cationic porphyrins. Bioorg Med Chem 21 (2013) 4311-4318.
 642 <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.065>
 643
- 644 [34] K.B. Guterres, G.G. Rossi, M.M.A. de Campos, *et al.* Metal center ion effects on
 645 photoinactivating rapidly growing mycobacteria using water-soluble tetra-cationic
 646 porphyrins. *Biometals* 33 (2020) 269–282. <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00251-3>
 647
- 648 [35] C. da Silva Canielles Caprara, L. da Silva Freitas, B.A. Iglesias, L.B. Ferreira, D.F.
 649 Ramos. Charge effect of water-soluble porphyrin derivatives as a prototype to fight infections
 650 caused by *Acinetobacter baumannii* by aPDT approaches. *Biofouling* 38(2022) 605-613
 651 <https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2103804>
 652
- 653 [36] Xu, Ye, et al. "Mechanisms of heteroresistance and resistance to imipenem *in*
 654 *Pseudomonas aeruginosa*." *Infection and Drug Resistance* 13 (2020): 1419- 1428
 655 <https://doi.org/10.2147/IDR.S249475>
 656
- 657 [37] Y.A. Heo. Imipenem/Cilastatin/Relebactam: A Review in Gram-Negative Bacterial
 658 Infections. *Drugs* 81 (2021) 377-388 <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01471-8>
 659
- 660 [38] G.G. Zhanel, C.K. Lawrence, H. Adam, et al. Imipenem-Relebactam and Meropenem-
 661 Vaborbactam: Two Novel Carbapenem-β-Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs*. 78
 662 (2018) 65-98. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0851-9>
 663
- 664 [39] S. Motta, D. Vecchiotti, A. Martorana, P. Brunetti, G. Bertoni, A. Polissi, P. Maurício,
 665 D. Di Silvestre. The Landscape of *Pseudomonas aeruginosa* Membrane-Associated
 666 Proteins. *Cells* 9 (2020) 2421. <https://doi.org/10.3390/cells9112421>
 667
- 668 [40] C. H. Da Silveira, et al. Investigation of isomeric tetra-cationic porphyrin activity with
 669 peripheral [Pd (bpy) Cl]⁺ units by antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis and*
 670 *Photodynamic Therapy*, 31 (2020) e101920. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101920>
 671
- 672 [41] C.S. Prasanth, S.C. Karunakaran, A.K. Paul, V. Kussovski, V. Mantareva, et al.
 673 Antimicrobial photodynamic efficiency of novel cationic porphyrins towards periodontal
 674 Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria. *Photochem Photobiol.* 90 (2014) 628-
 675 640. <https://doi.org/10.1111/php.12198>
 676

- 677 [42] B.M. Amos-Tautua, S.P. Songca, O.S. Oluwafemi. Application of Porphyrins in
678 Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*. 24 (2019) e2456.
679 <https://doi.org/10.3390/molecules24132456>
680
- 681 [43] M. Bondi, A. Mazzini, S. de Niederhäusern, R. Iseppi, P. Mess. Inhibition of Multidrug-
682 Resistant Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by a Photoactivated Porphyrin. *Pol. J.*
683 *Microbiol.*66 (2017) 533-536. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7092>
684
- 685 [44] P.J. Gonçalves, F.C. Bezzerra, A.V. Teles, L.B. Menezes, K.M. Alves, et
686 al. Photoinactivation of *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) by tetra-cationic
687 porphyrins containing peripheral [Ru(bpy)₂Cl]⁺ units. *Journal of Photochemistry and*
688 *Photobiology A: Chemistry*. 391 (2020) e112375.
689 <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112375>
690
- 691 [45] U. Sah, K. Sharma, N. Chaudhri, M. Sankar, P. Gopinath. Antimicrobial photodynamic
692 therapy: Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-Porphyrin conjugate for visible light
693 mediated inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 162
694 (2018) 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.046>
695
- 696 [46] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of
697 persistent infections. *Science*. 284 (1999) 1318-1322.
698 <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
699
- 700 [47] F.G. Vital-Lopez, J. Reifman, A. Wallqvist. Biofilm Formation Mechanisms of
701 *Pseudomonas aeruginosa* Predicted via Genome-Scale Kinetic Models of Bacterial
702 Metabolism. *PLoS Comput Biol*. 11 (2015) e1004452
703 <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004452>
704
- 705 [48] N. Patel, S. Swavey, J.A. Robinson. Cationic Porphyrin, ZnPor, Disassembles
706 *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix, Kills Cells Directly, and Enhances Antibiotic
707 Activity of Tobramycin. *Antibiotics*, 9 (2020) 875.
708 <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120875>
709
- 710 [49] V. T. Orlandi, E. Martegani, F. Bolognese, N. Trivellin, F. Garzotto, E. Caruso.
711 Photoinactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by dicationic diaryl-
712 porphyrin. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021) 6808.
713 <https://doi.org/10.3390/ijms22136808>
714
- 715 [50] S. R. Gamelas et al. Photoinactivation of *Escherichia coli* with water-soluble
716 ammonium-substituted phthalocyanines. *ACS Applied Bio Materials*. 3 (2020) 4044-4051.
717 <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00128>
718
- 719 [51] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to
720 proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65 (1983) 55-63.
721 [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
722
- 723 [52] S.A.G. Lambrechts, et al. Photodynamic inactivation of fibroblasts by a cationic
724 porphyrin. *Lasers Med Sci*.20 (2005) 62–67. <https://doi.org/10.1007/s10103-005-0338-x>
725
726

- 727 [53] B. S. VIZZOTTO, et al. DNA photocleavage and melanoma cells cytotoxicity induced
728 by a meso tetra- ruthenated porphyrin under visible light irradiation. Journal of
729 Photochemistry & Photobiology, B: Biology. 209 (2020) e111922.
730 <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111922>
731
- 732 [54] G. G. Rossi, K. B. Guterres, K. S. Moreira, T.A.L. Burgo, M.M.A. de Campos, B.A.
733 Iglesias. Photo-damage promoted by tetra-cationic palladium (II) porphyrins in rapidly
734 growing mycobacteria. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 36 (2021) e102514.
735 <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102514>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação evidencia o quanto porfirinas tetra-catiônicas solúveis em água são eficientes em *P. aeruginosa*. Diante disso, os objetivos propostos nesse trabalho e analisando os resultados obtidos, podemos concluir que:

- A porfirina **4-H₂TMePor** sob irradiação com luz branca mostrou-se eficiente contra PA01 e os isolados clínicos;
- A viabilidade celular da porfirina **4-H₂TMePor** na concentração de 20,81 µg/mL (CIM) inibiu o crescimento bacteriano de PA01 em 90 minutos sob irradiação com luz branca;
- O mecanismo de fotoinativação da porfirina **4-H₂TMePor** é via oxigênio singlete;
- A associação de **4-H₂TMePor** e o antimicrobiano IMP frente a cepa PA01 resultou em sinergismo;
- Os biofilmes formados de PA01 e dos isolados clínicos obtiveram diferença estatística significativa quando comparados ao controle positivo;
- A destruição dos biofilme de PA01 e dos isolados clínicos apresentaram diferença estatística quando se utilizou a porfirina **4-H₂TMePor** com exposição a luz branca;
- A microscopia de força atômica evidenciou estrutura de PA01 quando tratada com **4-H₂TMePor** resultou em deformação em sua parede celular mesmo em concentração de ½ CIM;
- A porfirina **4-H₂TMePor** mostrou-se atóxica, segura e eficiente.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, E. et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. **BMC Microbiol.** v.9, n.1, p 1-13, 2009.
- ALBUQUERQUE, M.B.M. **O papel das novas associações de b-lactâmicos com inibidores de b-lactamases no tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos.** 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de São Paulo, 2020.
- ASATI, S.; CHAUDHARY, U. Prevalence of biofilm producing aerobic bacterial isolates in burn wound infections at a tertiary care hospital in northern India. **Annals of burns and fire disasters**, v. 30, n. 1, p. 39, 2017.
- AZAM, M.W; KHAN, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discov Today.** v.24, p. 350-359, 2019.
- BALASUBRAMANIAN, D. et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. 1-20, 2013.
- BONNETT, R. Chemical aspects of photodynamic therapy. **CRC Press**, 2014.
- BOTELHO, J.; FILIPA G.; LUÍSA, P."Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*–Mechanisms, epidemiology and evolution." **Drug Resistance Updates.** v.44, p.26-47,2019.
- BOUCHER, H.W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, vol. 48, p. 1-12, 2009.
- BRAGA, G. et al. Auto agregação da 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-metoxifenil) porfirina (tmpp): estudos espectroscópicos e análises multivariadas. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 648-652, 2014.
- BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Effects of photoproducts on the binding properties of protoporphyrin IX to proteins. **Biophysical chemistry**, v. 96, n. 1, p. 77-87, 2002.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, 2011.
- BUSH, K.; BRADFORD, P.A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.
- CALIXTO, G.; BERNAGOSSI, J.; FREITAS, L.; FONTANA, C.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 2016.
- CALZAVARA P.G.P.; VENTURINI M, SALA R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **J Photochem Photo biol B**, v.78, p.1-6, 2005.
- CHIODINI, P. L. et al. Imipenem/cilastatin in the treatment of serious bacterial infections. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 7, n.3, p. S490-S495, 1985.

- DAI, T.; HUANG, Y.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 6, n. 3-4, p. 170-188, 2009.
- DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **J. Immunopathol. Pharmacol**, v.17, n.3, p. 245–54, 2004.
- DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature review scancer**, v. 3, n. 5, p. 380, 2003.
- DOS SANTOS ALVES, C. F. et al. Antimicrobial, antitrypanosomal and antibiofilm activity of *Equisetum hyemale*. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 119-125, 2016.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**, v.5, p. 1213-1219, 2003.
- DRISCOLL, J.A.; BRODY, S.L.; KOLLEF, M.H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, v. 67, n. 3, p. 351-368, 2007.
- FRIEDRICH, K. et al. Microbiology and resistance in first episodes of spontaneous bacterial peritonitis: Implications for management and prognosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 31, n. 6, p. 1191-1195, 2016.
- GAMELAS, Sara R.D. et al. Photoinactivation of *Escherichia coli* with water-soluble ammonium-substituted phthalocyanines. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 7, p. 4044-4051, 2020.
- GAYNES, R. The Discovery of penicillin-New insights after more the 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n.5, p. 849-853, 2017.
- GOLOVKINE, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* transmigrates at epithelial cell-cell junctions, exploiting sites of cell division and senescent cell extrusion. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 1, p. e1005377, 2016.
- HALL-STOODLEY, L.; Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v.2, n.2, p. 95-108, 2004.
- HAMBLIN, M.R; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemistry and Photobiology Science**, v.3, n.5, p. 436-45-, 2004
- HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes **Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research**, v.10, n.4, p. 441-451, 2010.
- HONGCHARU, W. et al. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 183-192, 2000.
- HÖNIGSMANN, H. History of phototherapy in dermatology. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 12, n. 1, p. 16-21, 2013.

HUSZCZYNSKI, S.M. et al. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. **Pathogens**, v. 9, n.1, p. 6, 2020.

JORI, G.; BROWN, S.B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 403-405, 2004.

JORI G, F. C et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg Med**, v.38, p.468-81. 2006.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.

KALKA, K; MERK, H; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389-413, 2000.

KENNEDY, J.C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: basic principles and present clinical experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 6, n. 1-2, p. 143-148, 1990.

KAHAN, J. S. et al. Thienamycin, a new β -lactam antibiotic I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. **The Journal of antibiotics**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 1979.

KHARKWAL, G. B.; SHARMA, K.; HUANG, Y.; DAI, T. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p. 755–767, 2011.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Z. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of dental research**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

LIPSON R. L, GRAY M. J, BALDES E. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer, **Ninth International Cancer Congress.**, v. 20, n. 12, p. 2255- 2257, 1967.

LUKSIENE, Z. *et al.* Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Med. (Kaunas)**, v. 39, p. 1137–1150, 2003.

LUKŠIENE, Ž. New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 411-418, 2005.

MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, n. 8, p. 947-83, 2009.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers MedSci**, v. 22, p. 83-91, 2007.

MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic in activation of bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1518-1526, 2015.

MARCIEL, L. et al. An efficient formulation based on cationic porphyrins to photoinactivate *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Future Med Chem**, v.10, p.1821-1833, 2018.

MCDONAGH, A.F. Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. **Journal of Perinatology**, v. 21, n. 1, p. S7-S12, 2001.

MURRAY, T.S.; LEDIZET, M.; KAZMIERCZAK, B.I. Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. Pt 5, p. 511, 2010.

NIKAIDO, H. Multi drug resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v.78, p. 119-146, 2009.

NOGUEIRA, Daiana Kotra Deda. **Derivados porfirínicos nanoencapsulados como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica**. 2011, 195p. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

NÓUER, S. A. **Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente**. 2005, 144p. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

NOWAK, A. et al. Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy—mechanisms and applications. **PostepyBiochem.** v. 59, p. 53–63, 2013.

OLIVEIRA, K. T. et al. Conceitos fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do tipo Porphirinas, clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015.

Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. <https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos> , 2017 (accessed 07 June 2022)

PACZKOWSKI, J. E. et al. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, , v. 292, p. 4064-4076, 2017.

PAPP-WALLACE, K.M; ENDIMIANI, A.; TARACILA, M.A; BONOMO, R.A. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol. 55, p. 4943-60, 2011.

PASICH, E. et al. Mechanism and risk factors of oral biofilm formation. **Postepy higieny i medycyny doswiadczonej**, v. 67, p. 736-741, 2013.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2008.

PRAŽMO, E.J. et al. Photodynamic Therapy as a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wrocław Medical University**, v. 25, n. 4, p. 799-807, 2016.

- RABB, O. Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoren. **Z. Biol**, v. 39, p. 524-526, 1900.
- RAGÀS, X.; AGUT, M.T; NONELL, S. Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 5, p. 770-776, 2010.
- RAMSEY, D.M.; WOZNIAK, D.J. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. **Molecular microbiology**, vol. 56, p. 309-22, 2005.
- RASMUSSEN, T. B. et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1799-1814, 2005.
- RHEE, E.G. et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of single and multiple doses of relebactam, a β -lactamase inhibitor, in combination with imipenem and cilastatin in healthy participants. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. e00280-18, 2018.
- RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **J Intern Med**, v. 272, p. 541-61, 2012.
- RUMBAUGH, K.P., SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nat Rev Microbiol**, v.18, p. 571–586, 2020.
- RYBTKE, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. **Journal of Molecular Biology**, v.427, n. 23, p. 33628-3645, 2015.
- SANTIN, G. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. **Science World Journal**, p.1-9, 2014.
- SAUVAGE, S.; HARDOUIN, J. Exoproteomics for better understanding *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 571, 2020.
- 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.
- SHARMA, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets, **Biologicals**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014.
- SHARMAN, W. M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug discovery today**, v. 4, n. 11, p. 507-517, 1999.
- SHIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.
- STOODLEY, P. et al. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

- STRATEN, D. Van; MASHAYEKHI, V.; BRUIJN, H. S. De; OLIVEIRA, S.; ROBINSON, D. J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. **Cancers**, v. 9, n. 19, p. 1–54, 2017.
- STRATEVA, T.; MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 4, p. 717-732, 2011.
- TANG, H.M; HAMBLIN, M.R; YOW, C.M. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug resistant pathogens. **Journal Infect Chemother**, v.13, p.87-91, 2007.
- THI, M.T.T.; WIBOWO, D.; REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Int. J. Mol. Sci**, v. 21, n. 22: 8671, 2020.
- VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. **Munch Med Wochenschr**, v.47, p. 2042–2044, 1903.
- WAGENER, B.M et al. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors in Cytoskeletal Dysregulation and Lung Barrier Dysfunction. **Toxins (Basel)**, v.13, e-776, 2021.
- WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, n.1, p. 13-28, 1998.
- WILHELM, M.C. **Avaliação da atividade de amicacina e polimixina b isoladamente e combinados com imipenem frente a isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmico**. Dissertação (mestrado em ciências médicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.
- WINEKLER, K. Focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT). **Journal of Photochemistry and Photobiology**. 86: 43-44.2007.
- ZHAO, B.; HE, YU-YING. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. **Expert review of anticancer therapy**, v. 10, n. 11, p. 1797-1809, 2010.