

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

Grazielle Guidolin Rossi

**FOTOINATIVAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO
RÁPIDO POR PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS**

Santa Maria, RS
2023

Grazielle Guidolin Rossi

**FOTOINATIVAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO POR
PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marli Matiko Anraku de Campos
Coorientador: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Santa Maria, RS
2023

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

Rossi, Grazielle Guidolin
Fotoinativação de micobactérias de crescimento rápido
por porfirinas tetra-catiônicas / Grazielle Guidolin
Rossi.- 2023.
79 p.; 30 cm

Orientadora: Marli Matiko Anraku de Campos
Coorientador: Bernardo Almeida Iglesias
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2023

1. Micobacterioses 2. Fotoinativação 3. Porfirinas I.
Campos, Marli Matiko Anraku de II. Iglesias, Bernardo
Almeida 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.

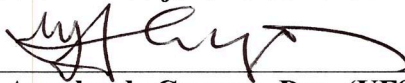
Declaro, GRAZIELLE GUIDOLIN ROSSI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, 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.

Grazielle Guidolin Rossi

**FOTOINATIVAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO POR
PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 23 de janeiro de 2023:



Marli Matiko Anraku de Campos, Dra. (UFSM)
Presidente/Orientador



Bernardo Almeida Iglesias, Dr. (UFSM)
Coorientador

Documento assinado digitalmente

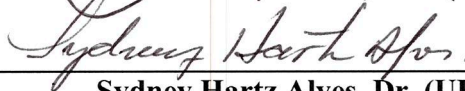
gov.br

RICARDO WAGNER DIAS PORTELA
Data: 09/02/2023 16:53:05-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Ricardo Wagner Portela, Dr. (UFBA)



Sônia de Avila Botton, Dra. (UFSM)



Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Documento assinado digitalmente

gov.br

WILTON ROGERIO LUSTRI
Data: 07/02/2023 16:30:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Wilton Rogério Lustri, Dr. (UNIARA)

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste estudo, obrigada pelo auxílio, compreensão e dedicação. De uma maneira especial, agradeço:

- a Deus, por renovar minhas forças, iluminar meus passos e me manter no caminho certo durante todos esses anos;

- a Universidade Federal de Santa Maria, universidade pública e de qualidade, por me permitir desenvolver e concretizar este trabalho;

- aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) por contribuírem com minha formação;

- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos;

- aos professores membros da banca, pela disposição e por avaliarem este trabalho;

- a minha orientadora e amiga, Prof. Dra. Marli Mariko Anraku de Campos, pelas oportunidades de formação e por acompanhar minha trajetória acadêmica e científica;

- ao meu coorientador e amigo, Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias, que foi essencial para a realização de todas as etapas desse trabalho;

- aos meus queridos colegas e eternos amigos do Laboratório de Micobacteriologia, Caren Mizdal, Kevim Guterres, Liliana Moraes, Pauline Bonez e Vanessa Agertt. Obrigada pelo convívio diário, pela amizade, pela parceria e por toda ajuda;

- a toda minha família, em especial aos meus pais e as minhas irmãs, por tudo que me proporcionaram, pelo carinho, pelo afeto e pelo apoio. Vocês são minha fortaleza.

- ao meu noivo Lucas Ottonelli, por ser tão importante em minha vida, sempre me instigar a crescer profissionalmente e me valorizar tanto como pessoa. Obrigada por dividir comigo as alegrias e angústias. Obrigada por todo amor e paciência.

- ao meu pequeno amiguinho Fred que sempre me acompanhou nos estudos, me energizando com muito amor e carinho;

- a minha amiga Loiva Ottonelli, obrigada pelo carinho e por sempre me colocar em suas orações;

- as minhas amigas Aline Silveira, Fernanda Cabral, Jeane Binotto e Siara Silvestri, obrigada pelas palavras de incentivo, pelas boas risadas e pela amizade;

Por fim, a todos que compartilharam comigo essa caminhada, minha gratidão.

RESUMO

FOTOINATIVAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO POR PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS

AUTORA: Grazielle Guidolin Rossi
ORIENTADORA: Marli Matiko Anraku de Campos
COORIENTADOR: Bernardo Almeida Iglesias

A Terapia de Fotoinativação Antimicrobiana (TFIa) é uma modalidade emergente de tratamento não invasiva, que envolve o uso de um fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular para inativar microrganismos. Dessa forma, a aplicação da TFIa vem ganhando destaque no campo da microbiologia especialmente no tratamento de infecções que persistem após a antibioticoterapia convencional. Neste cenário, incluem-se as micobacterioses que, por não possuírem muitas opções terapêuticas disponíveis e por necessitarem de um tratamento lento, constituem, alvos promissores da TFIa. Desse modo, o objetivo deste trabalho é explorar a ação de porfirinas neutras (**4-TPyP** e **3-TPyP**) e tetra-catiônicas, com complexos periféricos de platina(II) (**3-PtTPyP/4-PtTPyP**) e paládio(II) (**3-PdTPyP/4-PdTPyP**), sobre cepas de Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) causadoras de infecções de pele e mucosas. Neste estudo foram utilizadas cepas padrão de *Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense* (ATCC 48898), *Mycolicibacterium fortuitum* (ATCC 6841) e *Mycolicibacterium smegmatis* (ATCC 700084). Para tanto, a suscetibilidade dos microrganismos na forma planctônica foi obtida através de técnicas convencionais de microdiluição e pelo ensaio de curva de morte. A determinação de possíveis espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelos FS foi realizada utilizando-se compostos sequestradores destas espécies reativas. O impacto dessas porfirinas na superfície micobacteriana pode ser visualizado e analisado através das imagens obtidas pela técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA). Os resultados demonstraram a significativa atividade antimicrobiana das porfirinas em estudo, com destaque para os isômeros *meta*-substituídos **3-PtTPyP** e **3-PdTPyP**. Ademais, o oxigênio singlete (1O_2) foi a principal espécie reativa detectada, sendo atribuída a ela a atividade predominante nos danos foto-oxidativos. Por fim, a atividade bactericida de porfirinas de Pt(II) e Pd(II) foi comprovada em duas sessões de irradiação e as imagens da MFA demonstram a agressão dessas porfirinas na parede celular bacteriana, além da sua influência nas propriedades de adesão nano-mecânicas e eletrostáticas. Sendo assim, as porfirinas apresentaram-se como uma ferramenta útil e promissora para erradicar MCR diretamente pelo controle remoto da irradiação de luz. O impacto e contribuição científica deste trabalho estão alicerçados na descoberta de uma potencial nova abordagem terapêutica contra infecções micobacterianas cutâneas e, além disso, estimulam o aprofundamento em metodologias que visem a inserção das porfirinas como um novo agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Porfirinas. Fotoinativação. Oxigênio Singlete. Micobacterioses.

ABSTRACT

PHOTOINACTIVATION OF RAPIDLY GROWING MYCOBACTERIA BY TETRA-CATIONIC PORPHYRINS

AUTHOR: Grazielle Guidolin Rossi
ADVISOR: Marli Matiko Anraku de Campos
CO-ADVISOR: Bernardo Almeida Iglesias

Antimicrobial Photodynamic Inactivation (aPDI) is an emerging non-invasive treatment that involves the use of a photosensitizer (PS), light and molecular oxygen to inactivate microorganisms. Thus, the application of aPDI has been gaining prominence in the field of microbiology, especially in the treatment of infections that persist after conventional antibiotic therapy. In this scenario are included mycobacterioses, because they do not have many therapeutic options available and they require a slow treatment, thus being promising targets of aPDI. The objective of this work is to explore the action of neutral (**4-TPyP** and **3-TPyP**) and tetra-cationic porphyrins, with peripheral complexes of platinum(II) (**3-PtTPyP/4-PtTPyP**) and palladium(II) (**3-PdTPyP/4-PdTPyP**), on Rapidly Growing Mycobacteria (RGM) strains that cause skin and mucous infections. In this study were used standard strains of *Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense* (ATCC 48898), *Mycolicibacterium fortuitum* (ATCC 6841), and *Mycolicibacterium smegmatis* (ATCC 700084). For this purpose, the susceptibility of microorganisms in the planktonic form was obtained through conventional microdilution techniques and by the time-kill curve. The determination of possible reactive oxygen species (ROS) produced by the PS was carried out using compounds that scavenge these reactive species. The impact of these porphyrins on the mycobacterial surface can be visualized and analyzed through images obtained by the Atomic Force Microscopy (AFM) technique. The results demonstrated the significant antimicrobial activity of the studied porphyrins, with emphasis on the *meta* substituted isomer **3-PtTPyP** and **3-PdTPyP**. Furthermore, singlet oxygen (1O_2) was the main reactive species detected, being attributed to it the predominant activity in photo-oxidative damages. Finally, the bactericidal activity of Pt(II) and Pd(II) porphyrins was proven in two irradiation sessions, and the AFM images demonstrate the aggression of these porphyrins on the bacterial cell wall, also their influence on nano-mechanical adhesion and electrostatic properties. Therefore, porphyrins are a useful and promising tool to eradicate RGM directly via remote control of light irradiation. The impact and scientific contribution of this work are based on the discovery of a potential new therapeutic approach against cutaneous mycobacterial infections and, in addition, they stimulate the deepening of methodologies that aim at the insertion of porphyrins as a new antimicrobial agent.

Keywords: Porphyrins. Photoinactivation. Singlet Oxygen. Mycobacteriosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1- Infecção de pele e tecidos moles por espécies de MCR	19
Figura 2- Representação esquemática da disposição dos componentes do envelope celular micobacteriano	22
Figura 3- Forma fibrocavitária da doença pulmonar por <i>M. massiliense</i>	23
Figura 4- Morfologia das micobactérias.....	25
Figura 5- Ilustração dos mecanismos fotoquímicos de diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante a ação fotodinâmica.....	31
Figura 6- Relação entre os comprimentos de onda da luz e a profundidade de penetração na pele.....	33
Figura 7- Representação da estrutura molecular do anel macrociclo porfirínico.....	36

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Figure 1- Representative structure of porphyrins studied in this work	43
Figure 2 - Time-kill curve for (A) <i>M. abscessus</i> , (B) <i>M. massiliense</i> , (C) <i>M. fortuitum</i> , and (D) <i>M. smegmatis</i> strains exposed to different concentrations of 4-PtTPyP with white-light illumination at a fluence rate of 50 mW/cm ² at 90 min.....	44
Figure 3- Time-kill curve for (A) <i>M. abscessus</i> , (B) <i>M. massiliense</i> , (C) <i>M. fortuitum</i> , and (D) <i>M. smegmatis</i> strains exposed to different concentrations of 3-PtTPyP with white-light illumination at a fluence rate of 50 mW/cm ² at 90 min.....	44
Figure 4- Representative topographic images of <i>M. smegmatis</i> when submitted to four processing: (a) dark condition, (b) white-light condition, (c) 3-PtTPyP treatment in dark condition, and (d) 3-PtTPyP treatment in white-light condition, respectively.	45

Figure 5- Topographic (top) and electric force (bottom) maps of <i>M. smegmatis</i> when submitted to dark condition, light condition, porphyrin treatment in dark, and light condition	46
---	----

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Figure 1- Structural representation of <i>meso</i> -tetra(pyridyl)porphyrins with [Pd(bpy)Cl] ⁺ complexes coordinated at the <i>para</i> (4-PdTPyP) or <i>meta</i> (3-PdTPyP) <i>N</i> -pyridyl position. Counter-ion hexafluorophosphate (PF ₆ ⁻) is omitted for clarity	52
Figure 2- Time-kill curve experiments of (A) <i>M. abscessus</i> , (B) <i>M. massiliense</i> , (C) <i>M. fortuitum</i> , and (D) <i>M. smegmatis</i> with the <i>meso</i> -tetra-cationic porphyrin 3-PdTPyP	54
Figure 3- AFM images of (a) dark condition, (b) dark condition + porphyrin, (c) light condition, (d) light condition + porphyrin	55
Figure 4 - Topographic and electric force maps of when submitted to dark, light, and 3-PdTPyP porphyrin treatment in dark and white-light conditions.....	56

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1- Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon (1959) 14

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Table 1- MIC values (in $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the porphyrins tested against the RGM strains under different dark and white-light illumination conditions, respectively42

Table 2- MIC values for tetra-cationic porphyrins **3-PtTPyP** and **4-PtTPyP** in the presence of ascorbic acid (AA), dimethyl sulfoxide (DMSO), *tert*-butanol (t-BuOH), and *N*-acetylcysteine (NAC)45

Table 3- The inserted table shows the variation of adhesion force, length and width of the *Mycolicibacterium smegmatis* before and after the **3-PtTPyP** treatment in dark and white-light condition46

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Table 1- MIC values ($\mu\text{g}/\text{mL}$; μM) of porphyrins against RGM strains under dark and white LED light conditions ($50 \text{ mW}/\text{cm}^2$ and $270 \text{ J}/\text{cm}^2$)..... 53

Table 2- MIC values (in $\mu\text{g}/\text{mL}$ and μM) for **4-PdTPyP** porphyrin in the presence of ROS scavengers (ascorbic acid – AA; dimethyl sulfoxide – DMSO; *tert*-butanol – tBuOH; *N*-acetylcysteine – NAC) under white LED light conditions ($50 \text{ mW}/\text{cm}^2$ and $270 \text{ J}/\text{cm}^2$)..... 54

Table 3- MIC values (in $\mu\text{g}/\text{mL}$ and μM) for **3-PdTPyP** porphyrin in the presence of ROS scavengers (ascorbic acid – AA; dimethyl sulfoxide – DMSO; *tert*-butanol – tBuOH; *N*-acetylcysteine – NAC) under white LED light conditions ($50 \text{ mW}/\text{cm}^2$ and $270 \text{ J}/\text{cm}^2$)..... 54

Table 4 - Length, width, and adhesion force of mycobacteria under the dark condition, dark condition + porphyrin, light condition, and light condition + porphyrin, respectively.

.....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Arabinogalactano
Ag85	Antígeno 85
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BAAR	Bacilos Álcool-ácido Resistentes
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMIB	Concentração Mínima de Inibição do Biofilme
DMT	Dimicolatos de Trealose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPL	Glicopeptidolipídio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IACS	Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde
LAM	Lipoarabinomanana
LJ	Löwenstein-Jensen
<i>log Pow</i>	Coefficiente de Partição
MCL	Micobactérias de Crescimento Lento
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
MDR-TB	Tuberculose Resistente a Múltiplas Drogas
MM	Micomembrana
MMT	Monomicolatos de Trealose
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
MPI	Manosídeo Fosfatidil-mio-inositol
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
•O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
•OH ⁻	Radicais Hidroxila
PG	Peptidoglicano
PL	Fosfolipídios

PNB	Ácido p-nitro Benzóico
RNA	Ácido Ribonucleico
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
TAG	Triacilglicerol
TB	Tuberculose
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFIa	Terapia de Fotoativação Antimicrobiana
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
Φ_{Δ}	Rendimento Quântico de Oxigênio Singlete
3-PdTPyP	<i>meso</i> -tetra(3-piridil)porfirina de paládio(II)
3-PtTPyP	<i>meso</i> -tetra(3-piridil)porfirina de platina(II)
3-TPyP	<i>meso</i> -tetra(3-piridil)porfirina
4-PdTPyP	<i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirina de paládio(II)
4-PtTPyP	<i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirina de platina(II)
4-TPyP	<i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirina
5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	13
1	INTRODUÇÃO	14
1.1	MICOBACTÉRIAS	14
1.1.1	Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)	16
1.1.1.2	Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR)	18
1.1.2	Estrutura Celular Micobacteriana	21
1.2	DIAGNÓSTICO DAS MICOBACTERIOSES.....	22
1.3	ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DAS MICOBACTÉRIAS.....	25
1.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS MICOBACTÉRIAS	27
1.5	NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS	30
1.5.1	Porfirinas	35
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL.....	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	39
3.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1	39
3.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	50
4	DISCUSSÃO	59
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	63
	REFERÊNCIAS	64

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi redigido de acordo com as normas do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A seção **INTRODUÇÃO** inclui uma apresentação sobre o assunto investigado e sua relevância, bem como, uma revisão bibliográfica sobre os temas discutidos nesta Tese. Os resultados encontram-se nos tópicos **ARTIGO CIENTÍFICO 1** e **ARTIGO CIENTÍFICO 2**, os quais englobam as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, representando a íntegra deste estudo. Ambos os trabalhos estão formatados de acordo com o periódico aos quais foram publicados e/ou submetidos.

Os tópicos **DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS** apresentam interpretações e comentários gerais acerca do conteúdo abordado nesta tese, assim como sugestões de abordagens futuras. As **REFERÊNCIAS** remetem somente às citações que aparecem nos tópicos **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO**.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICOBACTÉRIAS

O gênero *Mycobacterium* pertence à família Mycobacteriaceae, subordem Corynebacterineae da ordem dos Actinomycetales. Constituído de 200 espécies, que inclui vários patógenos humanos, além de inúmeras outras espécies ambientais, esse gênero é classificado em três grupos: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* que é responsável por causar a tuberculose (TB), *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase, e as micobactérias não tuberculosas (MNT), responsáveis pelas micobacterioses (AHAMAD; GUPTA; PARASHAR, 2022; SHAMAEI; MIRSAEIDI, 2021).

Diversas classificações têm sido propostas para as micobactérias baseadas em características como genótipo, tempo de crescimento, patogenicidade, origem, relação agente-hospedeiro, habitat, relação com o complexo *M. tuberculosis*, entre outras (RUNYON, 1959; TSUKAMURA, 1967). Runyon, por exemplo, em 1959, classificou as MNT em quatro grupos distintos com base no tempo de crescimento, morfologia da colônia e pigmentação (Tabela 1). Os microrganismos com tempo de crescimento semelhante a *M. tuberculosis* (superior a uma semana) integram os grupos I, II e III, e são classificados como de crescimento lento (MCL). No grupo IV encontram-se as MNT de crescimento rápido (MCR), as quais crescem bem em meios bacteriológicos de rotina em menos de sete dias. Os grupos de crescimento lento são ainda diferenciados de acordo com sua capacidade de produzir pigmento: as fotocromogênicas (grupo I) produzem pigmento apenas após exposição à luz; as escotocromogênicas (grupo II) produzem pigmento independentemente da exposição à luz e as não cromogênicas (grupo III) nunca produzem pigmento na obscuridade, mas podem pigmentar-se de amarelo ou rosa quando exposta à luz (SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ, 2021; TURENNE, 2019).

Tabela 1- Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon (1959)

(continua)

GRUPOS	ESPÉCIES	TEMPO DE CRESCIMENTO
Grupo I	<i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>	Lento

Tabela 1: Micobactérias de acordo com a classificação de Runyon (1959)

(conclusão)

GRUPOS	ESPÉCIES	TEMPO DE CRESCIMENTO
Grupo II	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>	Lento
Grupo III	Complexo <i>M. avium</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. ulcerans</i>	Lento
Grupo IV	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. massiliense</i>	Rápido

Fonte: Adaptado de SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ (2021).

Entretanto, embora a separação entre as MCL e as MCR seja apoiada, a confiabilidade dos métodos usados para discernir esses dois grupos, particularmente a coesão das MCR, permanece questionável (GUPTA; LO; SON, 2018; TURENNE, 2019). Devido a isso, uma nova classificação para o gênero *Mycobacterium* foi proposta por Gupta et al. (2018) baseando-se nas análises filogenômicas abrangentes e genômicas comparativas de 150 espécies de micobactérias para entender suas inter-relações. Essa reclassificação distribuiu as micobactérias em cinco subgêneros distintos com seus respectivos clados: *Mycobacterium* (clado *Tuberculosis-Simiae*), gênero novo *Mycolicibacter* (clado *Terrae*), gen. nov. *Mycolicibacillus* (clado *Triviale*), gen. nov. *Mycolicibacterium* (clado *Fortuitum-Vaccae*) e gen. nov. *Mycobacteroides* (clado *Abscessus-Chelonae*).

A maioria das espécies de crescimento lento concentra-se no clado "*Tuberculosis-Simiae*", bem como os principais patógenos humanos, membros do complexo *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium simiae*. O restante das micobactérias de crescimento superior a 7 dias se agrupa e forma os clados "*Terrae* e *Triviale*". *Mycolicibacillus koreense* e *Mycolicibacillus triviale* compreendem o clado "*Triviale*", enquanto as espécies intimamente relacionadas a *Mycolicibacter terrae* compõem o clado "*Terrae*". Do mesmo modo, as espécies de

crescimento rápido foram distribuídas nos clados “*Abscessus-Cheloniae*” e “*Fortuitum-Vaccae*” (BACHMANN et al., 2020; CHIN et al., 2020; GUPTA; LO; SON, 2018).

1.1.1 Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)

As micobactérias tornaram-se uma grande preocupação para a saúde pública no século 20. A TB e a hanseníase tomaram proporções epidêmicas, dispersando-se em todo o mundo, uma vez que as infecções causadas por MNT foram amplamente negligenciadas. No entanto, a partir de 1950, relatos de infecções por MNT começaram a ser documentados. O maior número destas notificações ocorreu devido o controle da TB, dando-se mais importância às micobacterioses, e ao aprimoramento das técnicas de cultura e identificação das MNT (GUGLIELMETTI et al., 2015; TURENNE, 2019).

Os primeiros relatos de MNT no ambiente de imunossupressão estão associados aos pacientes com câncer, em 1976. Da mesma forma, na década de 80, com o cenário da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), as micobacterioses ganharam força, principalmente causadas pelo patógeno *M. avium*. Nessas circunstâncias, a falta de terapia antirretroviral adequada juntamente com o aumento de pacientes imunocomprometidos (transplantados, com terapia imunossupressora ou quimioterapia), dificultou a supressão das micobacterioses (GUGLIELMETTI et al., 2015; HENKLE; WINTHROP, 2015).

As MNT compreendem hoje um grupo heterogêneo com mais de 150 espécies ambientais comumente isoladas de água, solo, poeira e de animais (HUANG; YU; HUANG, 2020; LOPEZ-LUIS et al., 2020). Algumas MNT são patógenos oportunistas e o ambiente é a suposta fonte de infecção nos indivíduos, uma vez que essas doenças normalmente não são contagiosas. As infecções causadas por esse grupo de bacilos normalmente estão associadas aos fatores de riscos (imunossupressão, doenças pulmonares estruturais, bronquiectasia), podendo ser pulmonares e extrapulmonares; as infecções do trato respiratório estão entre as mais prevalentes, seguidas por linfadenite dos gânglios cervicais em crianças, infecções disseminadas em pacientes imunodeprimidos e infecções da pele (LOPEZ-LUIS et al., 2020; MIRETTI et al., 2022; SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ, 2021).

Em contraste com *M. tuberculosis*, não é obrigatório o relato de infecções por MNT, impedindo dados de incidência precisos. Apesar disso, MNT são reconhecidas como agentes etiológicos de infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS), que também é considerado um importante problema de saúde pública (SHARMA; UPADHYAY, 2020; TO et al., 2020).

O número de infecções associadas a MNT vem aumentando gradativamente em todo o mundo e, em países com padrões socioeconômicos mais elevados, este aumento está associado ao declínio das taxas de TB. No entanto, a prevalência dessa doença em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento ainda permanecem incertas (DUMIC; LUTWICK, 2021; MIRABAL; FERRER, 2020; THORNTON e al., 2021).

Apesar dessa tendência global crescente, ainda existem poucos estudos publicados no Brasil documentando a ocorrência de MNT (WILDNER, 2011). Barreto e Campos (2000) publicaram um estudo com a identificação de 590 culturas de MNT isoladas em todo o país no período de 1994 a 1999. As principais espécies identificadas foram as pertencentes ao complexo *M. avium* (44,4%), seguidas de *M. kansasii* e *Mycolicibacterium fortuitum*. De 2003 a 2008, foram relatados 2.102 casos de infecção por MNT de crescimento rápido distribuídos pelos estados do Rio de Janeiro (1.014), Pará (315), Espírito Santo (244), Goiás (230), Paraná (110), Rio Grande do Sul (79), São Paulo (43), Mato Grosso (21), Distrito Federal (16), Minas Gerais (10), Piauí (09), Mato Grosso do Sul (08), Bahia (02) e Paraíba (01) (BRASIL, 2008). A maioria das infecções foram relacionadas às falhas nos processos de limpeza, desinfecção e esterilização de produtos médicos. A principal espécie identificada nesse período foi *Mycobacteroides massiliense*, seguida de *M. fortuitum*, que prevaleceu nas infecções associadas à mamoplastia de aumento. Além disso, outras espécies foram detectadas: *Mycobacteroides abscessus*, *Mycobacteroides bolletii*, *Mycobacteroides chelonae*, *Mycolicibacterium smegmatis*, *Mycobacteroides wolinskyi* e *M. avium* (BRASIL, 2009, BRASIL, 2011).

Devido aos surtos de infecções por esses patógenos oportunistas, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou, em 2009, a notificação compulsória das infecções causadas por MNT (BRASIL, 2009). Desse modo, foram registrados, de janeiro de 2010 até setembro de 2014, mais 207 casos (suspeitos, prováveis e confirmados) de infecções por micobactérias. Do total de casos notificados no período, 71% envolveram procedimentos de cirurgias de mama e outros procedimentos invasivos (BRASIL, 2014).

Quanto a notificações relacionadas à doença pulmonar por MNT, foram registrados 2.731 novos casos no período de 2013 a 2019. Os dados do Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose (SITE-TB) descrevem que a micobactéria com maior incidência no período foi *M. kansasii*, com 622 casos, seguida de espécies complexo *M. avium* e do complexo *M. abscessus*, com 612 e 339 casos, respectivamente. A região com maior número de notificações foi a Sudeste com 1.555 novos casos, seguida da região Sul que notificou 461 novos casos (BRASIL, 2021).

1.1.1.2 Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR)

As espécies classificadas como MCR compõem aproximadamente metade das espécies de micobactérias atualmente validadas e estão reunidas em dois clados. O clado “*Abscessus-Cheloniae*” (gen. nov. *Mycobacteroides*), que forma a linhagem ramificada mais antiga do gênero *Mycobacterium*, é representado por espécies como *M. cheloniae*, *M. abscessos*, *M. bolletii*, *M. immunogenum* e *M. massiliense*. O segundo clado *Fortuitum-Vaccae* (gen. nov. *Mycolicibacterium*) abrange a maioria das MCR, incluindo aquelas relacionadas a *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. parafortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. smegmatis*, *M. goodii* e *M. wolinskyi* (BACHMANN et al., 2020; CHIN et al., 2020; GUPTA; LO; SON, 2018).

Este grupo de micobactérias são altamente resistentes, sendo capazes de se desenvolver mesmo em ambientes hostis (pouco nutrientes, pH ácido e temperaturas extremas) (COMBA et al., 2022; MOGHADDAM et al., 2022). Como apresentam certa resistência às práticas de descontaminação com desinfetantes convencionais (cloro, organomercuriais e glutaraldeídos alcalinos), a maioria dos surtos estão relacionados aos procedimentos inadequados de esterilização e/ou desinfecção (ARFAATABAR; KARAMI; KHALEDI, 2021; DE GROOTE; HUITT, 2006; MOGHADDAM et al., 2022). Aliado a isso, a frequente presença desses microrganismos na água de torneira de hospitais, a relativa resistência aos agentes esterilizantes, sua habilidade em sobreviver e crescer em água destilada e dentro de amebas, bem como seu frequente envolvimento na formação de biofilmes contribuem para que espécies de MCR causem IACS (ARFAATABAR; KARAMI; KHALEDI, 2021; CARDOSO, 2009).

Entre as espécies de MNT, as MCR são as mais comumente isoladas em laboratórios clínicos, causando doenças que variam de indivíduos saudáveis a imunodeprimidos (FORBES et al., 2018; SHARMA; UPADHYAY, 2020). Entre o amplo espectro de infecções provocadas por esses patógenos oportunistas, encontram-se as infecções em cateter, da pele e tecidos moles, respiratórias, do endocárdio, meninges ou infecção óssea e doença disseminada (COMBA et al., 2022; HATAKEYAMA et al., 2017).

As infecções pulmonares geralmente são associadas a indivíduos que apresentam doenças pulmonares estruturais (doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasia, sequelas de TB pulmonar prévia e fibrose cística) e entram em contato com aerossóis contendo esses bacilos (GILL; DOMINIC; TIBERI, 2021; SHARMA; UPADHYAY, 2020). Os sintomas são variáveis e muitas vezes inespecíficos, entretanto, frequentemente o paciente apresenta tosse

persistente e pigarro com pouca ou nenhuma secreção produtiva. A doença pulmonar tende a ser progressiva, levando à diminuição da função pulmonar do paciente e, em alguns casos, pode levar à insuficiência respiratória aguda. Os membros do complexo *M. abscessus-chelonae* são a fonte mais importante para esse tipo de infecção, sendo *M. abscessus* o patógeno mais comumente encontrado (45% a 65%), seguido de *M. massiliense* (20% a 55%) e *M. bolletii* (1% a 18%) (BENTO; GOMES; SILVA, 2020; KOH, 2017; MIRABAL; FERRER, 2020; SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ, 2021).

Quando associadas às infecções de pele e tecidos moles, as MCR apresentam-se como pápulas, pústulas, nódulos, abscessos, paniculite, foliculite ou placas, de aspecto eritematoso ou violáceo (Figura 1). As lesões podem, posteriormente, se tornarem ulceradas e resultarem na disseminação hematogênica em hospedeiros imunocomprometidos. *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* são as principais MCR relatadas em casos de infecções pós-cirúrgicas ou pós-traumáticas, mas novas espécies como *M. goodii* e *M. massiliense* foram recentemente relatadas (FARIA; JOÃO; JORDÃO, 2015; SUN et al., 2022; SHARMA; UPADHYAY, 2020; WINBURN; SHARMAN, 2020).

Figura 1- Infecção de pele e tecidos moles por espécies de MCR



Fotos de infecção por *M. abscessus* apresentando-se como escrofuloderma com extensa destruição de tecido nas áreas cervical e supraclavicular direita (A) e infecção causada por *M. fortuitum* associada à mesoterapia (B).
Fonte: FRANCO-PAREDES et al. (2019).

Esse tipo de infecção pode ocorrer após um pequeno trauma ou uma inoculação inadvertida, como acontece quando a pele é perfurada por lascas de madeira, espinhos de peixe ou agulhas. Do mesmo modo, essas infecções também podem surgir pelo uso prolongado de cateteres intravenoso ou peritoneal, procedimentos estéticos (mamoplastia de aumento, lipoaspiração), cirurgias, injeções e colocação de *piercing* de mamilo. O aumento do

uso de provedores de medicina alternativa e procedimentos realizados em centros cirúrgicos autônomos sem fiscalização adequada, associados com a utilização de água de torneira não estéril para procedimentos médicos e limpeza inadequada dos instrumentos, resultam no crescimento de casos deste tipo infecções (DE GROOTE; HUITT, 2006; JONES et al., 2019; SUN et al., 2022; WINBURN; SHARMAN, 2020).

Em um estudo retrospectivo de 78 pacientes com infecções cutâneas por MNT, as principais espécies identificadas foram as pertencentes ao grupo *M. abscessos* (32 isolados), seguidas de *M. fortuitum* (18 isolados) e *Mycobacterium marinum* (14 isolados). Ainda, espécies pertencentes ao complexo *M. avium*, *Mycolicibacterium neoaurum*, *Mycolicibacterium moriokaense*, *Mycolicibacterium monacense* e *Mycolicibacterium rutilum* também foram detectadas. Destes pacientes, 30,8% apresentavam história de imunossupressão, e *M. abscessus* foi o principal patógeno associados a esta condição (41% dos pacientes). O estudo também relaciona as infecções com possíveis traumas e exposições ambientais sofridas pelos pacientes (PHILIPS et al., 2019).

Surtos de infecções cutâneas por *M. fortuitum* têm sido associadas a banhos de pés nas hidromassagens em salões de beleza da Califórnia e Geórgia (STOUT et al., 2011; WINTHROP et al., 2004). As infecções de pele devido a outras MCR, como *M. chelonae*, foram observadas após procedimentos de tatuagem. A fonte mais frequente deste tipo de infecção é a diluição de tinta preta com água não estéril, mas também pode ocorrer durante o processo de fabricação da tinta, na utilização de equipamentos contaminados para aplicação da tatuagem no estúdio, bem como durante cuidados posteriores da tatuagem pelo indivíduo (CONAGLEN et al., 2013; PHILIPS et al., 2014). Da mesma forma, a esterilização insuficiente e a resistência adquirida aos glutaraldeídos levaram a pseudo-surtos de *M. bolletii* associados aos broncoscópios e endoscópios contaminados (GUIMARÃES et al., 2016).

O aumento da incidência de micobacterioses cutâneas também foi descrito por Wentworth et al. (2013). Neste estudo, foi relatado um aumento de três vezes na incidência de infecções cutâneas por NTM em um período de 30 anos. As espécies mais comuns relatadas foram *M. marinum* (45%) e *M. chelonae/M. abscessus* (32%). Do mesmo modo, um estudo em Taiwan relatou um aumento médio de 12,5 casos de infecção de pele e tecidos moles por MNT por ano. Sendo que no período de estudo (1987-2008), o número de pacientes infectados com MCR cresceu, enquanto os casos com pacientes com MCL permaneceram constantes (CHEN et al., 2011).

A forma disseminada da doença, envolvendo o sangue, sistema nervoso central ou outros locais dispersos, pode ocorrer particularmente para espécies mais virulentas, como *M.*

abscessus e *M. avium* (MISCH; SADDLER; DAVIS, 2018). Quando isoladas do sangue, as MCR devem ser consideradas patógenos verdadeiros e não possíveis contaminantes, como pode ocorrer em isolados pulmonares. A doença na forma disseminada envolve principalmente pessoas imunodeprimidas e muitas vezes são consequências de uma infecção localizada por MCR. Essas infecções intravasculares podem levar ao abscesso do miocárdio, endocardite e infecções de dispositivos eletrônicos implantáveis (JONES et al., 2019).

1.1.2 Estrutura Celular Micobacteriana

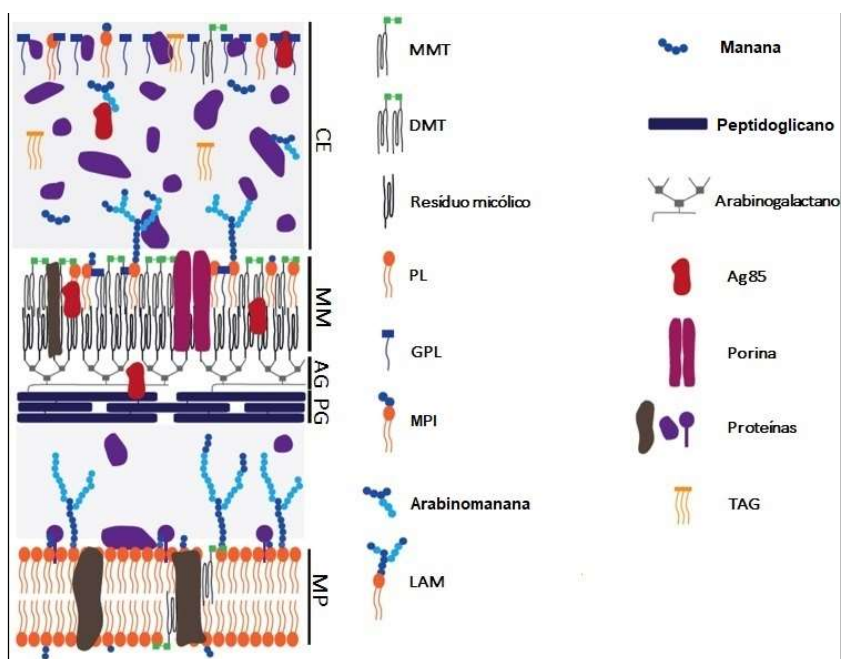
As micobactérias são bacilos aeróbicos não formadores de esporos, retos ou ligeiramente curvos, com dimensões que variam de 0,2µm a 0,7µm de largura e 1µm a 10µm de comprimento. Este grupo de microrganismos se destaca por possuírem uma camada cérea - formada por grande quantidade de ácidos micólicos - e uma parede celular espessa e altamente hidrofóbica, a qual lhe fornece o caráter álcool-ácido resistente quando coradas pela fucsina fenicada na coloração de Ziehl-Neelsen (AHAMAD; GUPTA; PARASHAR, 2022; SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ, 2021).

Este envelope incomum constitui quase um terço do peso total da célula micobacteriana e, portanto, grande parte da energia gerada pela micobactéria é usada na síntese e reparo da parede celular (SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ, 2021). Apesar disso, sua composição ainda não é totalmente esclarecida. O modelo mais atual e aceitável divide a parede celular em três partes: camada externa, parede celular e membrana plasmática convencional (CHIARADIA et al., 2017; DAFFÉ; QUÉMARD; MARRAKCHI, 2017).

A composição da camada externa é variável entre as espécies de micobactérias, sendo constituída de polissacarídeos nas mais patogênicas, bem como proteínas e uma pequena quantidade de lipídeos, que incluem os glicopeptidolipídio (GPLs) e glicolípídeos fenólicos. A parede celular, nomeada de complexo tripartite gigante, é formada por três camadas: a micomembrana (MM), arabinogalactano (AG) e peptidoglicano (PG). Este complexo é composto inicialmente por uma camada de PG (ácido N-glicolilmurâmico) responsável por cobrir a membrana citoplasmática. Ligado de forma covalente a eles, estão as cadeias de AG que, por sua vez, estão esterificadas na sua extremidade com ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos micólicos. Os ácidos micólicos compõem o folheto interno da MM, enquanto no folheto externo, estão presentes lipídios facilmente removíveis com solventes orgânicos, como fosfolipídios (PL), trecolos de trealose, GPLs e lipoglicanos. A Figura 2 demonstra a

complexidade da parede celular das micobactérias (CHIARADIA et al., 2017; DAFFÉ; DRAPER, 1998; DAFFÉ; QUÉMARD; MARRAKCHI, 2017).

Figura 2- Representação esquemática da disposição dos componentes do envelope celular micobacteriano



Parede celular de *M. smegmatis*, composta por três camadas: camada mais externa (CE), parede celular e membrana plasmática (MP). A parede celular é dividida em micomembrana (MM), arabinogalactano (AG) e peptidoglicano (PG).

MMT: monimicolatos de trealose; DMT: dimicolatos de trealose; PL: fosfolípidios; GPL: glicopeptidolipídio; MPI: Manosídeo fosfatidil-mio-inositol; LAM: lipoarabinomanana; TAG: triacilglicerol; Ag85: antígeno 85.

Fonte: Adaptado de CHIARADIA et al. (2017).

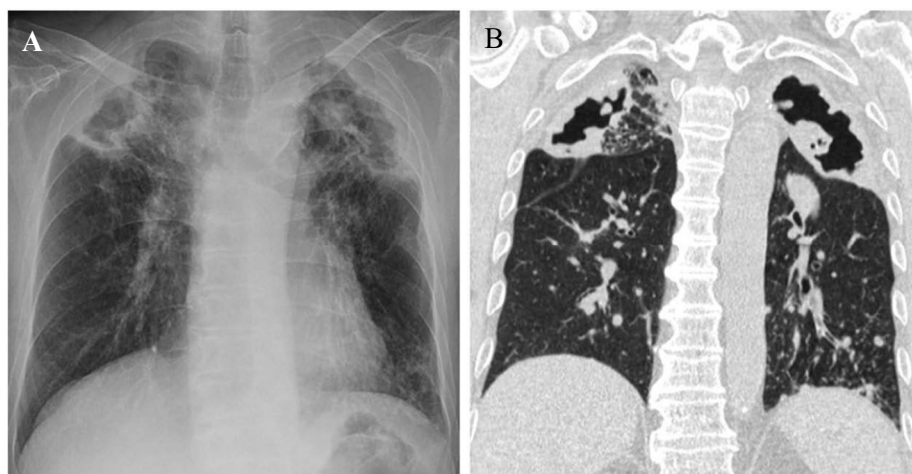
1.2 DIAGNÓSTICO DAS MICOBACTERIOSES

As micobacterioses são doenças de diagnóstico e tratamento desafiadores pois passam por um demorado processo de identificação e determinação de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos. Além disso, são naturalmente resistentes ou possuem pouca suscetibilidade aos fármacos tuberculostáticos. Aliado a esses fatores, um baixo índice de suspeita clínica pode, muitas vezes, resultar em tratamento ineficiente de infecções por MNT (ALFFENAAR et al., 2021; LIU et al., 2021a; SHARMA; UPADHYAY, 2020).

Considerando que esses microrganismos são comumente encontrados no ambiente, a sua presença em amostras clínicas deve ser diferenciada entre um possível agente patogênico

e um agente comensal/colonizador (GOPALASWAMY et al., 2020; THORNTON et al., 2021). Deste modo, quando responsável pela doença pulmonar, o diagnóstico das MNT deve considerar alguns critérios. Além dos sintomas característicos e a exclusão de outros agentes potenciais de doença pulmonar, é necessária a positividade de duas ou mais culturas de amostra de trato respiratório para a mesma espécie de MNT. Podem ser utilizadas como amostras clínicas o escarro, o lavado bronco-alveolar ou biópsia transbrônquica. Além disso, a avaliação mínima deve incluir uma radiografia de tórax ou, na ausência de cavitação, uma tomografia computadorizada de alta resolução (Figura 3) (GILL; DOMINIC; TIBERI, 2021; KUMAR et al., 2022; TO et al., 2020; WENG et al., 2020).

Figura 3- Forma fibrocavitária da doença pulmonar por *M. massiliense*



Radiografia de tórax (A) e tomografia computadorizada de alta resolução (B) com enormes cavidades bilaterais nos lobos superiores provocadas por infecção de *M. massiliense* combinada com aspergilose.
Fonte: KWON et al. (2019).

Cerca de 20 a 30% dos isolados de MNT se originam de doenças extrapulmonares, sendo a infecção de pele ou tecidos moles a manifestação mais comum (WI, 2019). Micobacterioses cutâneas tendem a apresentar um diagnóstico tardio devido ao amplo espectro de apresentações clínicas da doença e à falta de suspeita de infecções por MNT. A avaliação laboratorial é realizada através da cultura da biópsia de tecido lesado, entretanto o material obtido da drenagem das lesões também pode ser utilizado (ERBER et al., 2020; FRANCO-PAREDES et al., 2019; NQWATA; OUÉDRAGO, 2022). Na análise histológica, é

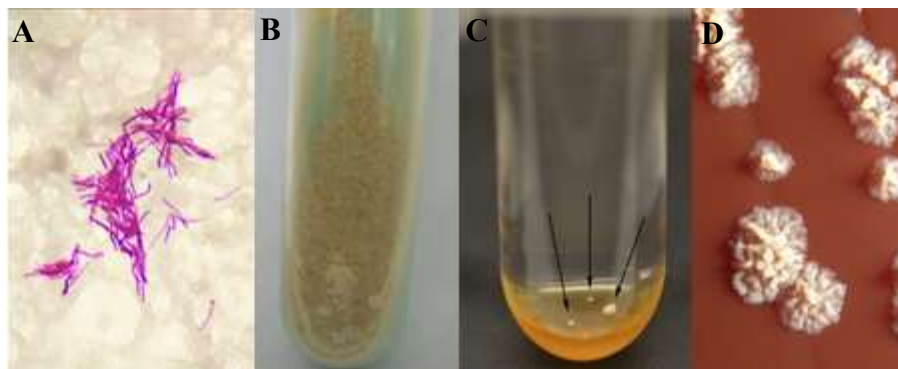
visualizado granulomas supurativos e ocasionalmente necrotizantes, além de células gigantes de corpo estranho (EMMERICH; FABRI, 2017).

O diagnóstico laboratorial dessas espécies envolve o isolamento e a correta identificação do microrganismo. Todas as amostras clínicas, exceto sangue e medula óssea, devem ser examinadas pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen, para a presença ou não de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). A cultura em meios de crescimento é a preferida para diferenciação entre espécies de MCR e MCL, além disso é o teste diagnóstico considerado padrão-ouro. Deste modo, após o processo de descontaminação da amostra, o isolamento do microrganismo é realizado em cultura de Lowenstein-Jensen (LJ) ou Ogawa. Meios de cultura sólidos permitem a observação das colônias e a categorização de espécies com base na pigmentação, entretanto meios de cultura líquidos (enriquecidos com Middlebrook 7H9) tendem a ser utilizados para recuperação e crescimento dos isolados (GOPALASWAMY et al., 2020; LOPEMAN et al., 2019; VIANA-NIERI, 2008).

Ainda neste contexto, meios contendo ácido p-nitro benzóico (PNB) são rotineiramente utilizados para distinção entre MNT e *M. tuberculosis*. Neste ensaio o crescimento de *M. tuberculosis* é inibido pelo PNB, enquanto os MNT são resistentes e se desenvolvem no meio de cultura (GOPALASWAMY et al., 2020). Além disso, outras características fenotípicas como taxa de crescimento, pigmentação, morfologia da colônia e reações em uma bateria de testes bioquímicos são utilizadas pelos laboratórios para diferenciação entre as espécies (AZADI et al., 2018; FORBES et al., 2018; GOPALASWAMY et al., 2020; LOPEMAN et al., 2019). Sendo assim, a detecção fenotípica de espécies de crescimento rápido, como *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, foi anteriormente baseada principalmente no crescimento inferior a 7 dias, BAAR positivo, morfologia da colônia, resistência ao PNB e uma arilsulfatase positiva em 3 dias (Figura 4) (BROWN-ELLIOTT; PHILLEY; SCHLOSSBERG, 2017).

Entretanto, devido à grande variedade de espécies que compõe este grupo, a identificação precisa em nível de espécie não é mais possível sem a utilização de técnicas moleculares e espectroscopia de massas. Neste contexto, ferramentas diagnósticas mais avançadas envolvem sondas de DNA, sequenciamento de genes (de RNA ribossômico 16S, *hsp65*, *rpoB* ou a região espaçadora intergênica 16S-23S) e MALDI-TOF (FORBES et al., 2018; FRANCO-PAREDES et al., 2019; MISCH; SADDLER; DAVIS, 2018).

Figura 4- Morfologia das micobactérias



Aspectos micro e macroscópicos na identificação de espécies de MCR. (A) Esfregaço, com coloração álcool-ácido resistente, positivo para *M. fortuitum*; (B) Cultura de *M. chelonae* em meio LJ; (C) Crescimento de micobactérias em forma de aglomerados em meio líquido; (D) Crescimento de *M. fortuitum* em ágar chocolate. Fonte: LAGE et al. (2015) e PEÑA et al. (2012).

1.3 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DAS MICOBACTÉRIAS

A incidência de doenças por MCR é amplamente subestimada e, muitas vezes, o diagnóstico incorreto como TB é comum devido à sua semelhança morfotintorial sob exame microscópico na triagem inicial. Entretanto, essas espécies não respondem aos esquemas clássicos de medicamentos para TB, resultado na ineficiência terapêutica (SHARMA; UPADHYAY, 2020; SUN et al., 2022). Deste modo, devido a variabilidade nos perfis de suscetibilidade das MCR, o tratamento destas infecções ocorre em cada caso, levando em consideração a espécie isolada e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos realizado (GILL; DOMINIC; TIBERI, 2021; SUN et al., 2022).

Ainda neste contexto, é importante destacar que os regimes de tratamento para esse grupo de microrganismos não foram extensamente explorados por ensaios clínicos, com exceção da monoterapia com claritromicina para infecções por *M. chelonae*. Geralmente, as decisões são embasadas em testes de resistência *in vitro*, estudos de caso e opiniões de especialistas publicadas nas diretrizes (ALFFENAAR et al., 2021; COMBA et al., 2022; EMMERICH; FABRI, 2017; STRNAD; WINTHROP, 2018; THORNTON e al., 2021).

A terapia na maioria das vezes envolve mais de um fármaco, visando evitar a seleção de cepas resistentes (TO et al., 2020). Para doenças cutâneas, o tratamento permanece por um período de 4 a 6 meses com uma combinação inicial de antimicrobianos parenterais por pelo menos 2 semanas (QUANG; JANG, 2021). Entretanto, quando esses microrganismos são

responsáveis por doenças pulmonares, a terapêutica tende a ser mais extensa, podendo durar até 24 meses (LIU et al., 2021a; WU et al., 2018). Além disso, dependendo da gravidade e localização da infecção, a cirurgia pode ser uma importante abordagem complementar para o tratamento dessas doenças (GILL; DOMINIC; TIBERI, 2021).

Estes patógenos oportunistas geralmente são testados contra macrolídeos, quinolonas, oxazolidinonas, tetraciclina e aminoglicosídeos, bem como fármacos beta-lactâmicos de amplo espectro (GILL; DOMINIC; TIBERI, 2021; SAMARANAYAKE et al., 2020). O *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomenda que a suscetibilidade dos isolados frente aos agentes antimicrobianos seja realizada pelo método de microdiluição em caldo Müller-Hinton, utilizando diluições seriadas de fator 2. Além disso, o protocolo M24-A2, determina que os ensaios sejam executados com os seguintes fármacos: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolida, moxifloxacino, sulfametoxazol e tobramicina (CLSI, 2011). Ensaios como disco-difusão e *E-test* são utilizados por alguns laboratórios nos testes de triagem destes microrganismos, entretanto fornecem resultados inconsistentes (SAMARANAYAKE et al., 2020; STRNAD; WINTHROP, 2018).

Para algumas espécies de MCR, como as pertencentes ao complexo *M. fortuitum*, os avanços na terapia antimicrobiana, incluindo os macrolídeos, fluoroquinolonas e oxazolidinonas, melhoraram as opções terapêuticas. Enquanto para outras micobactérias, especialmente *M. abscessus*, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de melhores, mais eficazes e seguros antimicrobianos orais (BROWN-ELLIOT; WALLACE, 2002; GUGLIELMETTI et al., 2015; LANGE et al., 2022; MEIR; BARKAN, 2020).

As espécies pertencentes ao complexo *M. abscessus-chelonae* são extremamente difíceis de curar, sendo, em alguns casos, comparáveis à Tuberculose Multirresistente (MDR-TB) (ALFFENAAR et al., 2021; BENTO; GOMES; SILVA, 2020; QUANG; JANG, 2021). *M. abscessus*, por exemplo, possui uma elevada resistência natural à maioria das classes de antimicrobianos (SAMARANAYAKE et al., 2020; SUN et al., 2022). Outra preocupação no tratamento de infecção por *M. abscessus* é a falta de evidência de que sua susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos corresponde à eficácia *in vivo* no tratamento da doença pulmonar (BENTO; GOMES; SILVA, 2020; LOPEMAN et al., 2019). As doenças causadas por subespécies do complexo *M. abscessus* (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*) podem ser tratadas com uso de um macrolídeo (quando adequado), um aminoglicosídeo (amicacina) e, pelo menos, outro antimicrobiano de classe diferente (imipenem/cefoxitina). A terapêutica deve consistir em um regime inicial com

administração medicamentosa intravenosa e oral, por 2 a 4 meses, seguido por uma fase de continuação compreendendo antimicrobianos orais e inalatórios (BENTO; GOMES; SILVA, 2020; MEIR; BARKAN, 2020; QUANG; JANG, 2021).

Quanto à resposta aos tratamentos pulmonares por MCR, as taxas são críticas. Enquanto que para espécies de crescimento lento, como os representantes do complexo *M. avium*, cerca de 70-80% dos tratamentos sofrem a conversão da cultura prolongada (permanecer negativo durante e após o tratamento), para as espécies de crescimento rápido, como *M. abscessus* e *Mycobacterium xenopi*, esse número cai para 40-50% (QUANG; JANG, 2021; VAN INGEN; KUIJPER, 2014; WU et al., 2018). Devido a isso, frequentemente, a forma pulmonar da infecção por MCR requer um tratamento cirúrgico associado ao tratamento medicamentoso (KUMAR et al., 2022; NQWATA; OUÉDRAGO, 2022).

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS MICOBACTÉRIAS

A resistência antimicrobiana é um mecanismo adaptativo de preservação da espécie, que dificulta o tratamento de infecções em todo o mundo. Além de constituir um enorme ônus financeiro aos serviços de saúde, ela é responsável por milhares de mortes por infecções persistentes. Estima-se que até 2050, a taxa de mortalidade mundial associada à resistência antimicrobiana pode alcançar o número de 10 milhões de pessoas, acarretando em um prejuízo de até 100 trilhões de dólares (MALDONADO-CARMONA; OUK; LEROY-LHE, 2022; SONGCA; ADJEI, 2022).

As micobactérias possuem de uma resistência natural proporcionada por sua parede celular cerosa e impermeável (MIRETTI et al., 2022). Estudos da década de 1990 demonstraram que *M. chelonae*, uma espécie que ainda não havia sido diferenciada de *M. abscessus*, possui uma camada 10 a 20 vezes menos permeável que *M. tuberculosis* (JARLIER; NIKAIDO, 1994). A taxa de absorção reduzida proporcionada pela hidrofobicidade da membrana das MNT também foi comparada à da *E. coli*, e chegou a ser considerada inferior à 2% para compostos com cargas (JARLIER; NIKAIDO, 1994). Essas características de superfície implicam na grande resistência à água, dessecação, antimicrobianos e desinfetantes químicos por esses microrganismos. Além disso, outros mecanismos de resistência como bombas de efluxo, produção de biofilmes, enzimas inativadoras de antimicrobianos e mutações no gene-alvo, contribuem para falhas no tratamento das micobacterioses (DEGIACOMI et al., 2019; LOPEMAN et al., 2019; MIRETTI et al., 2022; SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ, 2021).

Os sistemas de exportação de drogas, como bombas de efluxo, são elementos adicionais que impedem o acúmulo intracelular de moléculas como fluoroquinolonas, tetraciclina, eritromicina e rifamicinas (DE ROSSI et al., 1998; LI; ZHANG; NIKAIDO, 2004; QUANG; JANG, 2021; SILVA et al., 2001). Muitas dessas proteínas transmembrana têm especificidade de substrato limitada e podem expelir uma ampla gama de substratos estruturalmente diferentes, conferindo assim resistência a vários antimicrobianos ao mesmo tempo (NASIRI et al., 2017). Como consequência, a eliminação de bombas de efluxo específicas em *M. smegmatis* aumenta sua sensibilidade às drogas em até 8 vezes (LI; ZHANG; NIKAIDO, 2004).

Do mesmo modo, a biotransformação enzimática dos antimicrobianos para uma forma menos ativa, ou até mesmo inativa, são sistemas de resistência comuns a estes patógenos. Devido a presença de enzimas como beta-lactamases (MAB_2875 e BlaMab), a maioria dos antimicrobianos beta-lactâmicos como penicilina e cefamicina não podem ser usados no tratamento de infecções micobacterianas. Esse problema também é registrado na terapia com os aminoglicosídeos, em que a presença da enzima 2'-N-acetiltransferase neutraliza os representantes dessa classe (DEGIACOMI et al., 2019; QUANG; JANG, 2021; WU et al., 2018).

A exposição bacteriana aos medicamentos pode também induzir a expressão de genes capazes de modificar o local de ligação do alvo medicamentoso. Um exemplo bem caracterizado dessa estratégia é a resistência induzível aos macrolídeos mediada pelo gene *erm*. Os macrolídeos são considerados uma ferramenta padrão no tratamento de infecções por MCR. No entanto, sua eficácia tem sido comprometida devido à resistência induzida a claritromicina por genes que codificam metilases ribossomais (genes *erm*). Esta resistência é apresentada por subespécies do complexo *M. abscessus* e ocorre devido à metilação de um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal (ALFFENAAR et al., 2021; WENG et al., 2020; WI, 2019). Cerca de 80% desses isolados são resistentes à claritromicina, e a detecção *in vitro* do gene é determinada pela incubação das micobactérias com claritromicina por 14 dias no ensaio de suscetibilidade (FORBES et al., 2018; GRIFFITH; DALEY, 2022).

Em um estudo de sequenciamento do gene induzível da metilase resistente à eritromicina, gene *erm(41)*, dos 330 isolados que se apresentaram suscetíveis aos macrolídeos após 72 h de incubação, 285 isolados foram identificados como *M. abscessus* e 45 como *M. chelonae*. Após a incubação prolongada dos isolados e o sequenciamento do gene, foi detectado que 94 isolados pertencentes ao complexo *M. abscessus* possuíam o gene *erm(41)*.

Entretanto, nenhum dos 45 isolados de *M. chelonae* analisados, incluindo uma única cepa com suscetibilidade intermediária no dia 14, continha o gene *erm(41)* (HANSON et al., 2014). Do mesmo modo, a resistência aos macrolídeos provocou falha no tratamento de 13 pacientes com doença pulmonar causada por *M. abscessus*. Neste estudo também é demonstrado que após a intervenção cirúrgica de ressecção, apenas um dos 13 pacientes obteve conversão da cultura de escarro (CHOI et al., 2017a). Resultado semelhante foi obtido em pacientes com doença pulmonar causada por *M. massiliense* resistente aos macrolídeos, em que apenas um dos 15 pacientes obteve a conversão de cultura após a cirurgia de ressecção da lesão (CHOI et al., 2017b).

Ainda neste contexto, a capacidade de formação de biofilmes pelas micobactérias confere ainda mais vantagens a estes microrganismos. Bactérias em biofilmes apresentam comportamento diferente em relação a sua forma planctônica (suspensas e dispersas no meio aquoso), principalmente no que diz respeito às taxas de crescimento e suscetibilidade aos tratamentos antimicrobianos (GARCÍA-COCA et al., 2020; RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021; WARRIER et al., 2021). Atualmente, acredita-se que mais de 80% das doenças infecciosas crônicas são mediadas por biofilmes, e o seu desenvolvimento em dispositivos médicos como próteses ortopédicas, cateteres, lentes de contato e endoscópios são comuns e geram grande preocupação para a saúde pública, uma vez que os antimicrobianos enfrentam dificuldades para exercer sua ação devido a barreira imposta pela estrutura compacta do biofilme (LI; LEE, 2017; SONGCA; ADJEI, 2022).

Em testes com antimicrobianos utilizados como terapia alternativa para MCR, Flores et al. (2016) mostraram a eficácia comprometida destas opções terapêuticas na inibição e destruição de biofilmes de *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense*. Neste contexto, vários outros estudos comprovam a redução da eficácia terapêutica frente a essa adaptação bacteriana. Biofilme de *M. avium* cultivado em um cateter é significativamente mais resistente à claritromicina e à rifamicina em relação as mesmas no estado planctônico (FALKINHAM, 2007). Do mesmo modo, *M. smegmatis* em sua forma séssil necessita de concentrações de isoniazida 8 vezes maiores do que a sua contraparte planctônica (TENG; DICK, 2003). Claritromicina, azitromicina e moxifloxacina são eficazes contra a formação do biofilme de *M. avium*, mas não em sua destruição (CARTER; YOUNG; BERMUDEZ, 2004). Greendyke e Byrd (2008) descreveram apenas um efeito bacteriostático da amicacina em biofilmes maduros de *M. abscessus*, enquanto a claritromicina é relativamente inativa. Biofilmes de duas variantes, morfotipo liso e morfotipo rugoso, de *M. abscessus* foram significativamente

mais tolerantes ao tratamento com antimicrobianos do que as bactérias planctônicas (CLARY et al., 2018).

1.5 NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

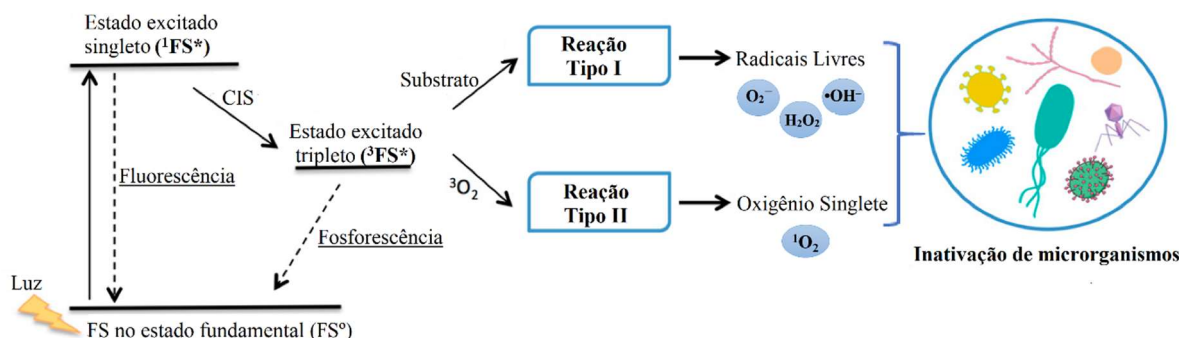
Apesar das tentativas da indústria farmacêutica em desenvolver novos produtos antimicrobianos para o tratamento de infecções resistentes, ainda existe um número limitado de agentes terapêuticos que são eficazes frente às micobacterioses. Para conter esse problema emergente de saúde pública, novas abordagens terapêuticas vêm surgindo na tentativa de suprir a resistência e a falta de antimicrobianos adequados (GUTERRES et al., 2022; SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ, 2021; SHLEEVA; SAVITSKY; KAPRELYANTS, 2021). A terapia fotodinâmica (TFD), uma técnica antiga, tradicionalmente conhecida para tratamento de doenças tumorais, foi rejuvenescida para combater “superbactérias” devido às suas excelentes propriedades não invasivas e um amplo espectro antimicrobiano (WU et al., 2022; RIBEIRO et al., 2022).

O primeiro relato da atuação da TFD no campo da microbiologia foi em 1900 onde Oscar Raab observou o efeito citotóxico da combinação de um corante acridina e luz solar sobre protozoários (WARRIER et al., 2021; YOUF et al., 2021). Apesar desta descoberta, o potencial da fotoinativação contra doenças de origem microbiana não foi explorado por várias décadas devido, principalmente, o surgimento dos antimicrobianos (DE MELO et al., 2012; MALDONADO-CARMONA; OUK; LEROY-LHE, 2022).

A terapia de fotoinativação antimicrobiana (TFIa) é um processo de vários estágios que requer a presença de uma molécula fotoativa, projetada como fotossensibilizador (FS), associada à luz de comprimento de onda adequado e ao oxigênio molecular (WANG et al., 2022). O princípio básico é que o FS combinado com células microbianas é ativado pela luz visível inofensiva e convertido em um estado excitado tripleto, que progride ainda mais ao longo de duas vias fotoquímicas simultâneas. Ambas as vias são dependentes de oxigênio para a produção das moléculas responsáveis por danos às estruturas celulares microbianas (SOUZA et al., 2020). No processo fotoquímico Tipo I, são geradas espécies radicalares como o superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), hidroxila ($\bullet\text{OH}^-$) e hidroperoxila ($\bullet\text{OOH}$), bem como espécies de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e/ou ânions superóxido (O_2^-). Já no processo do Tipo II prevalece a produção de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), uma espécie com tempo de vida curto e altamente citotóxica (KLAUSEN; UCUNCU; BRADLEY, 2020; YOUF et al., 2021). Essas

vias mediadas por espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser ilustradas pelo diagrama de Jablonski, como apresentado na Figura 5.

Figura 5- Ilustração dos mecanismos fotoquímicos de diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante a ação fotodinâmica



O fotossensibilizador (FS) no estado fundamental (FS⁰) é excitado para um estado singlete de alta energia (¹FS*) após a absorção de fótons. Este ¹FS* pode retornar ao FS⁰ por fluorescência ou pode ser convertido para um estado excitado tripleto (³FS*) por cruzamento intersistema (CIS). A partir desse estado tripleto, o ³FS* pode fosforescer quando retorna ao estado fundamental ou pode gerar EROs por meio de duas vias (Tipo I ou II). A via do Tipo I é baseada na transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio entre ³FS* e substratos orgânicos (membrana celular ou uma biomolécula) formando um radical de vida curta (³FS·), que reage facilmente com o oxigênio molecular e gera espécies radicalares como o superóxido (·O₂⁻), hidroxila (·OH) e/ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂). No processo Tipo II a energia é transferida diretamente do ³FS* para um oxigênio tripleto no estado fundamental (³O₂), resultando em oxigênio singleto altamente reativo (¹O₂).

Fonte: Adaptado de MESQUITA et al. (2018).

Os processos tipo I e tipo II ocorrem simultaneamente, entretanto a proporção entre eles depende de vários fatores como a natureza química do FS, as características do ambiente fisiológico (constante dielétrica do tecido, pH, tecido anóxico ou hipóxico) e a afinidade de ligação do FS com o substrato alvo. Quimicamente o ¹O₂ é mais reativo que as espécies radicalares, logo o processo Tipo II é dominante na TFIa sendo considerado essencial para a eficiência desta abordagem terapêutica (BENOV; CRAIK; BATINIC-HABERLE, 2012; RIBEIRO et al., 2022; WARRIER et al., 2021). Com base nesse contexto, a capacidade de geração de ¹O₂ pela molécula é um parâmetro importante utilizado para avaliar o potencial fotodinâmico do FS. O "rendimento quântico de oxigênio singleto" (Φ_{Δ}) representa o número de moléculas de ¹O₂ geradas a cada 100 fótons absorvidos, e seus valores podem ser expressos em porcentagem (KLAUSEN; UCUNCU; BRADLEY, 2020).

A formação dessas espécies *in situ* pode ser concentrada em tecidos infectados promovendo estresse oxidativo na membrana e/ou nos componentes celulares microbianos

(KLAUSEN; UCUNCU; BRADLEY, 2020; YOUF et al., 2021). Diferentemente dos antimicrobianos convencionais que visam uma estrutura-alvo específica, a TFIa é uma abordagem não seletiva com múltiplos alvos e modo de ação rápido (WANG et al., 2022; TANG et al., 2021). Sendo assim, uma vez que essas espécies são altamente reativas e apresentam um tempo de vida curto, apenas moléculas que estão próximas ao FS são diretamente afetadas. Para o $^1\text{O}_2$, por exemplo, dependendo do solvente circundante presente, seu raio de ação é de aproximadamente 20 nm e seu tempo de meia-vida estimado é de 40 ns. Portanto, o dano e o tipo de resposta desencadeada pela ativação do FS dependerão de sua localização intracelular (BENOV; CRAIK; BATINIC-HABERLE, 2012; HEFFRON et al., 2021; MYLONA et al., 2020).

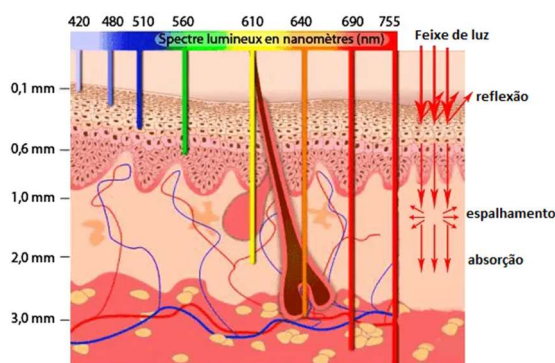
A fim de obter informações sobre o mecanismo de ação celular da TFIa com FS do tipo porfirina frente à *Candida albicans*, Voit et al. (2021) analisaram a localização do FS antes e após a irradiação. As análises por microscopia de fluorescência revelaram um acúmulo inicial da porfirina na parede celular fúngica. Posteriormente à irradiação, foi registrada a migração dos FS para o citosol celular. Essa mudança de localização foi associada ao aumento da permeabilidade membrana devido ao dano causado pelas EROs geradas após a irradiação. Esse fato também foi registrado quando utilizado azul de metileno como FS na fotoinativação de *C. albicans* (GIROLDO et al., 2009). Da mesma forma, o azul de metileno foi responsável pelo rompimento da parede rígida de *M. fortuitum* e o extravasamento do seu material citoplasmático foi relatado por Shih e Huang (2011). A supressão de fatores de virulência e danos ao DNA, também foram citados como alvos dessa modalidade terapêutica (DIGBY et al., 2021; FILA; KAWIAK; GRINHOLC, 2016; PERSADMEHR et al., 2014; SHRESTHA; CORDOVA; KISHEN, 2015; XU et al., 2016).

Porém, para ser um potencial agente terapêutico o FS deve cumprir certos requisitos. Além de elevada pureza, o composto deve ser estável e ter uma vida útil adequada, não devendo ser longa, pois poderia causar fotossensibilização prolongada nas células hospedeiras mesmo após a cura da infecção. O FS escolhido precisa possuir propriedades ópticas adequadas, sendo capaz de absorver luz de forma eficiente no comprimento de onda utilizado para a excitação, com boa geração de EROs e um rendimento quântico de fluorescência apreciável, além de exibir pouca ou nenhuma toxicidade quando não irradiado. Seletividade, segurança e eficácia também devem ser comprovadas (DA FONSECA; DE PAOLI; MENCALHA, 2022; RAN et al., 2021; YOUF et al., 2021).

Como um dos três elementos da TFIa, a luz é outro fator crucial e deve coincidir com a absorção máxima de cada FS utilizado (RIBEIRO et al., 2022). Entretanto, para permanecer

dentro da janela terapêutica, a luz utilizada deve possuir um comprimento de onda na faixa de 600-800 nm, sendo que a profundidade da sua penetração no tecido está correlacionada com o comprimento de onda utilizado para excitar os cromóforos (Figura 6). Para isso, uma variedade de dispositivos está disponível e são empregados no processo de fotossensibilização. Lasers, diodos emissores de luz (LED), lâmpadas incandescentes e fluorescentes são exemplos dos instrumentos mais explorados nessa tecnologia. Outros parâmetros como dose total de luz, tempo de exposição, potência média, esquema de fluência e fracionamento, também devem ser estabelecidos e contribuem para eficiência da dessa terapia (AKBIYIK et al., 2022; CIEPLIK et al., 2018; DE MELO et al., 2012; WARRIER et al., 2021).

Figura 6- Relação entre os comprimentos de onda da luz e a profundidade de penetração na pele



Fonte: Adaptado de LEE et al. (2020).

Com base nos critérios relatados a cima, a literatura descreve estudos com as mais variadas classes de FS. Essas moléculas são geralmente corantes aromáticas orgânicas com elétrons π deslocalizados, onde um cromóforo central é covalentemente ligado a ramificações substituintes auxiliares, o que contribui para uma maior deslocalização de elétrons (MYLONA et al., 2020). As estruturas baseadas em tetrapirrol como clorofilas, bacterioclorofilas, porfirinas, corroles e ftalocianinas, estão entre os grupos de moléculas mais estudadas por serem bons geradores de EROs. Da mesma forma, os xantenos halogenados constituem uma família de potentes FS, com destaque ao corante rosa bengala e seus derivados funcionais. O azul de metileno e de toluidina, que são corantes fenotiazínicos, se destacam por serem amplamente empregados na odontologia. Pigmentos perilenoquinonóides,

(hipocrisina), psoralenos e fulerenos também se demonstraram bons agentes antimicrobianos (GILABERTE et al., 2012; JIA et al., 2019; MESQUITA et al., 2018; RAN et al., 2021; XIONG; TIAN; AI, 2019).

Em geral, a TFIa é mais eficaz quando aplicada às infecções locais, especialmente em áreas de tecidos de fácil acesso, onde se torna mais simples a introdução de fontes de luz (RAN et al., 2021). A odontologia é um campo em que seu uso clínico é bem difundido, principalmente para tratamentos de periodontite, que são infecções bacterianas crônicas associadas à gengiva (DUKIC et al., 2013; MIYAZAKI et al., 2003; SCHWARZ et al., 2006). Estudos clínicos e relatos de casos também revelam seu potencial no combate de infecções fúngicas orais (CARMELLO et al., 2015, 2016; DOVIGO et al., 2013; MIMA et al., 2010). A sua aplicação em candidíase oral e estomatite dentária, por exemplo, foi descrita por ser tão eficaz quanto o tratamento antifúngico padrão (ALVES et al., 2017; MIMA et al., 2012).

Da mesma forma, o direcionamento da TFIa para o tratamento de infecções dermatológicas, sendo para restringir o uso de antimicrobianos ou para melhorar os resultados da terapêutica, foi relatado de forma promissora (CIEPLIK et al., 2018; GILABERTE et al., 2014). Em um estudo clínico de esporotricose cutânea, a combinação de baixas doses de itraconazol oral com três sessões de irradiação de azul de metileno, foi considerada suficiente para cura do paciente (GILABERTE et al., 2014). A literatura também descreve os efeitos da TFIa, mediada pelo ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), para o tratamento de úlceras cutâneas crônicas em membros inferiores infectados por *Pseudomonas aeruginosa*. Os procedimentos proporcionaram significativa melhora das infecções com uma tendência promissora para a cicatrização acelerada de feridas (LEI et al., 2015). Em um outro estudo, o uso dessa abordagem foi sugerido para tratamento de úlceras em pés diabéticos na tentativa de evitar as amputações. Como resultado, dos 18 pacientes submetidos à irradiação com azul de metileno e azul de toluidina, somente um sofreu a amputação do pé ulcerado. Diferentemente do grupo controle, em todos os pacientes tiveram seus membros amputados (TARDIVO et al., 2014).

Essa eficácia também foi registrada em infecções por *M. fortuitum*. Gong et al. (2016) descrevem a redução significativa no tempo de tratamento de múltiplos abscessos cutâneos causados por esse patógeno. A combinação do tratamento oral (feito com claritromicina, rifampicina, levofloxacina e cloridrato de etambutol) com aplicação de terapia fotodinâmica, utilizando 5-ALA como FS, resultou em cura do paciente em apenas um mês de tratamento. Resultado semelhante foi encontrado no tratamento de infecções de pele por *M. abscessus*, *M. gordonae*, *Mycolicibacterium gilvum* e *M. fortuitum* (SUN et al., 2017). As lesões cutâneas foram impregnadas com 5-ALA e irradiadas com luz vermelha. Esse procedimento foi

repetido a cada 10 dias, por 3 a 5 sessões, em combinação com antimicrobianos convencionais. Três meses após o tratamento combinado, os pacientes não apresentaram sinais de recidiva da doença.

1.5.1 Porfirinas

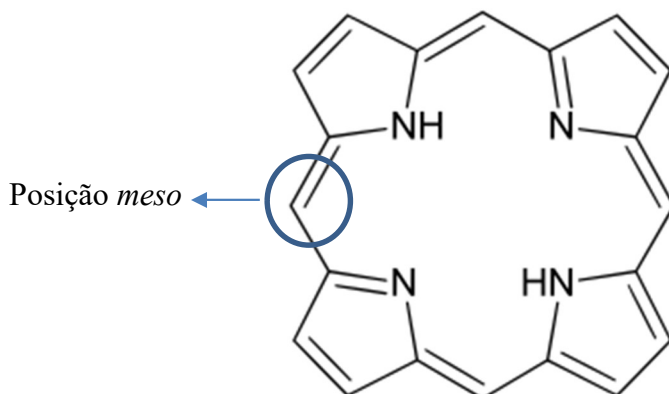
Embora já se conheçam as propriedades de um FS ideal, até hoje nenhuma molécula apresenta todas as características exigidas. No entanto, os corantes porfirínicos, derivados sintéticos ou naturais modificados, encaixam-se em grande parte destes requisitos listados, apresentando propriedades físico-químicas favoráveis para fins terapêuticos (AMOS-TAUTUA; SONGCA; OLUWAFEMI, 2019; MALATESTI; MUNITIC; JURAK, 2017; XIONG; TIAN; AI, 2019).

Esse grupo de compostos intensamente coloridos possuem o nome derivado da palavra grega “*porphura*”, que tem como significado “púrpura”, cor predominante da classe e atribuída ao seu núcleo tetrapirrólico (IMRAN et al., 2018). O fato de estarem amplamente presentes na natureza, tanto no transporte de oxigênio pelo grupo heme da hemoglobina, quanto na captação da energia luminosa pelas clorofilas, proporciona a eles boa tolerância pelo organismo (PARK et al., 2021; RAN et al., 2021; SILVA et al., 2021).

Do ponto de vista estrutural, a porfirina é composta por vinte átomos de carbono e quatro átomos de nitrogênio que estão interconectados por ligações de meteno (Figura 7). Dos 22 elétrons π que compreendem sua base livre, 18 estão conjugadas e são responsáveis pela sua extensa faixa de absorção, que se estende da região ultravioleta (UV) à região do infravermelho próximo (NIR) (DEDA et al., 2020; YU et al., 2020).

Essa estrutura altamente conjugada garante uma maior densidade elétrica nas quatro posições *meso* do anel, tornando-as mais reativas e favorecendo reações nos *meso*-carbonos. Da mesma forma, o fato dos átomos de nitrogênio estarem direcionados para o centro do anel, proporciona um quadrado mais ou menos rígido à molécula, tornando-a capaz de acomodar íons metálicos. A presença do metal, na região pirrólica e/ou na posição *meso*-carbono, gera uma subclasse de compostos nomeadas metaloporfirinas (CHOI et al., 2018; DEDA et al., 2020; GJUROSKI; FURRER; VERMATHEN, 2021; PARK et al., 2021).

Figura 7- Representação da estrutura molecular do anel macrociclo porfirínico



Fonte: Adaptado de LIN et al. (2020).

Essa ampla possibilidade de modificações estruturais faz com que as porfirinas sejam as moléculas mais estudadas no campo da TFIa. A sua capacidade de interação com as células bacterianas está intimamente relacionada com estrutura e propriedades físico-químicas da molécula. Em geral, porfirinas neutras, catiônicas e aniônicas, interagem facilmente com bactérias Gram-positivas. Entretanto, as bactérias Gram-negativas tendem a ser mais suscetíveis às porfirinas catiônicas. Essas diferenças de suscetibilidade podem ser explicadas pelas características de membrana de cada microrganismos (SHLEEVA; SAVITSKY; KAPRELYANTS, 2021). As bactérias Gram-positivas apresentam um envelope celular espesso, porém poroso, formado principalmente de uma rede aberta de peptidoglicano, ácido teicóico e ácidos lipoteicóicos, que permite a penetração de pequenos compostos moleculares através da parede celular. Já as bactérias Gram-negativas, além da camada de peptidoglicano, possuem uma membrana externa extra composta por lipopolissacarídeos de carga negativa, que confere uma barreira de permeabilidade a esses compostos (GONZÁLEZ-DELGADO et al., 2016; JIA et al., 2019; LIU et al., 2015; MESQUITA et al., 2018). Quanto às micobactérias, apesar de serem categorizadas como Gram-positivas, elas se comportam de maneira semelhante às bactérias Gram-negativas, com maior suscetibilidade às porfirinas catiônicas (FEESE; GHILADI, 2009; GUTERRES et al., 2019; SHLEEVA; SAVITSKY; KAPRELYANTS, 2021).

Entretanto, algumas abordagens são estudadas na tentativa de superar os problemas de eficiência de alguns FS (KLAUSEN; UCUNCU; BRADLEY, 2020). A coadministração de porfirinas com agentes desestabilizantes de membrana, como cloreto de cálcio (CaCl_2), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e nonapeptídeo de polimixina B (NPMB), é descrito por

provocar uma maior permeabilidade da célula bacteriana ao FS (GSPONER; SPESIA; DURANTINI, 2015; KLAUSEN; UCUNCU; BRADLEY, 2020; MULANI et al., 2019). Da mesma forma, a irradiação da porfirina na presença do sal de iodeto de potássio (KI), resultou em uma potencialização do seu efeito fotodinâmico frente a diferentes cepas microbianas (HUANG et al., 2017, 2018; REYNOSO et al., 2017). Essa irradiação conjunta permite a formação de espécies reativas de vida longa (iodo/tri-iodeto), as quais podem permanecer ativas por um período de duração mais longo, suficiente para prevenir o novo crescimento bacteriano (HAMBLIN; ABRAHAMSE, 2018).

Outras alternativas como a combinação da TFIIa com compostos antimicrobianos tradicionais (PÉREZ-LAGUNA et al., 2017; WOZNIAK; GRINHOLC, 2018), a introdução de metais na estrutura porfirínica, a conjugação das porfirinas com anticorpos monoclonais que reconhecem bactérias (EMBLETON et al., 2002, 2004) ou a peptídeos que penetram em bactérias (DONDI et al., 2016; HAMBLIN et al., 2002; ZHANG et al., 2019), além da sua combinação com nanopartículas (MANAGA; ANTUNES; NYOKONG, 2014; RIBEIRO et al., 2018), são descritas como mecanismos eficientes para ampliação do espectro de ação dos FS.

No entanto, é difícil comparar a eficácia entre essas diferentes abordagens combinatórias devido à falta de metodologias uniformes. Sendo assim, mais estudos sobre a investigação da toxicidade e biocompatibilidade das várias combinações devem ser realizados usando modelos *in vivo* para introduzi-los na prática clínica (ALVES et al., 2022; MACKAY et al., 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de porfirinas neutras e tetra-catiônicas contra cepas de Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) das porfirinas neutras (**3-TPyP/4-TPyP**) e tetra-catiônicas, com complexos periféricos de platina(II) (**3-PtTPyP/4-PtTPyP**) e paládio(II) (**3-PdTPyP/4-PdTPyP**), sobre as MCR;

2.2.2 Determinar as Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) dos fotossensibilizadores (FS) frente às cepas de MCR;

2.2.3 Detectar as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) envolvidas no processo de fotoinativação micobacteriana;

2.2.4 Analisar as propriedades nano-mecânica, elétricas e morfológicas de *Mycobacterium smegmatis* após tratamento com porfirinas tetra-catiônicas *meta*-substituídas pela técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA).

3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

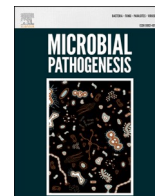
3.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Peripheral tetra-cationic Pt(II) porphyrins photo-inactivating rapidly growing mycobacteria: First application in mycobacteriology

Grazielle Guidolin Rossi, Kevim Bordignon Guterres, Carolina Hahn da Silveira, Kelly Schneider Moreira, Thiago Augusto Lima Burgo, Bernardo Almeida Iglesias and Marli Matiko Anraku de Campos.

Artigo publicado no periódico *Microbial Pathogenesis* (Fator de impacto: 3.848, Qualis A3) (Microbial Pathogenesis, 2020)

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104455>



Peripheral tetra-cationic Pt(II) porphyrins photo-inactivating rapidly growing mycobacteria: First application in mycobacteriology

Grazielle Guidolin Rossi^a, Kevim Bordignon Guterres^a, Carolina Hahn da Silveira^b, Kelly Schneider Moreira^c, Thiago Augusto Lima Burgo^c, Bernardo Almeida Iglesias^{b,*}, Marli Matiko Anraku de Campos^{a,**}

^a Laboratory of Mycobacteriology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Laboratory of Bioinorganic and Porphyrinic Materials, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Coulomb Electrostatic and Mechanochemical Laboratory, Universidade Federal de Santa Maria, Av Roraima 1000, Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Porphyrins
Pt(II) complexes
Photo-inactivation
Rapidly growing mycobacteria
Tetra-cationic pt(II)-porphyrins against NTMs
Use of antimicrobial photodynamic therapy against mycobacteriosis
Meta-isomer pt(II)-porphyrin very effectiveness against mycobacteria

ABSTRACT

In this manuscript, we report, for the first time, the photoinactivation evaluation of tetra-cationic porphyrins with peripheral Pt (II)-bpy complexes in the photodynamic inactivation (PDI) of rapidly growing mycobacterial strains (RGM). Two different isomeric Pt (II)-porphyrins were synthesized and applied. PDI experiments in the strains of *Mycobacteroides abscessus* subsp. *Abscessus* (ATCC 19977), *Mycolicobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense* (ATCC 48898), and *Mycolicobacterium smegmatis* (ATCC 700084) conducted with adequate concentration (without aggregation) of photosensitizers (PS) under white-light illumination for 90 min showed that the most effective PS significantly reduced the concentration of viable mycobacteria. The present results show that positively charged porphyrins at the meta position (**3-PtTPyP**) are more efficient PS against *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. massiliense*, and *M. smegmatis*. The effectiveness of the molecule as PS for PDI studies is also clear with mycobacteria, which is strongly related with the porphyrin peripheral charge and coordination platinum (II) compounds and consequently their solubility in physiological media. Tetra-cationic PS may be promising anti-mycobacterial PDI agents with potential applications in medical clinical cases and bioremediation.

1. Introduction

Porphyrins are among the main photosensitizers (PS) used in microorganism photo-inactivation studies. This PS consists of a tetrapyrrolic macrocyclic core with a high conjugation of 18 π -electrons and electronic transitions in the visible range with strong absorption in the blue region [1]. In addition, these PS are characterized by moderate to low *in vitro* and *in vivo* toxicity, which are active in inducing bacterial death without damaging human cells [2]. These compounds also have fast accumulation and retention in the target tissue, followed by moderate removal of the skin in reasonable amounts of time [3].

Characterized by having a high binding affinity to cellular components [4], membranes [5], proteins [6], and DNA [7], the literature reveals the broad spectrum of action of porphyrins against fungi and Gram-positive and Gram-negative bacteria in clinical trials [8,9], *in vivo*

[10–13], and *in vitro* [14–16] models. The clinical application of this technology in the treatment of nails affected by fungus has brought promising results in reducing treatment time and increasing healing effectiveness. For example, hematoporphyrin derivatives used to treat a patient with onychomycosis eradicated the fungus in a 6-week illumination period [8]. Likewise, hematoporphyrin suppressed oral biofilms from *Candida albicans* without harming the tongue tissue of mice *in vivo* trials [17].

Cationic porphyrins are of great interest for use as PS. There is special interest in positively charged porphyrins because of their strong electrostatic interactions with the polyanionic DNA backbone [7] and proteins [18]. Furthermore, the tetra-cationic *N*-methylated porphyrin (**H₂TMePyP⁺**) is used in PDT for the selective destruction of tumors due to its ability to produce singlet oxygen species [20]. The efficacy of cationic porphyrins as PS is mainly due to their widespread interaction

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: bernardo.iglesias@ufsm.br (B.A. Iglesias), marlimatiko@yahoo.com (M.M.A. de Campos).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104455>

Received 19 April 2020; Received in revised form 28 June 2020; Accepted 13 August 2020

Available online 15 August 2020

0882-4010/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

with negative charges of membranes and organelles, promoting porphyrin permeation and accumulation into the membrane with reactive oxygen species (ROS) generation after illumination [19].

Tetrapyrrolic macrocycles containing peripheral coordination polypyridyl transition metal complexes have recently been studied in the last decade [20–24], aiming to have coordinated transition metal complexes and porphyrinoid structures, which are useful for photo-physical, photochemical, photobiological properties, and photodynamic activity application, in the same molecule. After photo-activation processes, these porphyrin types in the presence of molecular oxygen generate ROS, such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) by energy transfer and/or radical species by electron transfer mechanisms [25].

This therapeutic strategy may be an alternative treatment for skin and mucous infections caused by microorganisms. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is the result of the association of a PS molecule with light energy of an appropriate wavelength and molecular oxygen, which generates ROS [26]. The different species of ROS produced during this interaction reacts with many bacterial biomolecules, leading to their oxidation and consequently photo-inactivation of the microorganism [25].

In the literature, several tests have already proven porphyrin activity against species of different clades of the genus *Mycobacterium* [27–29]. Strains of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) were, regardless of the drug resistance levels of the bacilli, inactivated using photodynamic processes. The application of illumination in an intermittent and repeated manner allowed the acceleration of bacillus inactivation as a way of avoiding sigmoid inactivation curves. In a mouse model with subcutaneous granulomas infected with *Mycobacterium bovis*, after treatment with benzoporphyrin derivatives, exposure to light killed significant numbers of extracellular and intracellular *M. bovis* [27]. More recently, *Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense* and *Mycolicibacterium fortuitum* were shown to be 100 times more susceptible to cationic porphyrins under white-light illumination compared to PS in dark conditions [29]. In this context, Shleeva and co-workers recently demonstrated the ability of *Mycolicibacterium smegmatis* to accumulate endogenous porphyrins during its transition to a dormant state, being inactivated when under lighting. However, this aPDT effect has yet to be reported with mycobacteria in the active state, as they are unable to accumulate significant amounts of porphyrins [30].

Characterized by causing localized diseases (on skin and mucous membranes), non-tuberculous mycobacteria (NTMs) are also responsible for disseminated diseases when in pathological processes in humans [31]. Skin and soft tissue infections are caused by almost all NTMs, however, *Mycobacterium marinum* and rapidly growing mycobacteria species (RGM) such as *M. fortuitum*, *Mycobacteroides abscessus*, and *Mycobacteroides chelonae* are among the most frequently implicated in this type of infection [32]. Diseases in the disseminated form involving blood, the central nervous system or other dispersed sites can occur particularly in more virulent species, such as *Mycobacterium avium* and *M. abscessus* [33,34].

Associated with post-surgical and post-traumatic infections, mycobacterioses are complex to treat due to the lengthy process of identification and determination of *in vitro* sensitivity to antimicrobials. In addition, these microorganisms are naturally resistant or have little sensitivity to tuberculostatic drugs. These factors and a low index of clinical suspicion often result in failure to treat NTM infections [30,32]. Since antimycobacterial therapy to combat mycobacteria is becoming increasingly complex and NTMs progressively more resistant, we report in this manuscript, for the first time, the antimycobacterial activity evaluation of a isomeric series of tetra-cationic Pt (II) porphyrins (4-PtTPyP and 3-PtTPyP) against RGM strains.

2. Materials and methods

2.1. Porphyrins

Two groups of porphyrins were used as PS. The neutral porphyrins, 3-TPyP and 4-TPyP (without Pt complexes), were obtained commercially by Frontier Scientific® (Logan, Utah, USA). The isomeric tetra-cationic porphyrins in the *meta* and *para* positions containing the peripheral complexes of platinum (II) (3-PtTPyP and 4-PtTPyP) were obtained according to the synthesis methodology described in the literature [21]. Porphyrins were initially solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO - Sigma-Aldrich®) to produce the stock solution. From this solution, the final solutions were obtained in Mueller Hinton broth (MH) with a concentration of 375 µg/mL, which were stored under refrigeration to carry out the tests.

2.2. Light illumination experiments

All the illumination experiments were performed under white-light LED illumination (400–800 nm) of 50 mW/cm² and total light dosage of 270 J/cm² (90 min). The 96-well plate subjected to illumination were closed according to biosafety standards and the required distance between the plate and white-light source was 8–10 cm. Two controls were included in each illumination experiment: a light control (LC) submitted to the same illumination conditions as the samples but without PS, and a dark control (DC) containing the PS at the same concentrations but kept in the dark.

2.3. Selected microorganisms

The evaluation of PS activity was performed against standard RGM strains [35]. *Mycobacteroides abscessus* subsp. *Abscessus* (ATCC 19977), *Mycolicibacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacteroides abscessus* subsp. *Massiliense* (ATCC 48898), and *Mycolicibacterium smegmatis* (ATCC 700084) were kept at –80 °C and grown on Löwenstein-Jensen agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India).

2.4. Minimum inhibitory concentration (MIC) determination

The minimum inhibitory concentration (MIC) of each porphyrin was evaluated by the broth microdilution method, following the guidelines of CLSI M24-A2 [36]. Different PS concentrations were obtained by means of serial dilutions in Mueller Hinton (MH) broth medium (Sigma-Aldrich® Pvt. Ltd, India). The inoculum density was standardized according to the 0.5 scale of Mac Farland, subsequently diluted to a concentration of 5×10^5 CFU/mL, and transferred to the 96-well microplates. The mycobacterial inactivation activity of each porphyrin was verified in the presence and absence of illumination. A group of plates was kept incubated in the dark at 30 °C for 72 h. The second group was kept under the same conditions, but with illumination for 90 min at 0, 24, and 48 h of incubation. The MIC was considered the lowest concentration capable of inhibiting visible microbial growth.

2.5. Time-kill curve experiments

The RGM strain behavior at different times of illumination with porphyrins was evaluated using the microbial time-kill curve. The Pt (II) derivatives 3-PtTPyP and 4-PtTPyP were used in this experiment, as they have better antimycobacterial activity. From the values determined in the susceptibility test, MIC, 2xMIC, and ½MIC aliquots were used for plating on Mueller Hinton agar after 0, 24, 48, 72, and 96 h of exposure to porphyrins [37]. A porphyrin-free inoculated medium was plated as growth control. The plates were incubated at 30 °C for 72 h. The inhibitory effects were calculated based on the CFU/mL [38].

2.6. Scavengers of reactive oxygen species assays

In an attempt to determine possible ROS produced by the studied porphyrins, ascorbic acid (AA; Sigma-Aldrich®), dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich®), *tert*-butanol (*t*-BuOH; Merck®), and *N*-acetylcysteine (NAC; Sigma-Aldrich®) ROS scavengers were used to detect oxygen reactive species in the following sequence: singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), and hydroperoxyl radical ($\cdot\text{OOH}$), respectively.

The dilution of the porphyrin solutions was maintained under the same conditions as the MIC determination. Subinhibitory concentrations of each scavenger (AA 4.0 mM; DMSO 3%; *t*-BuOH 0.8%; NAC 1.2 mM) and the standardized inoculum were added to the 96-well microplates. The plates were kept at 30 °C for 72 h with light illumination periods of 90 min for 0, 24, and 48 h, respectively. The increased MIC values were used to determine the type of ROS produced by the porphyrins in this study [29].

2.7. Atomic force microscopy (AFM) analysis

The effect and interaction of tetra-cationic platinum (II) porphyrins (3-PtTPyP) on the mycobacteria was investigated by AFM. Here, the *M. smegmatis* (ATCC 700084) was used as a non-pathogenic agent from the RGM group, although it presented a similar response to the strains/PS in preliminary studies [39]. After submission to different conditions of light exposure in the presence/absence of PS, ATCC 700084 samples were diluted in water and deposited on small square pieces of freshly cleaved mica. Atomic force microscopy characterization was done using a Park NX10 microscope (Park 200 Systems, Suwon – Korea) equipped with a SmartScan software version 1.0.RTM11a. Topography and adhesion maps were acquired simultaneously using the PinPoint Nanomechanical mode and a high frequency rotated monolithic silicon probe (TAP300-G Budget Sensors, Sofia – Bulgaria) with a nominal resonance frequency of 300 kHz and 40 N m⁻¹ force constant. Electric force mode was performed using the standard non-contact AFM setup with a gold-coated n-type silicon probe (NSC14 Cr/Au Mikromasch, Sofia – Bulgaria), nominal resonance frequency of 160 kHz, and 5.0 N m⁻¹ force constant. All measurements were carried out under ambient conditions at room temperature (21 ± 5 °C) and relative humidity (55 ± 10%). Images were treated offline using XEI software version 4.3.4 Build22.RTM1.

2.8. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate and the results expressed as the mean ± standard derivation. The dose-response curve (or time-kill curve) was performed using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software®, La Jolla, CA, USA) and statistical differences were considered when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC values)

The susceptibility of the RGM strains to the porphyrins, in the dark and under illumination conditions, is described in Table 1. In the dark conditions, all compounds showed the same MIC values at the concentration of 93.75 µg/mL. Under white-light illumination, neutral porphyrins (3-TPyP and 4-TPyP) maintained MIC values at 93.75 µg/mL or had their values reduced by half.

The results for porphyrins containing peripheral [Pt (bpy)Cl]⁺ units were the most significant, especially for porphyrins with nitrogen atoms in the *meta* position (3-PtTPyP), which showed activity at concentrations ranging from 1.46 to 0.36 µg/mL, while the *para* isomer (4-PtTPyP) had MIC values that varied from 23.43 to 5.85 µg/mL, respectively.

Table 1

MIC values (in µg/mL) of the porphyrins tested against the RGM strains under different dark and white-light illumination conditions, respectively.

Microorganism	Dark conditions			
	MIC values (µg/mL)			
	4-TPyP	3-TPyP	4-PtTPyP	3-PtTPyP
<i>M. fortuitum</i>	93.75	93.75	93.75	93.75
<i>M. abscessus</i>	93.75	93.75	93.75	93.75
<i>M. massiliense</i>	93.75	93.75	93.75	93.75
<i>M. smegmatis</i>	93.75	93.75	93.75	93.75
Microorganism	White light conditions			
	MIC values (µg/mL)			
	4-TPyP	3-TPyP	4-PtTPyP	3-PtTPyP
<i>M. fortuitum</i>	93.75	46.87	23.43	0.36
<i>M. abscessus</i>	93.75	46.87	11.71	0.73
<i>M. massiliense</i>	93.75	46.87	23.43	1.46
<i>M. smegmatis</i>	46.87	46.87	5.85	0.73

3.2. Time-kill assay

In the time-kill curve assays, the bactericidal action of the porphyrin derivatives containing the Pt (II) complexes (3-PtTPyP and 4-PtTPyP) totally inhibited the growth of the three RGM strains in the MIC and 2xMIC concentrations in the first 48 h of the experiment (Figs. 2 and 3) (see Fig. 1). In this case, the *M. abscessus* strain was inactivated in the first 24 h of incubation, at MIC and 2xMIC concentrations, and with only two illumination applications in the presence of 4-PtTPyP. This also occurred for the *M. fortuitum* strain when subjected to illumination with the 3-PtTPyP *meta* isomer. Furthermore, regarding the positive control (mycobacteria without porphyrin), especially the *meta* isomer, the concentration of microorganisms was lower than the positive control (mycobacteria without porphyrin) at the beginning of the illumination ($t = 0$), demonstrating the activity of the tetra-cationic porphyrins containing the Pt (II) polypyridyl complexes since the first application.

3.3. ROS scavenger tests

The ROS detection assay involved in porphyrin activity showed that the susceptibility of the mycobacterium strains used here was only reduced in the presence of the ascorbic acid substrate - singlet oxygen scavenger (Table 2). The MIC values found in the presence of the $^1\text{O}_2$ scavenger significantly increased peripheral platinum (II) porphyrins 3-PtTPyP and 4-PtTPyP. Moreover, the MIC values of the porphyrins tested did not change significantly in the presence of DMSO, *tert*-butanol, and NAC, which are scavengers of radical species.

3.4. Atomic force microscopy (AFM) analysis

The effects of treatment with porphyrin 3-PtTPyP on the morphology, adhesive force properties, and electrostatic adhesion of *M. smegmatis* was evaluated by AFM. The morphology of *M. smegmatis* bacteria after running different light exposure experiments in the presence/absence of porphyrins is detailed in Fig. 4a–d. Common topography of a typical mycobacteria is shown in Fig. 4a (dark condition), while Fig. 4b indicates that even after light exposition, the mycobacteria still displayed standard morphology. On the other hand, there are significant morphological changes in the presence of porphyrins in the absence of light (Fig. 4c), as the bacteria shrunk and decreased in diameter. Moreover, a notable change was observed when the mycobacteria was submitted to porphyrin treatment and exposed to white-light illumination (Fig. 4d). In fact, this condition also reduces the mycobacteria to a contracted form, despite producing many wrinkles in the membrane (Fig. 4d).

All qualitative observations in Fig. 4 are quantitatively summed up in Table 3, which details the adhesion force, length, and width values of

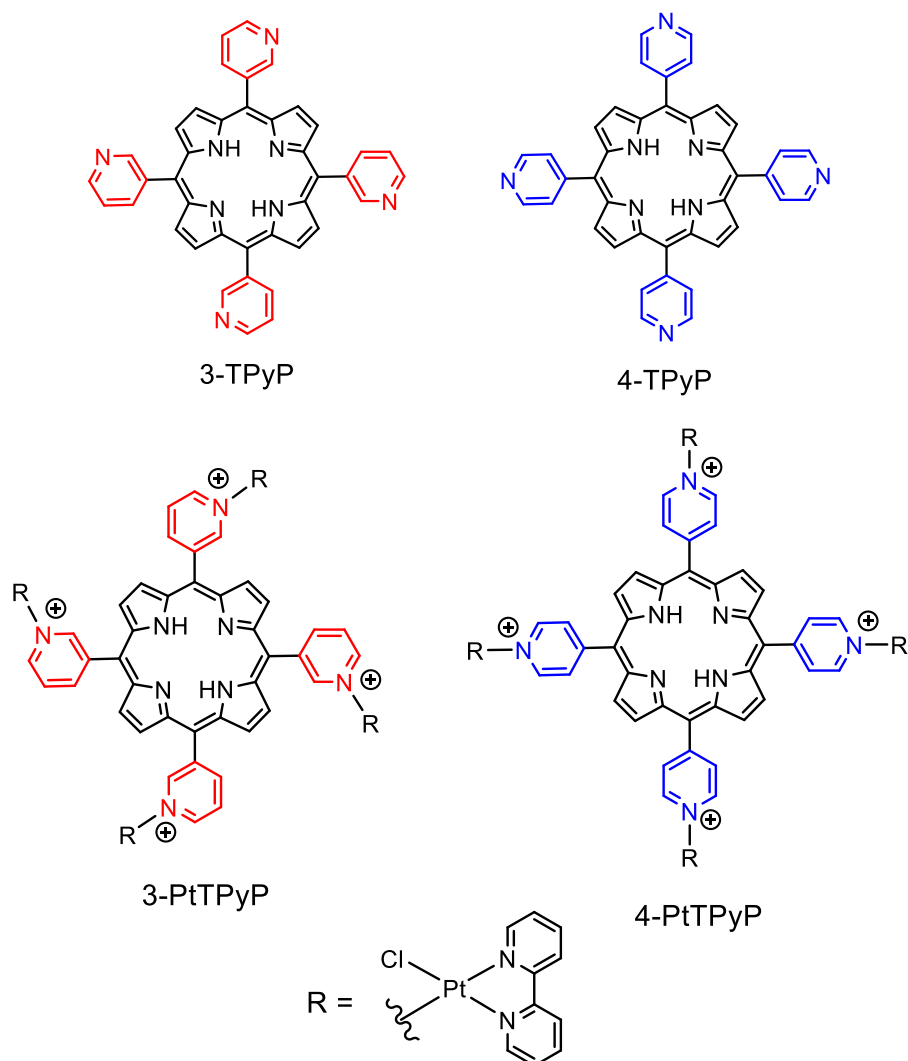


Fig. 1. Representative structure of porphyrins studied in this work.

mycobacteria. In fact, width values indicate that white-light radiation and porphyrin treatment make the bacteria thinner. In addition, treatment with **3-PtTPyP** (especially after light exposition) decreases adhesive forces on mycobacterial walls. In the dark condition, the adhesion force of the bacterial membrane is roughly 1.0 μN , although it decreases to 0.31 μN after light exposure. On the other hand, adhesion forces had a pronounced drop in porphyrin presence, decreasing to 0.21 μN in the dark condition and to very low values (0.05 μN) in the light condition. The overall picture that emerges from Fig. 4 and Table 3 is clear: treatment with **3-PtTPyP** stretches the bacteria while decreasing both their diameter and adhesive forces.

The topography and electric force maps for the mycobacteria in the same conditions analyzed in Fig. 4 and Table 3 are shown in Fig. 5. The topographic maps presented the same morphologies previously seen in Fig. 4. Nonetheless, the electric force maps in Fig. 5 (bottom) indicate that the mycobacterial membrane is more negative than the substrate. Moreover, a positively charged domain is on the interface of all conditions, evidencing the electrostatic component of adhesive forces between the bacteria and substrate. On the other hand, after **3-PtTPyP** treatment in dark or light condition, not only did the positively charged halo around the mycobacteria decrease, but also many positive regions were found on the bacterial walls. This evidences that **3-PtTPyP** reduces electrostatic adhesion and must contribute to decreasing bacterial growth on this and other surfaces.

4. Discussion

In this study, all studied porphyrins, regardless of the absence or presence of peripheral complexes attached to the *meta* or *para* pyridyl positions, when in a dark condition, maintained MIC values at 93.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Therefore, the association of PS with light and molecular oxygen to potentiate antimycobacterial activity and its importance is clearly noted.

In this context, porphyrins subjected to illumination with a white-light LED source for 90 min showed reduced MIC values. Both neutral porphyrins **3-TPyP** and **4-TPyP** maintained MIC values similar to the dark condition or had their MIC values reduced by half. The tetracationic porphyrins (**3-PtTPyP** and **4-PtTPyP**) showed lower MIC values than the neutral porphyrins, in addition to being more effective when the complexes were coordinated with the nitrogen atom in the *meta* position.

Furthermore, porphyrin-based PS with amphiphilic properties and carrying one or more positive charges is more effective in infections by Gram-positive and negative bacteria [40,41]. The presence of positive charges in the peripheral positions of the porphyrins increases the amphiphilic character of the molecule. This association of hydrophobic and hydrophilic characteristics in the PS molecule results in an axis of intramolecular polarity, which enhances its interaction with membrane structures and consequently its internalization and accumulation in the

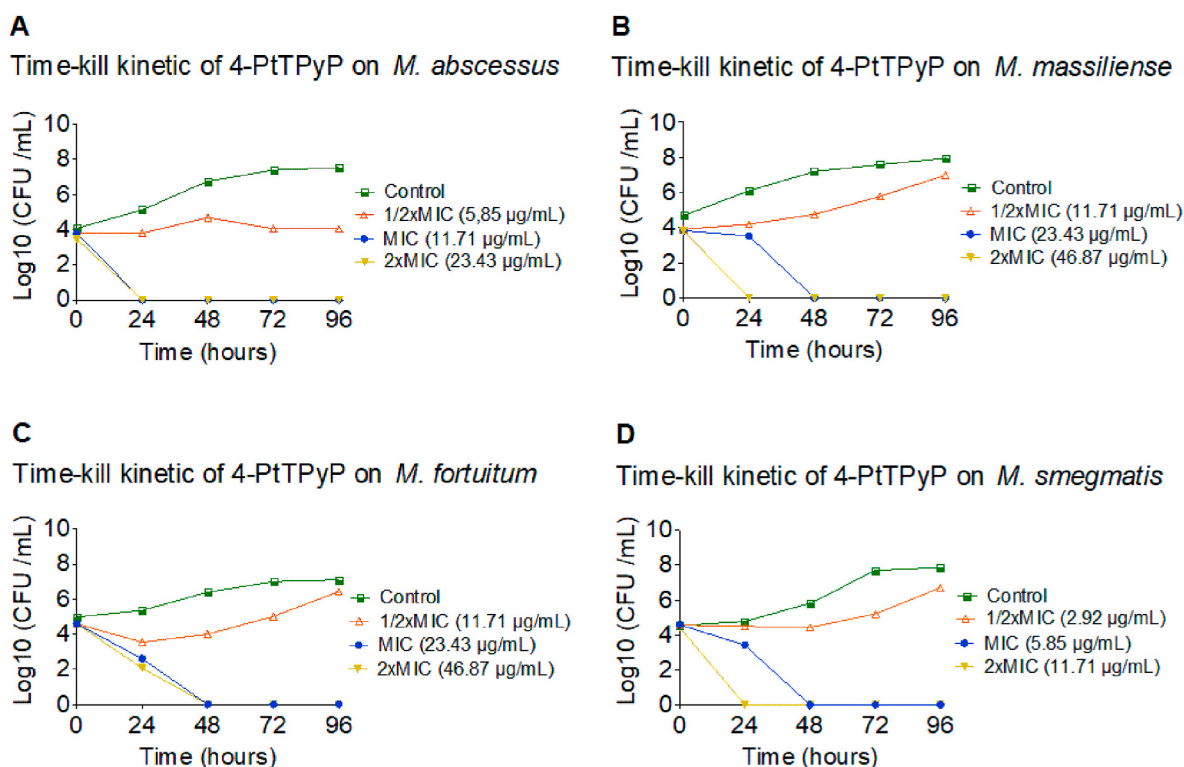


Fig. 2. Time-kill curve for (A) *M. abscessus*, (B) *M. massiliense*, (C) *M. fortuitum* and (D) *M. smegmatis* strains exposed to different concentrations of 4-PtTPyP with white-light illumination at a fluence rate of 50 mW/cm² at 90 min. A concentration of 2xMIC, MIC and ½ MIC were evaluated. CFU/mL values correspond to the log average of three independent experiments performed using descriptive statistic in GraphPad Prism® 5. Error bars represent standard deviation.

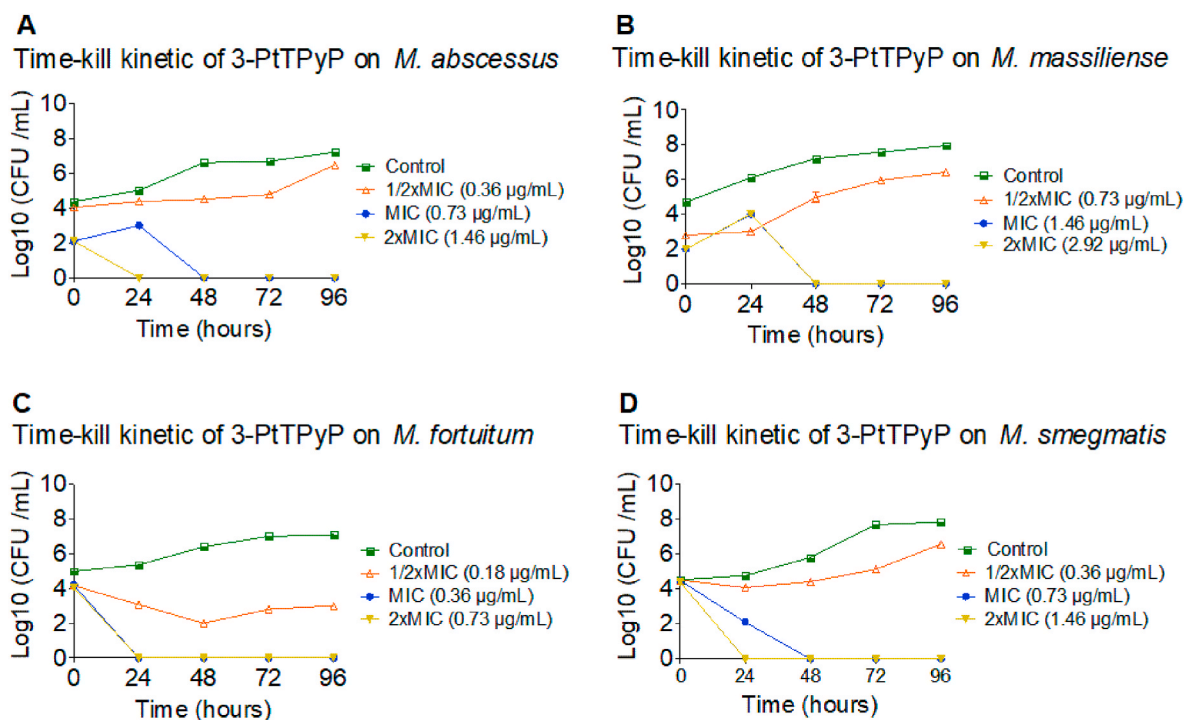


Fig. 3. Time-kill curve for (A) *M. abscessus*, (B) *M. massiliense*, (C) *M. fortuitum* and (D) *M. smegmatis* strains exposed to different concentrations of 3-PtTPyP with white-light illumination at a fluence rate of 50 mW/cm² at 90 min. A concentration of 2xMIC, MIC and ½ MIC were evaluated. CFU/mL values correspond to the log average of three independent experiments performed using descriptive statistic in GraphPad Prism® 5. Error bars represent standard deviation.

subcellular bacterial compartments [42]. In addition, the preference for cationic units in PS is due to their increased selectivity to microorganisms in the infected tissue. Gram-positive bacteria respond to both

neutral, anionic, and cationic sensitizers, however, Gram-negative microorganisms are only susceptible to cationic PS [26,43]. The preference for cationic porphyrins is also revealed in species of the genus

Table 2

MIC values for tetra-cationic porphyrins **3-PtTPyP** and **4-PtTPyP** in the presence of ascorbic acid (AA), dimethyl sulfoxide (DMSO), *tert*-butanol (*t*-BuOH) and *N*-acetylcysteine (NAC).

Microorganism	MIC values in presence of ROS scavengers							
	Tetra-cationic platinum (II) porphyrins							
	AA		DMSO		<i>t</i> -BuOH		NAC	
	4-Pt	3-Pt	4-Pt	3-Pt	4-Pt	3-Pt	4-Pt	3-Pt
<i>M. fortuitum</i>	93.75	93.75	23.43	0.36	23.43	0.36	23.43	0.36
<i>M. abscessus</i>	93.75	93.75	11.71	0.73	11.71	0.73	11.71	0.73
<i>M. massiliense</i>	93.75	93.75	23.43	1.46	23.43	1.46	23.43	1.46
<i>M. smegmatis</i>	46.87	23.43	5.85	0.73	5.85	0.73	5.85	0.73

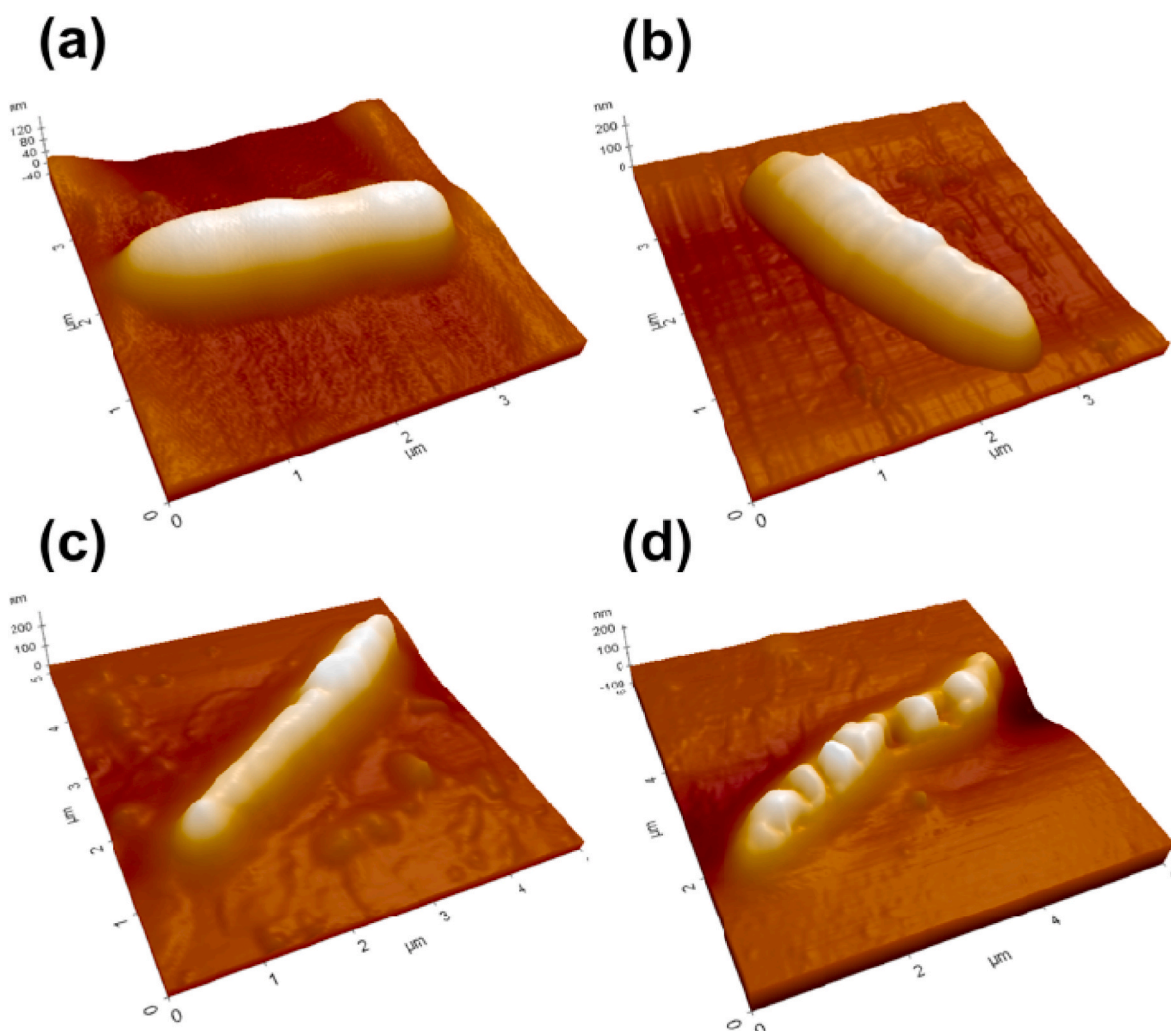


Fig. 4. Representative topographic images of *M. smegmatis* when submitted to four processing: (a) dark condition, (b) white-light condition, (c) **3-PtTPyP** treatment in dark condition and (d) **3-PtTPyP** treatment in white-light condition, respectively.

Mycobacterium. Guterres et al. used anionic and cationic porphyrins against NTMs strains and reported the superior efficacy of tetra-cationic porphyrins for this group of microorganisms [29].

Notably, in the cationic porphyrins of this study, the presence of the Pt (II) peripheral complexes, especially in the porphyrin *meta* positions, potentiated the photodynamic action of the porphyrins. This can be attributed to the higher solubility of these porphyrins compared to their *para* isomer compounds being, therefore, less prone to the formation of aggregates in solution. Thus, *meta*-substituted porphyrins are more susceptible and reactive in solution, which may favor their connection with organic substrates such as fatty acids and/or lipids [5,44–46].

The high photo-activity properties of Pt (II) derivatives **3-PtTPyP** and **4-PtTPyP** may be directly associated with the photophysical properties of these porphyrins, since these porphyrins present high values of triplet quantum yields (Φ_T) and high generation of singlet oxygen (Φ_Δ), as previously reported by Cocca, Tasso, and co-workers [39,47]. In addition, Lopes et al. reported that tetra-cationic porphyrins containing platinum (II) complexes inactivate the bacterial growth of multi-resistant Gram-positive and Gram-negative strains, extolling the effectiveness of these porphyrin derivatives [40].

In this context, Couto et al. demonstrated the antitumor efficacy of the porphyrins under study against metastatic melanoma cells. The

Table 3

The inserted table shows the variation of adhesion force, length and width of the *Mycobacterium smegmatis* before and after the 3-PtTPyP treatment in dark and white-light condition. Standard deviations are results from five measurements.

Condition	Adhesion Force (μN)	Length (μm)	Width (μm)
Dark condition	1.03 ± 0.11	3.68 ± 0.31	1.17 ± 0.07
Light condition	0.31 ± 0.05	3.35 ± 0.15	0.98 ± 0.002
3-PtTPyP + Dark condition	0.21 ± 0.05	4.63 ± 0.13	0.59 ± 0.07
3-PtTPyP + Light condition	0.05 ± 0.01	6.10 ± 0.5	0.57 ± 0.005

authors also confirmed the safety of these PS through cell viability tests, as they found no cytotoxicity in non-tumor cells [4]. Nevertheless, Lope et al. described that, at concentrations ranging from 2.0 to 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4-TPyP and 4-PtTPyP have mild cytotoxic effects when under red-light illumination.

In the scavenger assay to determine the possible ROS produced by porphyrins during the photoinactivation process, Pt (II) porphyrins showed reduced photo-oxidant activity in the presence of the ascorbic acid substrate ($^1\text{O}_2$ scavenger). In the tests for the detection of possible radical species of the superoxide, hydroxyl, and hydroperoxyl type, no significant MIC values were observed.

Singlet oxygen is a product of the type II photochemical reaction of ROS generation and has been the main agent responsible for the photodynamic action of the studied PS [48]. The fact that it is a highly oxidizing species gives it better therapeutic effects [29]. Thus, singlet oxygen stands out for acting on multiple cellular targets, ranging from external membrane structures, such as proteins and cholesterol, to intracellular biomolecules, such as DNA bases [7]. Because of this interaction, we have the extravasation of cellular content and inactivation of membrane transport systems and enzymes.

This stress caused to the microorganism was observed in the AFM assay. The images revealed significant changes in the shape and thickness of the bacillus after exposure to PS, in addition to visible tears on the mycobacterial cell wall. These changes clearly demonstrate the inactivation suffered by the microorganism when exposed to only one

application of illumination with the porphyrin under study. Moreover, the adhesion properties, both nanomechanical and electrostatic, had their values decreased after treatment with 3-PtTPyP, especially after exposure to white-light illumination.

The interaction of the outer bacterial membrane with the extracellular environment is crucial for subsequent processes of bacterial adhesion to abiotic or biotic surfaces. Adhesion processes encompass non-specific physical-chemical interactions between the bacteria and substrate, including hydrodynamic forces, electrostatic interactions, van der Waals forces, and hydrophobic interactions [49,50]. Elementary flux mode (EFM) analysis, which is a powerful AFM tool capable of mapping qualitative electrostatic patterns on the sample surface, was performed to access the electrostatic properties, in this case the *Mycobacterium* – substrate interface. Many microorganisms adhere to substrates driven by electrostatic charges. For example, the lipopolysaccharide presence in the *Escherichia coli* (Gram-negative) is responsible for building-up negative charges in aqueous environments, with zeta potentials near -33 mV. Regardless of the bacterial condition, the interface is a more positively charged region than both the substrate and bacteria itself (Fig. 5). Here, dark-colored regions in the EFM images are relatively more negative while brighter ones are more positive. The homogeneous negatively charged aspect of the bacteria not treated with PS (both light and dark conditions) with positive charges at the interface as a halo indicate an important electrostatic mechanism of adhesion. On the other hand, the bacterial walls lose charges after PS treatment, where only few spots are negatively charged. In fact, the EFM images reveal that not only was the electrostatic adhesion mechanism less effective, but it helped visualize the deformations on the bacterial walls [51,52].

An additional effect of bacterial adhesion is the creation of the biofilm layer on the surface of the material. The biofilm layer reinforces the phenomenon of adhesion and provides a protective environment for microbial cells [53]. Here, a very pronounced reduction in the membrane adhesion strength from 1.0 to 0.05 μN was observed in the microorganism after illumination in the presence of porphyrin. In addition, segregated charge domains in untreated mycobacterium are clearly disturbed and more or less dissipated in the presence of 3-PtTPyP (Fig. 5). In other words, this can be observed by the reduced electrostatic charges that involve the mycobacterium-substrate interface and disappearance of this electrostatic halo, as electrostatic adhesion

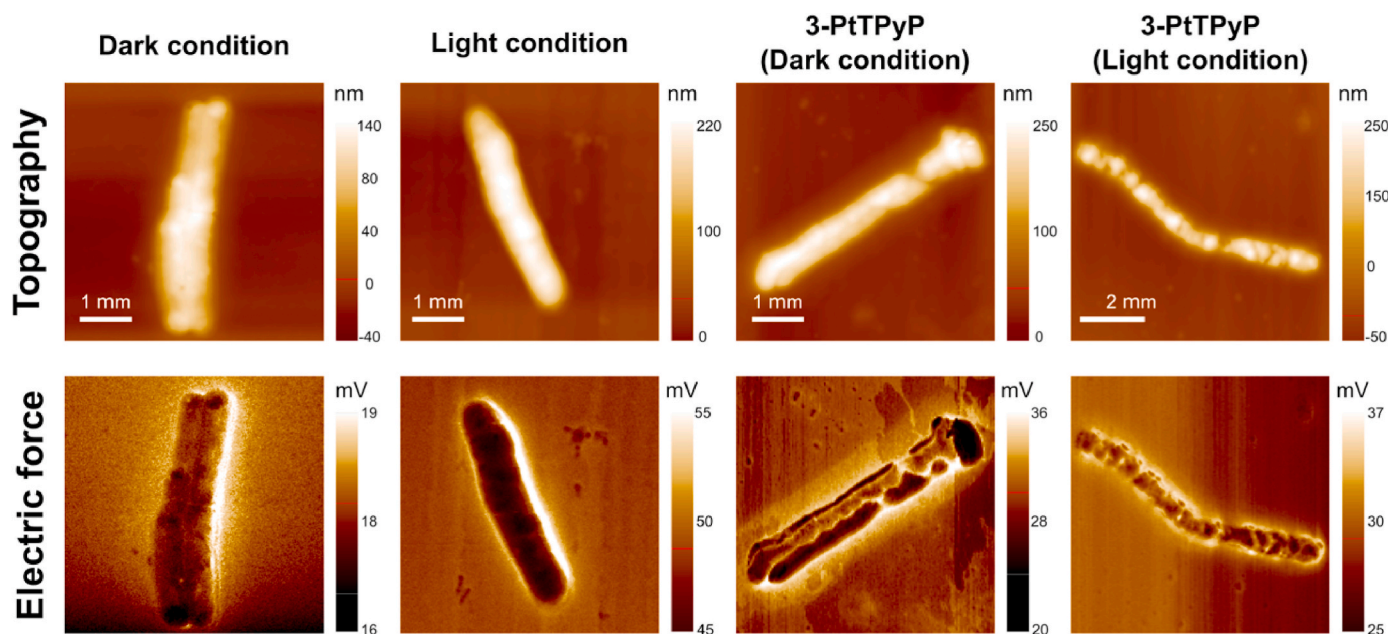


Fig. 5. Topographic (top) and electric force (bottom) maps of *M. smegmatis* when submitted to dark condition, light condition, porphyrin treatment in dark and light condition.

also decreased [54]. Therefore, changes in favorable conditions of bacterium-substrate interactions hinder the process of bacterial adhesion and consequently the development of resistance mechanisms, such as the formation of biofilm.

Analysis of mycobacterial behavior regarding the different illumination times with Pt (II) porphyrins showed that these PS eradicated the microorganisms in two lighting sessions in practically all of the tested strains. This bactericidal action in a few days of illumination is extremely important since mycobacteriosis has long treatments by oral medication and systemic action. In addition, there is no standard treatment regime for most NTM species, with treatment decisions based on case studies and expert opinions, published in guidelines according to the body. Moreover, some emerging pathogens, such as *M. abscessus* and *M. fortuitum*, are highly resistant to tuberculostatic drugs and require treatment with at least two microbial agents for an extended period of 4–6 months.

Mycobacteriosis is closely related to skin infections, clinically found in the form of papules, pustules, nodules, abscesses, panniculitis, folliculitis or plaques, and may even progress to the form of ulcers. Therefore, the use of an alternative topical approach to reduce treatment time and minimize the side effects produced by the systemic action of oral antimycobacterials may contribute to standardizing drug treatment against these microorganisms and greater treatment adherence. In this way, photodynamic therapy against microorganisms (aPDT) may minimize or even replace the use of antibiotics for the treatment of local mycobacterial infections.

In view of the increased number of resistant microorganisms and the scarcity of therapeutic alternatives, cationic porphyrins are a promising molecular architecture with potential applications in the inactivation of bacteria by photodynamic treatment, especially when it comes to mycobacteria. Thus, the photoinactivation of microorganisms (aPDT) is one of the most promising alternative forms of treating bacterial infections, especially those caused by MDR bacteria [55]. Therefore, the use of this type of photodynamic process may optimize the treatment of mycobacterioses as well as impact the mitigation of antimicrobial resistance.

5. Conclusions

This study demonstrates that tetra-cationic porphyrins with peripheral [Pt (bpy)Cl]⁺ complexes may be considered promising PS for the photo-inactivation of mycobacteria, although performance is highly variable between molecules with different transition metal coordination compounds. The ROS production (1O₂), higher photostability, lower aggregation in solution, and higher white-light dosage effects on the mycobacteria are most likely the factors underlying the satisfactory performance of tetra-cationic porphyrins against mycobacterioses. Photo-inactivation is a promising alternative for this scenario, especially in topical applications against mycobacterial diseases, since it acts directly on the microorganisms. This targeting, which is mediated by ROS, reduces treatment times and acts in low doses on the membrane, leading more easily to lysis and later cell death. The results of this study confirm the potential of tetra-cationic porphyrin derivatives with coordination chemistry for antimicrobial PDI in broad-field applications such as clinical medicine and bioremediation related to human health.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Authors contribution

M.M.A. Campos and B.A. Iglesias idealized the work. G.G. Rossi and K.B. Guterres conducted the microbiological assays. K.S. Moreira and T. A.L. Burgo conducted the AFM experiments. T.P. G.G. Rossi, B.A.

Iglesias, M.M.A. Campos and T.A.L. Burgo wrote and correct the manuscript.

CRediT authorship contribution statement

Grazielle Guidolin Rossi: We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. **Kevim Bordignon Guterres:** We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. **Carolina Hahn da Silveira:** We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. **Kelly Schneider Moreira:** We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. **Thiago Augusto Lima Burgo:** We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. **Bernardo Almeida Iglesias:** We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. **Marli Matiko Anraku de Campos:** We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

Declaration of competing interest

The authors declare that they do not have conflict of interest.

Acknowledgments

This study was financed by CNPq, CAPES and FAPERGS. Bernardo A. Iglesias thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil; Universal Grants 409150/2018–5) and Marli Matiko Anraku de Campos thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil; Grants 404541/2016–0). Thiago A. L. Burgo thanks to MCTIC/CNPq (465452/2014–0), FAPESP (2014/50906–9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 through INCT/INOMAT (National Institute for Complex Functional Materials) and MCT/Finep/CT-Infra February 2010.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104455>.

References

- [1] C. Alonso, R.W. Boyle, Bioconjugates of porphyrins and related molecules for photodynamic therapy, in: K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guillard (Eds.), *Handbook of Porphyrin Science*, World Scientific Publishing Co., Singapore, 2010, pp. 121–290.
- [2] M. Lupu, C.D. Thomas, F. Poyer, J. Mispelner, V. Rosilio, P. Maillard, *Photobiology and photochemistry hand-in-hand in targeted antitumoral therapies*, in: K.

- M. Kadish, K.M. Smith, R. Guilard (Eds.), Handbook of Porphyrin Science, World Scientific Publishing Co., Singapore, 2016, pp. 171–356.
- [3] B.M. Amos-Tautua, S.P. Songca, O.S. Oluwafemi, Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy, *Molecules* 24 (2019) 2456–2484.
- [4] G.K. Couto, B.S. Pacheco, V.M. Borba, J.V.R. Junior, T.L. Oliveira, N.V. Segatto, F. K. Seixas, T.V. Acunha, B.A. Iglesias, T. Collares, Tetra-cationic platinum(II) porphyrins like a candidate photosensitizers to bind, selective and drug delivery for metastatic melanoma, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 202 (2020) 111725–111737.
- [5] C. Pavani, A.F. Uchoa, C.S. Oliveira, Y. Iamamoto, M.S. Baptista, Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 233–240.
- [6] O.A. Chaves, T.V. Acunha, B.A. Iglesias, C.S.H. Jesus, C. Serpa, Effect of peripheral platinum(II) bipyridyl complexes on the interaction of tetra-cationic porphyrins with human serum albumin, *J. Mol. Liq.* 301 (2020) 112466–112476.
- [7] V.A. Oliveira, B.A. Iglesias, B.L. Auras, A. Neves, H. Terenzi, Photoactive meso-tetra(4-pyridyl)porphyrinetrakis-[chloro(2,2'-bipyridine)platinum(II) derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation, *Dalton Trans.* 46 (2017) 1660–1669.
- [8] A.P. Silva, C. Kurachi, V.S. Bagnato, N.M. Inada, Fast elimination of onychomycosis by hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10 (2013) 328–330.
- [9] P. Thatai, B. Sapra, Photodynamic therapy for the Management of Onychomycosis: a promising strategy, *Ann. Pharmacol. Pharm.* 2 (2017) 1014.
- [10] J.Y. Jung, P.S. Kwon, J.C. Ahn, R. Ge, M.W. Suh, C.K. Rhee, In vitro and in vivo photodynamic therapy of otitis media in gerbils, *Laryngoscope* 119 (2009) 1781–1787.
- [11] S.A. Lambrechts, T.N. Demidova, M.C. Aalders, T. Hasan, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4 (2005) 503–509.
- [12] S. Mitra, C.G. Haidaris, S.B. Snell, B.R. Giesselman, S.M. Hupcher, T.H. Foster, Effective photosensitization and selectivity in vivo of *Candida albicans* by meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate, *Laser Surg. Med.* 43 (2011) 324–332.
- [13] Y. Yuan, Z.Q. Liu, H. Jin, S. Sun, T.-J. Liu, X. Wang, H.-J. Fan, S.-K. Hou, H. Ding, Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: in vitro and in vivo studies, *PLoS One* 12 (2017), e0176529.
- [14] E. Alves, L. Costa, C.M. Carvalho, J.P. Tomé, M.A. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, A. C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, A. Cunha, A. Almeida, Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins, *BMC Microbiol.* 9 (2009) 70.
- [15] A. Hanakova, K. Bogdanova, K. Tomankova, K. Pizova, J. Malohlava, S. Binder, R. Bajgar, K. Langova, M. Kolar, J. Mosinger, H. Kolarova, The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin, *Microbiol. Res.* 169 (2014) 163–170.
- [16] H. Takahashi, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka, Antifungal effect of TONS504-photodynamic therapy on *Malassezia furfur*, *J. Dermatol.* 41 (2014) 895–897.
- [17] E.G. Mima, A.C. Pavarina, L.N. Dovigo, C.E. Vergani, C.A. Costa, C. Kurachi, V. S. Bagnato, Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 109 (2010) 392–401.
- [18] O.A. Chaves, L.B. Menezes, B.A. Iglesias, Multiple spectroscopic and theoretical investigation of meso-tetra-(4-pyridyl)porphyrin-ruthenium(II) complexes in HSA-binding studies. Effect of Zn(II) in protein binding, *J. Mol. Liq.* 294 (2019) 111581.
- [19] B.P.P. McCormick, M.F. Pansa, L.N.M. Sanabria, C.M.B. Carvalho, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, N.B.R. Vittar, V.A. Rivarola, Cationic porphyrin derivatives for application in photodynamic therapy of cancer, *Laser Phys.* 24 (2014), 045603.
- [20] H.E. Toma, K. Araki, Supramolecular assemblies of ruthenium complexes and porphyrins, *Coord. Chem. Rev.* 196 (2000) 307–329.
- [21] J.A. Naue, S.H. Toma, J.A. Bonacin, K. Araki, H.E. Toma, Probing the binding of tetraplatinum(pyridyl)porphyrin complexes to DNA by means of surface plasmon resonance, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 182–189.
- [22] A. Naik, R. Rubbiani, G. Gasser, B. Spingler, Visible-light-Induced annihilation of tumor cells with platinum-porphyrin conjugates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53 (2014) 6938–6941.
- [23] B.A. Iglesias, J.F.B. Barata, P.M.R. Pereira, H. Girão, R. Fernandes, J.P.C. Tomé, M. G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, New platinum(II)-bipyridyl corrole complexes: synthesis, characterization and binding studies with DNA and HSA, *J. Inorg. Biochem.* 153 (2015) 32–41.
- [24] Y. Guoa, T. Gub, P. Lia, B. Fua, L. Suna, W. Zhub, H. Xua, X. Liang, A₂B corrole with a meso-[Pt^{II}(bipy)Cl₂]-substituent: synthesis, electronic structure and highly efficient electrocatalyzed hydrogen evolutions, *Inorg. Chim. Acta.* 496 (2019) 119067.
- [25] P.J. Gonçalves, F.C. Bezzerra, A.V. Teles, L.B. Menezes, K.M. Alves, L. Alonso, A. Alonso, M.A. Andrade, I.E. Borisevitch, G.R.L. Souza, B.A. Iglesias, Photoinactivation of *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) by tetracationic porphyrins containing peripheral [Ru(bpy)₂Cl]⁺ units, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 391 (2020) 112375.
- [26] Q. Jia, Q. Song, P. Li, W. Huang, Rejuvenated photodynamic therapy for bacterial infections, *Adv. Healthc. Mater.* 8 (2019), e1900608.
- [27] K. O'Riordan, D.S. Sharlin, J. Gross, S. Chang, D. Errabelli, O.E. Akilov, S. Kosaka, G.J. Nau, T. Hasan, Photoinactivation of *Mycobacteria* in vitro and in a new murine model of localized *Mycobacterium bovis* BCG-induced granulomatous infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 1828–1834.
- [28] N. Sung, S. Back, J. Jung, K.H. Kim, J.K. Kim, J.H. Lee, Y. Ra, H.C. Yang, C. Lim, S. Cho, K. Kim, S. Jheon, Inactivation of multidrug resistant (MDR)- and extensively drug resistant (XDR)-*Mycobacterium tuberculosis* by photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10 (2013) 694–702.
- [29] K.B. Guterres, G.G. Rossi, L.B. Menezes, M.M.A. de Campos, B.A. Iglesias, Preliminary evaluation of the positively and negatively charge effects of tetra-substituted porphyrins on photoinactivation of rapidly growing mycobacteria, *Tuberculosis* 117 (2019) 45–51.
- [30] M.O. Shleeva, A.P. Savitsky, V.D. Nikitushkin, I.D. Solovyev, N.I. Kazachkina, V. V. Perevarov, A.S. Kaprelyants, Photoinactivation of dormant *Mycobacterium smegmatis* due to its endogenous porphyrins, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 9687–9695.
- [31] G.G. Rossi, K.B. Guterres, P.C. Bonez, S. da Silva Gundel, V.A. Aggertt, F. S. Siqueira, A.F. Ourique, R. Wagnier, B. Klein, R.C.V. Santos, M.M.A. Campos, Antibiofilm activity of nanoemulsions of Cymbopogon flexuosus against rapidly growing mycobacteria, *Microb. Pathog.* 113 (2017) 335–341.
- [32] I. Porvaznik, I. Solovic, J. Mokry, Non-tuberculous mycobacteria: classification, diagnostics, and therapy, *Adv. Exp. Med. Biol.* 944 (2017) 1–7.
- [33] E.A. Misch, C. Saddler, J.M. Davis, Skin and soft tissue infections due to nontuberculous mycobacteria, *Curr. Infect. Dis. Rep.* 20 (2018) 6.
- [34] R.C. Philips, P.E. Hoyer, S.M. White, K.T. Tinkey, M. Loeffelholz, C.R. Andersen, M. G. Wilkerson, B.R. Gibson, B.C. Kelly, Cutaneous nontuberculous mycobacteria infections: a retrospective case series of 78 patients from the Texas Gulf Coast region, *J. Am. Acad. Dermatol.* 81 (2019) 730–739.
- [35] R.S. Gupta, B. Lo, J. Son, Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 67.
- [36] G.L. Woods, B. Brown-Elliott, P.S. Conville, E.P. Desmond, G.S. Hall, G. Lin, G. E. Pfyffer, J.C. Ridderhof, S.H. Siddiqi, R.J. Wallace, N.G. Warren, F.G. Witebsky, Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard, second ed., vol. 3, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- [37] C. Kim, N. Kim, K. Song, P.G. Choe, E.S. Kim, S.W. Park, H. Kim, N. Kim, E. Kim, W. B. Park, M. Oh, Differentiating rapid- and slow-growing mycobacteria by difference in time to growth detection in liquid media, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75 (2013) 73–76.
- [38] T.T. Aung, J.K.H. Yam, S. Lin, S.M. Salleh, M. Givskov, S. Liu, N.C. Lwin, L. Yang, R.W. Beuerman, Biofilms of pathogenic nontuberculous mycobacteria targeted by new therapeutic approaches, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 24–35.
- [39] S.A. Rahman, Y. Singh, S. Kohli, J. Ahmad, N.Z. Ehtesham, A.K. Tyagi, S. E. Hasnain, Comparative analyses of nonpathogenic, opportunistic, and totally pathogenic mycobacteria reveal genomic and biochemical variabilities and highlight the survival attributes of *Mycobacterium tuberculosis*, *mBio* 5 (2014) e02020-14.
- [40] M.B. Spesia, D. Lazzeri, L. Pascual, M. Rovera, E.N. Durantini, Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44 (2005) 289–295.
- [41] C. Vieira, A. Santos, M.Q. Mesquita, A.T.P.C. Gomes, M.G.P.M.S. Neves, M.A. F. Faustino, A. Almeida, Advances in aPDT based on the combination of a porphyrinic formulation with potassium iodide: effectiveness on bacteria and fungi planktonic/biofilm forms and viruses, *J. Porphyr. Phthalocyanines* 23 (2019) 534–545.
- [42] D. Lazzeri, E.N. Durantini, Synthesis of meso-substituted cationic porphyrins as potential photodynamic agents, *ARKIVOC* (2003) 227–239.
- [43] N. Malatesti, I. Munitic, I. Jurak, Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitizers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents, *Biophys. Rev.* 9 (2017) 149–168.
- [44] T.T. Tasso, T.M. Tsubone, M.S. Baptista, L.M. Mattiazzi, T.V. Acunha, B.A. Iglesias, Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy, *Dalton Trans.* 46 (2017) 11037–11045.
- [45] L.Q.S. Lopes, A.P. Ramos, P.M. Copetti, T.V. Acunha, B.A. Iglesias, R.C.V. Santos, A.K. Machado, M.R. Sagrillo, Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra(4-pyridyl)platinum(II) porphyrin, *Microb. Pathog.* 128 (2019) 47–54.
- [46] G. Basso, J.F. Cargnelutti, A.L. Oliveira, T.V. Acunha, R. Weiblen, E.F. Flores, B. A. Iglesias, Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-platinated porphyrins, *J. Porphyr. Phthalocyanines* 23 (2019) 1041–1046.
- [47] L.H.Z. Cocca, F. Gotardo, L.F. Sciuti, T.V. Acunha, B.A. Iglesias, L. de Boni, Investigation of excited singlet state absorption and intersystem crossing mechanism of isomeric meso-tetra(pyridyl)porphyrins containing peripheral polypyridyl platinum(II) complexes, *Chem. Phys. Lett.* 708 (2018) 1–10.
- [48] Y. Xiong, X. Tian, H.W. Ai, Molecular tools to generate reactive oxygen species in biological systems, *Bioconjugate Chem.* 30 (2019), 1297–1203.
- [49] D.S. Trentin, R.B. Giordani, A.J. Macedo, Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate, *Revista Liberato* 14 (2013) 113–238.
- [50] A. Harimawan, A. Rajasekar, Y. Ting, Bacteria attachment to surfaces – AFM force spectroscopy and physicochemical analyses, *J. Colloid Interface Sci.* 364 (2011) 213–218.
- [51] D. Campocchia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials* 34 (2013) 8533–8554.
- [52] A.M. Bieser, J.C. Tiller, Mechanistic considerations on contact-active antimicrobial surfaces with controlled functional group densities, *Macromol. Biosci.* 11 (2011) 526–534.

- [53] S. Achinas, N. Charalampogiannis, G.J.W. Euverink, A brief recap of microbial adhesion and biofilms, *Appl. Sci.* 9 (2019) 2801.
- [54] H.D.M. Follmann, A.F. Martins, A.P. Gerola, T.A.L. Burgo, C.V. Nakamura, A. F. Rubira, E.C. Muniz, Antiadhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of TMC/heparin complexes, *Biomacromolecules* 13 (2012) 3711–3722.
- [55] G.B. Kharkwal, S.K. Sharma, Y.Y. Huang, T. Dai, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy for infections: clinical applications, *Lasers Surg. Med* 43 (2011) 755–767.

3.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Photo-damage promoted by tetra-cationic palladium(II) porphyrins in rapidly growing mycobacteria

Grazielle Guidolin Rossi, Kevim Bordignon Guterres, Kelly Schneider Moreira, Thiago Augusto Lima Burgo, Marli Matiko Anraku de Campos and Bernardo Almeida Iglesias.

Artigo publicado no periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (Fator de impacto: 3.577, Qualis A2) (Photodiagnosis Photodyn Ther, v.36, p. 102514, 2021) doi:

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102514>

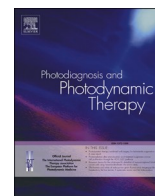


Photo-damage promoted by tetra-cationic palladium(II) porphyrins in rapidly growing mycobacteria

Grazille Guidolin Rossi^a, Kevim Bordignon Guterres^a, Kelly Schneider Moreira^c, Thiago Augusto Lima Burgo^c, Marli Matiko Anraku de Campos^a, Bernardo Almeida Iglesias^{b,*}

^a Laboratory of Mycobacteriology, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Bioinorganic and Porphyrinic Materials Laboratory, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Coulomb Electrostatic and Mechanochemistry Laboratory, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

ARTICLE INFO

Keywords:

Porphyrins
Pd(II) porphyrins
Antimicrobial photodynamic therapy
RGM

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has gained prominence in microbiology, especially in treating non-invasive infections. Diseases such as mycobacteriosis, which causes localized infections and has a slow treatment, tend to be future targets for this type of technology. Therefore, this study aimed to explore the action of two isomeric Pd(II)-porphyrins on fast-growing mycobacterial strains (RGM). Tetra-cationic porphyrins (**4-PdTPyP** and **3-PdTPyP**) were synthesized and applied against standard strains of *Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 700084), and *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense* (ATCC 48898). Reactive oxygen species (ROS) scavengers were used in an attempt to determine possible ROS produced by the photosensitizers (PS) under study. Moreover, the impact of porphyrin on the mycobacterial surface was further evaluated by atomic force microscopy (AFM), and we observed significant damage on cells walls and altered nanomechanical and electrostatic adhesion properties. The results presented herein show that the positively charged porphyrin at the meta position (**3-PdTPyP**) was the most efficient PS against the RGM strains, and its bactericidal activity was proven in two irradiation sessions, with singlet oxygen species being the main ROS involved in this process. This study demonstrated the therapeutic potential of porphyrins, especially the **3-PdTPyP** derivative

1. Introduction

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has made great progress in microbiology thanks to its potential advantages compared to conventional treatments [1]. Its non-invasive nature, combined with its highly selective action on lesion mediated by irradiation and high temporal and spatial resolutions, make it an adjuvant suitable to treat multi-resistant microorganisms [1–3].

This therapeutic approach uses photoactive molecules, which are also called photosensitizers (PS), with a tendency to associate with pathogens. Combined with controlled light distribution at a specific wavelength and molecular oxygen, PS are responsible for bacterial death by generating reactive oxygen species (ROS). The different ROS produced vary according to the photochemical process that precedes them. For example, in the type I process, radical species including superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl ($\bullet OH$), and hydroperoxyl ($\bullet OOH$), as well as species of hydrogen peroxide (H_2O_2) and/or superoxide anions (O_2^-), are

generated. Nevertheless, singlet oxygen species (1O_2) production, a species with a short lifetime and highly cytotoxic, plays a major role in the predominant type II processes [4–6].

The nature of PS and its ability to generate ROS are determining factors for the efficiency of this therapy [7,8]. In fact, porphyrins are considered molecules of great potential for application in aPDT due to their significant effects as PS, photophysical properties, and low cytotoxic effects in human cells [8–11]. Moreover, together with their derivatives, porphyrins are described in *in vitro* and *in vivo* studies as potential antimicrobial agents against Gram-positive and Gram-negative bacteria and even species of the family *Mycobacteriaceae* [10,12–17].

Tasli and co-workers [18] showed the efficacy of cationic porphyrin derivatives against standard strains and multi-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Likewise, Caruso and co-workers [19] reported the activity of 5, 15-diarylporphyrin derivatives against Gram-positive and Gram-negative bacterial cultures. In fact, a similar result was described

* Corresponding author.

E-mail address: bernardo.iglesias@ufsm.br (B.A. Iglesias).

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102514>

Received 19 July 2021; Received in revised form 20 August 2021; Accepted 27 August 2021

Available online 1 September 2021

1572-1000/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

by Jia and co-workers [20] in which S-Porphine sodium salt (S-PS) could eradicate bacterial cells in planktonic and sessile cultures. Additionally, *in vitro* studies involving rapidly growing mycobacteria (RGM) strains demonstrated the aggression caused by these molecules to the mycobacterial cell structure [12,21]. In these studies, incorporating coordination compounds into the peripheral positions on the tetrapyrrole macrocyclic may be potentiated by the photodynamic action of the molecule (forming cationic derivatives) and may eradicate the growth of most strains with just one application of irradiation [12,22–24]. An *in vivo* model of localized mycobacterial infection was performed using a benzoporphyrin derivative (verteporfin) as a PS to treat infections in mice. Thus, the photosensitive agent eliminated significant quantities of the extracellular and intracellular *Mycobacterium bovis* BCG strain after irradiation compared to the positive control [25].

Among the numerous mycobacterial species, RGM are commonly isolated in clinical laboratories, causing mycobacteriosis. This group of opportunistic pathogens is responsible for infections in the skin, soft tissue, respiratory, endocardium, meninges, and bones, and the disseminated form of the disease may also occur [26,27]. Cutaneous mycobacteriosis tends to have a late diagnosis due to the broad spectrum of clinical presentations of the disease and the lack of suspicion of infections by these pathogens. *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacteroides chelonae*, and *Mycobacteroides abscessus* are the main RGM reported in cases of post-surgical or post-traumatic infections, although new species such as *Mycobacterium goodii* and *Mycobacteroides massiliense* have been recently reported [28–31].

Associated with this late detection and identification process of RCM species, other factors, including natural resistance to tuberculosis drugs and the need for a long treatment period, resulting in ineffective treatment of infections caused by these pathogens [32–34]. Consequently, the development of alternative therapies with high antibacterial activity and new mechanisms of action are necessary to help fight these resistant microorganisms. Thus, this study aimed to evaluate the antimicrobial photodynamic activity of tetra-cationic porphyrins containing Pd(II)-bipyridyl complexes against RGM strains through ROS formation. Furthermore, atomic force microscopy (AFM) studies were fundamental to shedding more light on membrane damage.

2. Materials and methods

2.1. Pd(II)-porphyrins

The meso-tetra-cationic Pd(II) porphyrins used herein were obtained according to the procedure previously described by Santos and co-workers [35], and their structures are shown in Fig. 1. The porphyrins were initially solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich®) to produce the stock solution. The final solutions were obtained from this solution in Mueller Hinton Broth at a 375 µg/mL concentration, which were stored under refrigeration to carry out the tests. The tested concentrations ranged from 93.75 to 0.04 µg/mL (39 to 0.017 µM).

2.2. Illumination source

For the PS photodynamic studies, 96-well plates were submitted to irradiation with white light LED (400–800 nm) of 50 mW/cm² and a total light dosage of 270 J/cm² (90 min) [12]. The plates remained closed according to biosafety standards, and the required distance between the plate and white light source was 8–10 cm. A light control (LC) was performed in each lighting experiment under the same lighting conditions as the samples, but without PS; a dark control (DC) containing the PS at the same concentrations was also carried out but kept in the dark.

2.3. Mycobacterial strains

Four standard strains were used: *Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense* (ATCC 48898), and *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 700084). Standard strains of RGM were kept frozen at –80°C and cultured on Löwenstein-Jensen agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India).

2.4. Minimum inhibitory concentration

Sensitivity tests were performed by the broth microdilution method according to the CLSI M24-A2 standard protocol [36], standardized according to the 0.5 McFarland scale. To prepare the definitive inoculum (5.0×10^5 CFU/mL), 50 µL of bacterial suspension was transferred to a tube containing Mueller Hinton Broth (9.95 mL). By microdilution

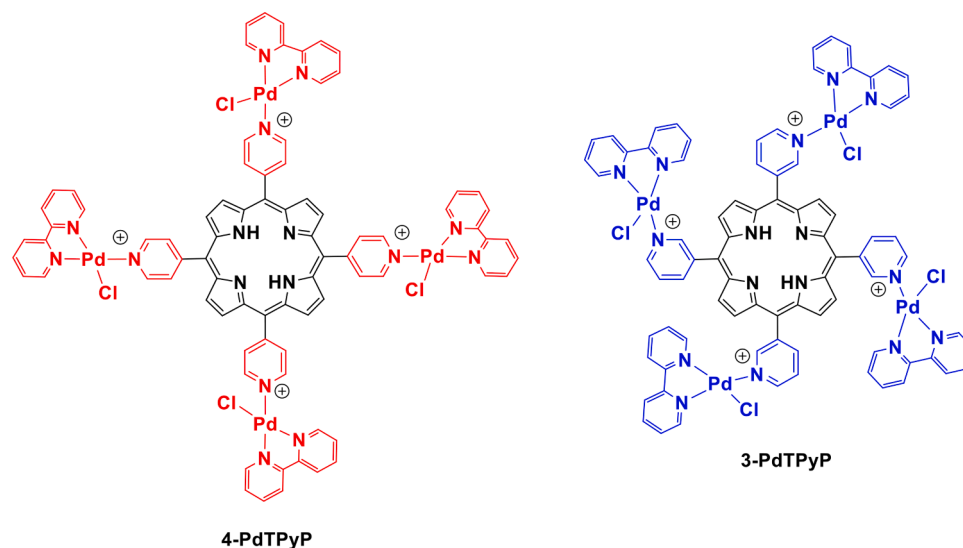


Fig. 1. Structural representation of meso-tetra(pyridyl)porphyrins with [Pd(bpy)Cl]⁺ complexes coordinated at the para (4-PdTPyP) or meta (3-PdTPyP) N-pyridyl position. Counter-ion hexafluorophosphate (PF₆[−]) is omitted for clarity.

in 96-well plates, 100 μL of the antimicrobial dilution and inoculum in equal volume were added. The plates were incubated for 72 h at 30°C, and the TTC dye (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, 1.0%) was used to determine whether there was microorganism colony growth. The minimum inhibitory concentration (MIC) was considered the lowest concentration capable of inhibiting visible microbial growth.

2.5. Time-kill curves

The action of compound **3-PdTPyP** (best result) in the different growth times of microorganisms was evaluated using the microbial death curve. The meta-substituted PS was selected for the assay because of its high antimycobacterial activity compared to the porphyrin with peripheral complexes in the para position. From the MIC determination, aliquots of MIC, 2xMIC, and 1/2MIC were used for plating on Mueller Hinton Agar (Sigma-Aldrich®) on days 0, 1, 2, 3, and 4 of incubation with PS. The plates were kept at 30°C for 72 h. Subsequently, the count of viable microorganisms was performed [37].

2.6. ROS detection

The scavenger assay identified the investigative ROS mechanism resulting from the 3-PdTPyP irradiation process under study. Ascorbic acid (AA; Sigma-Aldrich®), dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich®), tert-butanol (t-BuOH; Merck®), and N-acetylcysteine (NAC; Sigma-Aldrich®) were used for species detection as: as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$), and hydroperoxyl radical ($\bullet\text{OOH}$), respectively. The PS dilution followed the MIC determination assay conditions and, in the 96-well microplates, the subinhibitory concentrations of each sequestrant and the standardized inoculum were added. The plates were kept at 30°C for 72 h with 90-min irradiation at times 0, 24, and 48 h. The higher MIC concentration was used to determine the type of ROS produced by the porphyrin [38].

2.7. Atomic force microscopy analysis

The effects of **3-PdTPyP** on mycobacteria were further evaluated using AFM analysis. The topography and nanomechanical and electrical images were obtained after 24 h of incubating *M. smegmatis* (ATCC 700084) under different light exposure conditions in the presence/absence of PS, followed by dilution in water and deposition of the suspension on a freshly cleaved mica surface. The AFM measurements were done using an NX10 microscope (Park Systems, Suwon, Korea) equipped with SmartScan Park software (version 1.0.RTM13c2020-1). Topography and adhesion maps were acquired simultaneously in real-time from high-speed force-distance (Fd) curves using PintPoint™ Nanomechanical mode. A high frequency rotated monolithic silicon probe (TAP300-G Budget Sensors, Sofia, Bulgaria) with a nominal resonance frequency of 300 kHz and 40 N m⁻¹ force was used in the Fd spectroscopy to measure adhesion by using the cantilever tip to push the sample. Electrical force microscopy (EFM) was used to obtain information on the charge distribution of the sample surface, and EFM images were obtained using a chromium/gold-coated n-type silicon tip (NSC14 Cr/Au Mikromasch, Sofia, Bulgaria) with a nominal resonance frequency of 160 kHz and 5.0 N m⁻¹ force constant. Measurements were performed under ambient conditions (21 ± 5°C and 55 ± 10% relative humidity). The images were then treated offline using XEI Park software (version 4.3.4 Build22.RTM1).

2.8. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate, and the results were expressed as the mean ± standard derivation. The dose-response curve was performed using GraphPad Prism (version 5.01; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), and statistical differences were considered when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Minimum inhibitory concentration determination

The MIC values presented by the meso-tetra-cationic Pd(II) porphyrins against the RGM are listed in Table 1. The PS under study presented the same MIC value under dark conditions, with activity at a concentration of 93.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (39 μM). However, the palladium(II) porphyrins had higher antimycobacterial activity when irradiated with white LED light. While the **4-PdTPyP** isomer only had its MIC values reduced by half (46.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 19.5 μM), the meta isomer **3-PdTPyP** porphyrin had more significant activity, with MIC values ranged from 5.85 to 2.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.43 to 1.21 μM).

3.2. Time-kill assay

The behavior of RGM strains in the presence of different meta isomer **3-PdTPyP** concentrations is shown in Fig. 2. In this assay, we observed that the concentrations of MIC and 2xMIC inhibited the growth of most mycobacterial strains with only two applications of white LED light irradiation (at times 0 and 24 h of incubation). For the *M. smegmatis* strain, this bactericidal action was observed in the MIC after 48 h of incubation, thereby requiring the application of three irradiation sessions (at times 0, 24, and 48 h). In this context, we also observed that in relation to the positive control, the concentration of 1/2MIC could reduce, to some degree, mycobacterial growth.

3.3. ROS experiments

From the evaluation of the PS activity against mycobacterial strains, the possible ROS involved in this photoinactivation process were identified. In the assay in the presence of ROS scavengers, it was possible to observe that, for the porphyrin **3-PdTPyP**, the susceptibility of the strains under study was reduced mainly in the presence of the ascorbic acid ($^1\text{O}_2$ quencher; Tables 2 and 3). Their MIC values in the absence of $^1\text{O}_2$ species increased to 23.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (9.74 μM) for *M. fortuitum* and *M. massiliense* and 11.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4.87 μM) for *M. abscessus* and *M. smegmatis*, respectively. However, porphyrins with peripheral Pd(II) complexes in the para position did not show any ROS species.

3.7. AFM analysis

Unlike the other microscopic techniques (e.g., TEM and/or SEM), 3D scanning is unique to AFM. Thus, AFM can quantitatively collect information regarding the height and depth of a sample at very high resolutions. By horizontally scanning the surface and collecting the vertical direction profile of the sample surface, the AFM image is the result of genuine 3-dimensional information of the surface, meaning that 3D data is the actual surface topography. The mycobacterial 3D AFM images acquired under different conditions (Fig. 3) indicated that Pd(II)-porphyrin and white-light exposure played a key role in the cell death pathway. Moreover, the bacteria preserved their morphological structures under dark conditions, as seen on the surface topography of a single representative bacilli (Fig. 3a). The presence of the porphyrin

Table 1
MIC values ($\mu\text{g}/\text{mL}$; μM) of porphyrins against RGM strains under dark and white LED light conditions (50 mW/cm² and 270 J/cm²).

Microorganism	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$; μM)			
	Dark condition		Light condition	
	4-PdTPyP	3-PdTPyP	4-PdTPyP	3-PdTPyP
<i>M. fortuitum</i>	93.75; 39	93.75; 39	46.87; 19.5	2.92; 1.21
<i>M. abscessus</i>	93.75; 39	93.75; 39	46.87; 19.5	2.92; 1.21
<i>M. massiliense</i>	93.75; 39	93.75; 39	46.87; 19.5	5.85; 2.43
<i>M. smegmatis</i>	93.75; 39	93.75; 39	46.87; 19.5	5.85; 2.43

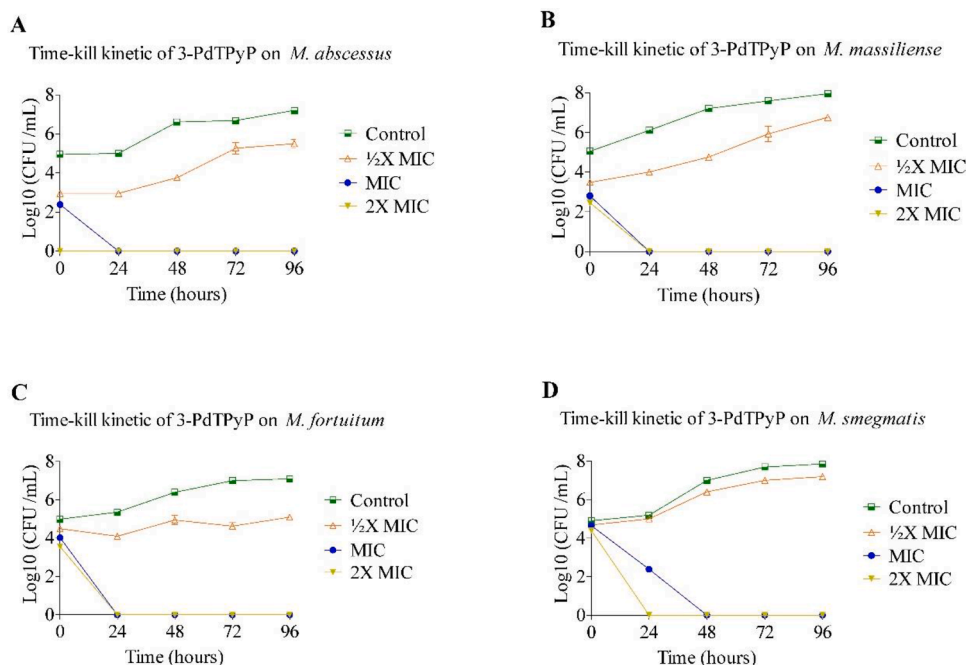


Fig. 2. Time-kill curve experiments of (A) *M. abscessus*, (B) *M. massiliense*, (C) *M. fortuitum*, and (D) *M. smegmatis* with the meso-tetra-cationic porphyrin **3-PdTPyP**.

Table 2

MIC values (in $\mu\text{g/mL}$ and μM) for **4-PdTPyP** porphyrin in the presence of ROS scavengers (ascorbic acid – AA; dimethyl sulfoxide – DMSO; terc-butanol – t-BuOH; N-acetylcysteine – NAC) under white LED light conditions (50 mW/cm^2 and 270 J/cm^2).

Microorganism	Absence	Scavengers			
		AA	DMSO	t-BuOH	NAC
<i>M. fortuitum</i>	46.87;	23.43;	46.87;	23.43;	23.43;
	19.5	9.74	19.5	9.74	9.74
<i>M. abscessus</i>	46.87;	46.87;	46.87;	46.87;	46.87;
	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
<i>M. massiliense</i>	46.87;	46.87;	46.87;	46.87;	46.87;
	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
<i>M. smegmatis</i>	46.87;	46.87;	46.87;	46.87;	46.87;
	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5

Table 3

MIC values (in $\mu\text{g/mL}$ and μM) for **3-PdTPyP** porphyrin in the presence of ROS scavengers (ascorbic acid – AA; dimethyl sulfoxide – DMSO; terc-butanol – t-BuOH; N-acetylcysteine – NAC) under white LED light conditions (50 mW/cm^2 and 270 J/cm^2).

Microorganism	Absence	Scavengers			
		AA	DMSO	t-BuOH	NAC
<i>M. fortuitum</i>	2.92;	23.43;	2.92;	2.92; 1.21	2.92;
	1.21	9.74	1.21		1.21
<i>M. abscessus</i>	2.92;	11.71;	1.46;	2.92; 1.21	2.92;
	1.21	4.87	0.60		1.21
<i>M. massiliense</i>	5.85;	23.43;	2.92;	5.85; 2.43	5.85;
	2.43	9.74	1.21		2.43
<i>M. smegmatis</i>	5.85;	11.71;	5.85;	11.71;	5.85;
	2.43	4.87	2.43	4.87	2.43

slightly affected bacteria morphology even in the dark (Fig. 3b), where the rod-shaped structure presents grooves on the top surface. In fact, similar behavior was observed by only using white-light (Fig. 3c); the presence of cationic porphyrin under light conditions significantly affected their morphology, wrinkling and thinning the bacilli (Fig. 3d).

The nanomechanical mode acquires high-resolution Fd data at each pixel concurrently in the entire scan area. Here, mycobacteria surface morphology and their adhesion forces were simultaneously obtained. Adhesion data extracted from Fd curves are listed in Table 4 and indicate that after treatment with **3-PdTPyP**, the bacterial cell walls increased the adhesive forces $0.4 \mu\text{N}$ under light conditions and $0.25 \mu\text{N}$ under dark conditions. The bacteria underwent a significant decrease in width under these conditions, although the bacilli were stretched up to $3.60 \mu\text{m}$, which is roughly twice as much as the original length. Untreated bacteria under dark conditions had adhesive forces down to $0.14 \mu\text{N}$ and slightly increased to $0.17 \mu\text{N}$.

The EFM operated in non-contact mode, where the tip scanned the surface to obtain an electrostatic map by measuring the electrostatic force between localized charge distributions on the surface and a biased AFM cantilever. Mycobacteria EFM maps are shown in Fig. 4, along with the respective topographic images. The EFM images are timely: lower electrostatic forces are found on the mycobacteria, albeit much higher positive electrostatic forces are localized around the bacteria perimeter. This electrostatic behavior is observed under any condition but far more in the dark without porphyrin treatment. In fact, it is plausible that this charge pattern mediates the adhesion and anchorage of bacteria onto the surface while decreasing charges must play an important role in bacterial growth rate. Moreover, various dark spots spread over the entire surfaces were observed on the bacteria after porphyrin treatment following light exposure, highlighting that the bacterial cell walls underwent significant electrochemical degradation under the applied conditions.

4. Discussion

Porphyrins are heterocyclic molecules widely available in nature [11], and their structural modifications have allowed the control of their physicochemical and pharmacological properties, enabling their use in various applications [9,11,16,19]. The aromatic nature of these macrocycles provides greater density and electronic π -conjugation in the porphyrin ring, making them more reactive and favoring various synthetic modifications. Therefore, meso-tetra-substituted derivatives are largely synthesized and studied as antimicrobial agents [22,39–43].

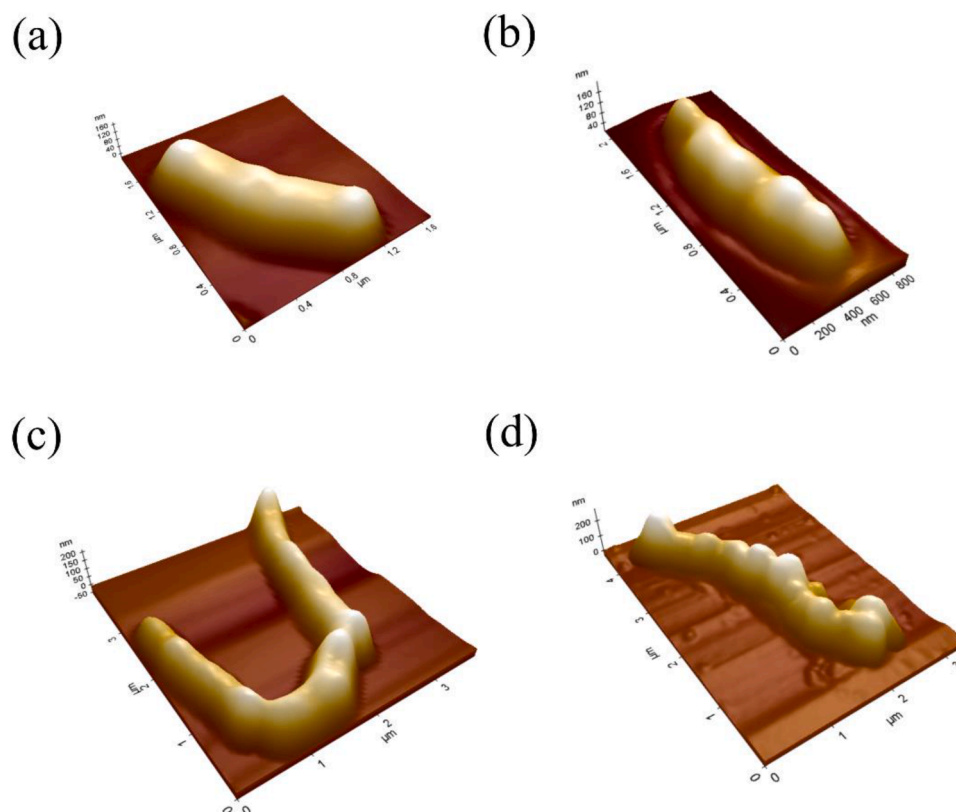


Fig. 3. AFM images of (a) dark condition, (b) dark condition + porphyrin, (c) light condition, (d) light condition + porphyrin.

Table 4

Length, width, and adhesion force of mycobacteria under the dark condition, dark condition + porphyrin, light condition, and light condition + porphyrin, respectively.

Condition	Length (μm)	Width (μm)	Adhesion force (μN)
Dark condition	1.83 ± 0.17	0.75 ± 0.03	0.14 ± 0.03
Light condition	2.63 ± 0.24	0.82 ± 0.02	0.17 ± 0.03
Dark condition + 3-PdTPyP	2.16 ± 0.24	0.46 ± 0.05	0.25 ± 0.05
Light condition + 3-PdTPyP	3.60 ± 0.33	0.43 ± 0.05	0.4 ± 0.16

Given the above, the tetra-substituted cationic porphyrins with Pd (II) complexes used herein showed a significant antimycobacterial effect, with emphasis on the meta-isomer **3-PdTPyP**. This photo-activity overlapped the previously shown one by neutral free-base porphyrins (**4-TPyP** and **3-TPyP**) against RGM strains [12]. The inclusion of peripheral coordination compounds such as [Pd(bpy)Cl]⁺ in the PS molecular structure may increase the triplet excited state population through a more efficient intersystem crossing and more significant ROS generation [3,7,35,44].

Furthermore, introducing positive charges in the peripheral pyridine positions of the porphyrin ring considerably increases the solubility of the derivatives in aqueous media and provides a more efficient interaction with negatively charged microbial cell structures [2,3,45,46]. Thus, cationic PS are described as easily interacting with the lipo-polysaccharides present in the membrane of Gram-negative bacteria and with the carboxylate and phosphate groups of the structures that make up the membrane of Gram-positive bacteria [47]. Likewise, considering the complex cellular structure of mycobacteria, we believe that the positive charges of the PS under study tend to bind to anionic groups (probably mycolic acids) present in the terminal lipoproteins of

the membrane, causing greater charge stabilization to occur with alterations of the membrane electrostatic potential, making the microorganism more susceptible to attacks from ROS species.

In addition, we associated the lower activity presented by the **4-PdTPyP** isomer to its reduced solubility in aqueous media (a greater tendency for aggregation) in relation to the **3-PdTPyP** derivative and also to the values found for log P_{OW} (+0.180 for **3-PdTPyP** and +0.735 for **4-PdTPyP** derivative), indicating porphyrin hydrophobicity behavior [48], which hinders its interaction with the bacteria and consequently its photoactive action. Many porphyrin derivatives are poorly soluble in water given their sizeable hydrophobic cores. Their intrinsic hydrophobicity associated with strong π-π ring interactions favor the formation of aggregates in an aqueous medium, especially at high concentrations of the molecule. As a result, we have a reduced ability to generate ROS by the porphyrin and, therefore, low bacterial photo-oxidation efficiency [10,49]. This reduced activity associated with porphyrin solubility has also been previously reported when comparing the **4-PtTPyP** with **3-PtTPyP** isomers [12,23].

Another important factor related to PS effectiveness is its ability to generate different ROS species [10]. Thus, through the assay with sequestering agents, we evaluated the species that could be involved in **3-PdTPyP** activity against RGM strains. In this assay, species produced in type I and type II processes of ROS generation were investigated. Our results showed that ¹O₂ species acted as the main species associated with the activity of this porphyrin in mycobacteria. What is more, the presence of the AA sequesterant provided the absence of this species in solution; thus, the PS activity was reduced and its MIC increased. Nonetheless, other ROS have been reported to be involved in the photoactive action of this molecule against strains of Gram-positive cocci of *S. aureus* and Gram-negative bacilli of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *P. aeruginosa* [23]. In these tests, the action of radical species of the O₂•⁻ and •OH type for Gram-negative bacteria was described. As for the Gram-positive strain of *S. aureus*, the main species detected was ¹O₂ followed by •OH.

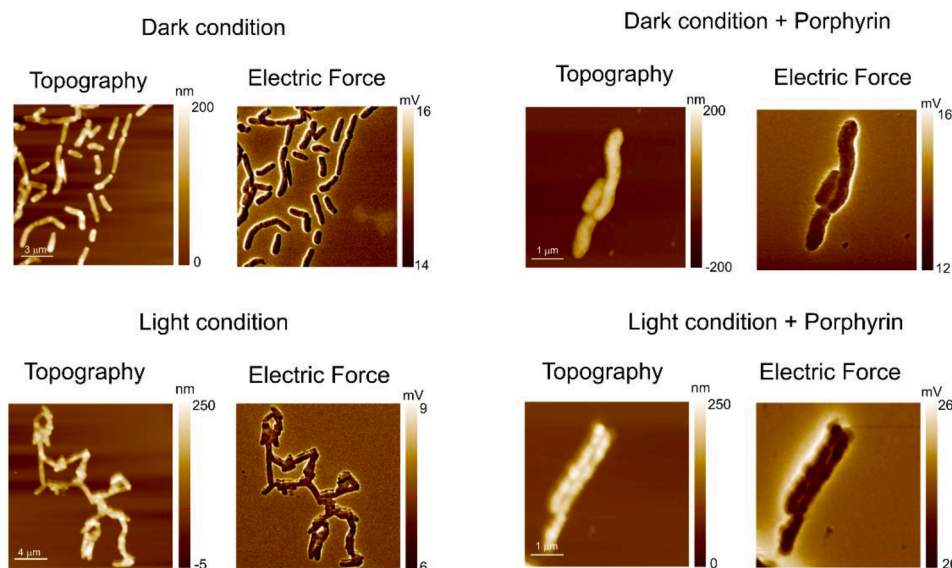


Fig. 4. Topographic and electric force maps of when submitted to dark, light, and 3-PdTPyP porphyrin treatment in dark and white-light conditions.

It is known that $^1\text{O}_2$ is one of the leading agents responsible for the photodynamic action in microorganisms [47,50], and numerous groups have reported that this is the main oxygen species produced by the porphyrins class [2,51,52]. Hence, other studies using porphyrin derivatives (e.g., PS) against *Mycobacterium* microorganisms have associated its photoactive action with $^1\text{O}_2$ [1212, [21],[38]]. The high reactivity of this substance enables interaction with the surrounding biomolecules, leading to irreversible photodamage to microorganisms [4,53]. The $^1\text{O}_2$ easily interacts with bacterial cell membrane components such as lipids and proteins; likewise, it can cross this barrier and react with various intracellular targets, including DNA bases. DNA damage has been related to its interaction with nucleobases, especially guanine, with 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as one of the main oxidation products. Mutations in these nitrogenous bases with transversions from guanine to thymine and guanine to cytosine have also been described. In addition, the DNA breakage process was pointed out as a result of this interaction with $^1\text{O}_2$ [45,47,54].

This damage caused to the microorganism was observed in AFM assays, and the images revealed significant changes in the morphology of the microorganism's cell wall, where the formation of cavities was observed after 3-PdTPyP treatment. In fact, topographic images confirmed the inactivation/destruction of the bacteria after treatment, and 3-PdTPyP affected the nanomechanical and electrostatic properties of the bacteria, increasing the adhesion to the AFM tip but losing most of the charges that were around the perimeter at the bacteria-substrate interface.

Treatment with 3-PdTPyP and white light leads to significant changes in the structure of the mycobacterial membrane, where the presence of cavities and, consequently, cell wall fragments can promote the interaction between the AFM tip and cell wall. Laskowski and co-workers obtained a similar behavior when studying the nanomechanical properties of bacteria after ampicillin treatment, where an increase in adhesion strength was observed. The authors speculated that alterations in the cell wall structure caused in the bacteria by ampicillin facilitated a more effective penetration of the AFM tip into the cell wall, helping increase the contact area and, therefore, the adhesion force [55].

Electrostatic force maps indicate that the mycobacterium-substrate interface is electrostatically charged; mycobacterium electrostatically adheres to the substrate (Fig. 4). Nevertheless, this electrostatic component decreased after porphyrin treatment. Moreover, many positive spots were observed on the 3-PdTPyP-treated bacteria under light

conditions, which are correlated to the cavities formed in the membrane and observed in the topographic images. Thus, AFM is not only an important technique for high-resolution topographic mapping of bacteria, but it also proved to be a crucial tool in studying their physicochemical/nanomechanical properties and interfacial interactions. In fact, only a few studies have used AFM to qualify and/or quantify the physicochemical properties of bacteria, in addition to evaluating the effects of photochemical treatments on these properties [12,21].

Our study also described the bactericidal action of the 3-PdTPyP compound, which could eradicate mycobacterial growth with just two sessions of visible white light irradiation. This finding is of great relevance, considering that therapy for this pathogen group involves more than one therapeutic agent and requires long treatment periods [56]. When associated with skin diseases, mycobacteriosis treatment may last for 4 to 6 months, depending on the severity of the infection [57]. However, when these microorganisms are responsible for lung diseases, therapy tends to be more extensive and may last up to 24 months [34].

In addition, it is important to emphasize that the incidence of RGM diseases is largely underestimated and, often, misdiagnosed as tuberculosis (TB), which is common due to its morphotintorial similarity under microscopic examination in the initial screening. Nonetheless, these species do not respond to classic TB drug regimens, resulting in therapeutic inefficiency [34]. Thus, considering the broad microbiological spectrum exhibited by aPDT, its use in treating localized mycobacterial infections, even before the clinical result issued by the microbiology laboratory, would be a promising alternative. In addition, the combination of aPDT with conventional antimycobacterial therapy has already been shown to be significant [58,59] and represents an exciting approach to reduce the time of mycobacterial treatment and provide greater patient adherence to therapy.

5. Conclusions

This study demonstrated, for the first time, the potential anti-mycobacterial effects of tetra-cationic porphyrins with peripheral palladium(II) complexes $[\text{Pd}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$. The meta substituted isomer (3-PdTPyP) proved to be the most promising PS with a stimulating absorption and photochemical/photobiological properties that led to the local production of ROS, especially singlet oxygen, which acted as a photosensitizer and promoted damage to the mycobacterial cell wall, in addition to influencing its nanomechanical and electrostatic adhesion properties. Considering that skin and soft tissue infections are among the

most common diseases caused by RGM and the potential of these highly aromatic molecules, applying these PS in the localized photoinactivation of these microorganisms is interesting. In addition, its combination with conventional antimycobacterial therapy represents an attractive approach to reduce mycobacterial treatment time and improve patient adherence to therapy.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

CRedit authorship contribution statement

Grazille Guidolin Rossi: Formal analysis, Investigation, Methodology. **Kevin Bordignon Guterres:** Formal analysis, Investigation, Methodology. **Kelly Schneider Moreira:** . **Thiago Augusto Lima Burgo:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Writing – review & editing. **Marli Matiko Anraku de Campos:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Writing – review & editing. **Bernardo Almeida Iglesias:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

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

Acknowledgments

This study was financed by CNPq, CAPES and FAPERGS. Bernardo A. Iglesias thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil; Universal Grants 409150/2018-5 and 304711/2018-7) and Marli Matiko Anraku de Campos thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil; Grants 404541/2016-0). Thiago A. L. Burgo thanks to MCTIC/CNPq (465452/2014-0), FAPESP (2014/50906-9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 through INCT/INOMAT (National Institute for Complex Functional Materials) and MCT/Finep/CT-Infra 02/2010. Atlas Assessoria Linguística is also acknowledged for providing support with the English version of this manuscript.

References

- [1] M. Kyropoulou Lanzilotto, E.C. Constable, C.E. Housecroft, W.P. Meier, C. G. Palivan, Porphyrin-polymer nanocompartments: singlet oxygen generation and antimicrobial activity, *J. Biol. Inorg. Chem.* 23 (2018) 109–122, <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1514-8>.
- [2] J. Carneiro, A. Gonçalves, Z. Zhou, K.E. Griffin, N.E.M. Kaufman, M.D.G. H. Vicente, Synthesis and in vitro PDT evaluation of new porphyrins containing meso-epoxymethylaryl cationic groups, *Lasers. Surg. Med.* 50 (2018) 566–575, <https://doi.org/10.1002/lsm.22824>.
- [3] K. Zhou, R. Tian, G. Li, X. Qiu, L. Xu, M. Guo, D. Chigan, Y. Zhang, X. Chen, G. He, Cationic chalcogenoviologen derivatives for photodynamic antimicrobial therapy and skin regeneration, *Chem. Eur. J.* 25 (2019) 13472–13478, <https://doi.org/10.1002/chem.201903278>.
- [4] M. Klausen, M. Uccuncu, M. Bradley, Design of photosensitizing agents for targeted antimicrobial photodynamic therapy, *Molecules* 25 (2020) 5239, <https://doi.org/10.3390/molecules25225239>.
- [5] V. Pérez-Laguna, Y. Gilaberte, M.I. Millán-Lou, M. Agut, S. Nonell, A. Rezusta, M. R. Hamblin, A combination of photodynamic therapy and antimicrobial compounds to treat skin and mucosal infections: a systematic review, *Photochem. Photobiol. Sci.* 18 (2019) 1020–1029, <https://doi.org/10.1039/C8PP00534F>.
- [6] S. Fenu Vassena, F. Giuliani, L. Fantetti, G. Roncucci, G. Simonutti, C.L. Romano, R. de Francesco, L. Drago, Photodynamic antibacterial and antibiofilm activity of RLP068/Cl against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* forming biofilms on prosthetic material, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 44 (2014) 47–55, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.03.012>.
- [7] J. Deng, H. Li, M. Yang, F. Wu, Palladium porphyrin complexes for photodynamic cancer therapy: effect of porphyrin units and metal, *Photochem. Photobiol. Sci.* 19 (2020) 905–912, <https://doi.org/10.1039/C9PP00363K>.
- [8] F. Wu, M. Yang, J. Zhang, S. Zhu, M. Shi, K. Wang, Metalloporphyrin-indomethacin conjugates as new photosensitizers for photodynamic therapy, *J. Biol. Inorg. Chem.* 24 (2019) 53–60, <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1626-9>.
- [9] D.K. Deda, B.A. Iglesias, E. Alves, K. Araki, C.R.S. Garcia, Porphyrin derivative nanoformulations for therapy and antiparasitic agents, *Molecules* 25 (2020) 2080, <https://doi.org/10.3390/molecules25092080>.
- [10] R. Khan, M. Özkan, A. Khaligh, D. Tuncel, Water-dispersible glycosylated poly (2,5'-thienylene)porphyrin-based nanoparticles for antibacterial photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.* 18 (2019) 1147–1155, <https://doi.org/10.1039/C8PP00470F>.
- [11] N. Tsolekile, S. Nelana, O.S. Oluwafemi, Porphyrin as diagnostic and therapeutic agent, *Molecules* 24 (2019) 2669, <https://doi.org/10.3390/molecules24142669>.
- [12] G.G. Rossi, K.B. Guterres, C.H. da Silveira, K.S. Moreira, T.A.L. Burgo, B.A. Iglesias, M.M.A. de Campos, Peripheral tetra-cationic Pt(II) porphyrins photo-inactivating rapidly growing mycobacteria: First application in mycobacteriology, *Microb. Pathog.* 148 (2020), 104455, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104455>.
- [13] M.G. Seeger, A.S. Ries, L.T. Gressler, S.A. Botton, B.A. Iglesias, J.F. Cargnelutti, In vitro antimicrobial photodynamic therapy using tetra-cationic porphyrins against multidrug-resistant bacteria isolated from canine otitis, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 32 (2020), 101982, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101982>.
- [14] B. Pucelik Sulek, M. Kobielusz, A. Barzowska, J.M. Dabrowski, Photodynamic inactivation of bacteria with porphyrin derivatives: Effect of charge, lipophilicity, ROS generation, and cellular uptake on their biological activity in vitro, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 8716, <https://doi.org/10.3390/ijms21228716>.
- [15] W. Xuan, L. Huang, Y. Wang, X. Hu, G. Szweczyk, Y.Y. Huang, A. El-Husseini, J. C. Bommer, M.L. Nelson, T. Sarna, M.R. Hamblin, Amphiphilic tetracationic porphyrins are exceptionally active antimicrobial photosensitizers: In vitro and in vivo studies with the free-base and Pd-chelate, *J. Biophotonics.* 12 (2019), e201800318, <https://doi.org/10.1002/jbio.201800318>.
- [16] S. Ziganshyna, A. Guttenberger, N. Lippmann, S. Schulz, S. Bercker, A. Kahnt, T. Rüffer, A. Voigt, K. Gerlach, R. Werdehausen, Tetrahydroporphyrin-tetratosylate (THPTS)-based photodynamic inactivation of critical multidrug-resistant bacteria in vitro, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 55 (2020), 105976, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105976>.
- [17] J. Bozja, K. Yi, W.M. Shafer, I. Stojiljkovic, Porphyrin-based compounds exert antibacterial action against the sexually transmitted pathogens *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus ducreyi*, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24 (2004) 578–584, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.06.008>.
- [18] H. Tasli, A. Akbiyik, V. Alptuzun, S. Parlar, Antibacterial activity of porphyrin derivatives against multidrug-resistant bacteria, *Pak. J. Pharm. Sci.* 32 (2019) 2369–2373, <http://doi.org/10.36721/PJPS.2019.32.5.SP.2369-2373.1>.
- [19] E. Caruso, M.C. Malacarne, S. Banfi, M.B. Gariboldi, V.T. Orlandi, Cationic diarylporphyrins: In vitro versatile antibacterial and antibacterial photosensitizers, *J. Photochem. Photobiol. B.* 197 (2019), 111548, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.111548>.
- [20] M. Jia, B. Mai, S. Liu, Z. Li, Q. Liu, P. Wang, Antibacterial effect of S-Porphin sodium photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and multiple drug resistance *Staphylococcus aureus*, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 28 (2019) 80–87, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.031>.
- [21] K.B. Guterres, G.G. Rossi, M.M.A. de Campos, K.S. Moreira, T.A.L. Burgo, B. A. Iglesias, Metal center ion effects on photoinactivating rapidly growing mycobacteria using water-soluble tetra-cationic porphyrins, *Biomaterials* 33 (2020) 269–282, <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00251-3>.
- [22] L.Q.S. Lopes, A.P. Ramos, P.M. Copetti, T.V. Acunha, B.A. Iglesias, R.C.V. Santos, A.K. Machado, M.R. Sagrillo, Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra(4-pyridyl)platinum(II) porphyrin, *Microb. Pathog.* 128 (2019) 47–54, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.038>.
- [23] C.H. da Silveira, V. Vieceli, D.J. Clerici, R.C.V. Santos, B.A. Iglesias, Investigation of isomeric tetra-cationic porphyrin activity with peripheral [Pd(bpy)Cl]⁺ units by antimicrobial photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 31 (2020), 101920, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101920>.
- [24] D.C. Jornada, R.Q. Garcia, C.H. da Silveira, L. Misoguti, C.R. Mendonça, R.C. V. Santos, L. de Boni, B.A. Iglesias, Investigation of the triplet excited state and application of cationic meso-tetra(cisplatin)porphyrins in antimicrobial photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 35 (2021), 102459, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102459>.
- [25] K. O'Riordan, D.S. Sharlin, J. Gross, S. Chang, D. Errabelli, O.E. Akilov, S. Kosaka, G.J. Nau, T. Hasan, Photoinactivation of *Mycobacteria* in vitro and in a new murine model of localized *Mycobacterium bovis* BCG-induced granulomatous infection, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50 (2006) 1828–1834, <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1828-1834.2006>.
- [26] B.A. Brown-Elliott, J.V. Phillely, D. Schlossberg, Rapidly growing mycobacteria, *Microbiol Spectr* 5 (2017) 1–19, <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016>.
- [27] S. Hatakeyama, Y. Ohama, M. Okazaki, Y. Nukui, K. Moriya, Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan, *BMC Infect. Dis.* 17 (2017) 197, <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2298-8>.
- [28] S. Faria, I. João, L. Jordão, General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection, *J. Pathog.* 809014 (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/809014>.
- [29] L.A. Marcos Franco-Paredes, A.F. Henao-Martínez, A.J. Rodríguez-Morales, W. E. Villamil-Gómez, E. Gotuzzo, A. Bonifaz, Cutaneous mycobacterial infections, *Clin. Microbiol. Rev.* 32 (2018), e0006918, <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-18>.

- [30] E.A. Misch, C. Saddler, J.M. Davis, Skin and soft tissue infections due to nontuberculous mycobacteria, *Curr. Infect. Dis. Rep.* 20 (2018) 6, <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0611-3>.
- [31] B. Winburn, T. Sharman, Atypical mycobacterial disease. StatPearls [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556117/], (FL): StatPearls Publishing, Treasure Island, 2021.
- [32] A.B. Mirabal, G. Ferrer, Lung nontuberculous mycobacterial infections. StatPearls [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31869064/], (FL): StatPearls Publishing, Treasure Island, 2021.
- [33] J.A. Shulha, P. Escalante, J.W. Wilson, Pharmacotherapy approaches in nontuberculous mycobacteria infections, *Mayo. Clin. Proc.* 94 (2019) 1567–1581, <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.12.011>.
- [34] M.L. Wu, D.B. Aziz, V. Dartois, T. Dick, NTM drug discovery: status, gaps and the way forward, *Drug Discov. Today* 23 (2018) 1502–1519, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.04.001>.
- [35] F.S. Santos, C.H. da Silveira, F.S. Nunes, D.C. Ferreira, H.F.V. Victória, K. Krambrock, O.A. Chaves, F.S. Rodembusch, B.A. Iglesia, Photophysical, photodynamical, redox properties and BSA interactions of novel isomeric tetracationic peripheral palladium(II)-bipyridyl porphyrins, *Dalton Trans.* 49 (2020) 16278–16295, <https://doi.org/10.1039/d0dt01063d>.
- [36] G.L. Woods, B. Brown-Elliott, P.S. Conville, E.P. Desmond, G.S. Hall, G. Lin, G. E. Pfyffer, J.C. Ridderhof, S.H. Siddiqi, R.J. Wallace, N.G. Warren, F.G. Witebsky, *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard, second ed., vol. 3, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011, pp. 26–28.*
- [37] T.T. Aung, J.K.H. Yam, S. Lin, S.M. Salleh, M. Givskov, S. Liu, N.C. Lwin, L. Yang, R.W. Beuerman, Biofilms of pathogenic nontuberculous mycobacteria targeted by new therapeutic approaches, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 24–35, <https://doi.org/10.1128/AAC.01509-15>.
- [38] K.B. Guterres, G.G. Rossi, L.B. Menezes, M.M.A. de Campos, B.A. Iglesias, Preliminary evaluation of the positively and negatively charge effects of tetra-substituted porphyrins on photoinactivation of rapidly growing mycobacteria, *Tuberculosis* 117 (2019) 45–51, <https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.06.001>.
- [39] M. Bondi, A. Mazzini, S. de Niederhäusern, R. Iseppi, P. Messi, Inhibition of multidrug-resistant gram-positive and gram-negative bacteria by a photoactivated porphyrin, *Pol. J. Microbiol.* 66 (2017) 533–536, <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7092>.
- [40] S.R. Choi, B.E. Britigan, B. Switzer, T. Hoke, D. Moran, P. Narayanasamy, In vitro efficacy of free and nanoparticle formulations of gallium(III) meso-tetraphenylporphyrine against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* and gallium biodistribution in mice, *Mol. Pharm.* 15 (2018) 1215–1225, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b01036>.
- [41] X. Ragàs, X. He, M. Agut, M. Roxo-Rosa, A.R. Gonsalves, A.C. Serra, S. Nonell, Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: photosensitizer-dependent production and decay in *E. coli*, *Molecules* 18 (2013) 2712–2725, <https://doi.org/10.3390/molecules18032712>.
- [42] T. Zoltan, F. Vargas, C. Rivas, V. López, J. Perez, A. Biasutto, Synthesis, photochemical and photoinduced antibacterial activity studies of meso-tetra (pyren-1-yl)porphyrin and its Ni, Cu and Zn complexes, *Sci. Pharm.* 78 (2010) 767–789, <https://doi.org/10.3797/scipharm.1003-13>.
- [43] T. Zoltan, F. Vargas, V. López, V. Chávez, C. Rivas, Á.H. Ramírez, Influence of charge and metal coordination of meso-substituted porphyrins on bacterial photoinactivation, *Spectrochim. Acta. A* 135 (2015) 747–756, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.053>.
- [44] V.Rai-Constapel Rodriguez-Serrano, M.C. Daza, M. Doerr, C.M. Marian, Internal heavy atomeffects in phenothiazinium dyes: enhancement of intersystem crossing via vibronic spin-orbit coupling, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 11350–11358, <https://doi.org/10.1039/C5CP00194C>.
- [45] B.M. Amos-Tautua, S.P. Songca, O.S. Oluwafemi, Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy, *Molecules* 24 (2019) 2456, <https://doi.org/10.3390/molecules24132456>.
- [46] Z. Zhang, H. Yu, S. Wu, H. Huang, L. Si, H. Liu, L. Shi, H. Zhang, Synthesis, characterization, and photodynamic therapy activity of 5,10,15,20-Tetrakis (carboxyl)porphyrin, *Bioorg. Med. Chem.* 27 (2019) 2598–2608, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.051>.
- [47] L. Sobotta, P. Skupin-Mrugalska, J. Piskorz, J. Mielcarek, Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria, *Eur. J. Med. Chem.* 175 (2019) 72–106, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.057>.
- [48] S.C. Pinto, T.V. Acunha, J.M. Santurio, L.B. Denardi, B.A. Iglesias, Investigation of powerful fungicidal activity of tetra-cationic platinum(II) and palladium(II) porphyrins by antimicrobial photodynamic therapy assays, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2021). Submitted.
- [49] K. Liu, Y. Liu, Y. Yao, H. Yuan, S. Wang, Z. Wang, X. Zhang, Supramolecular photosensitizers with enhanced antibacterial efficiency, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 8285–8289, <https://doi.org/10.1002/anie.201303387>.
- [50] Y. Xiong, X. Tian, H.W. Ai, Molecular tools to generate reactive oxygen species in biological systems, *Bioconjug. Chem.* 30 (2019) 1203–1297, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00191>.
- [51] T. Maisch, C. Bosl, R.M. Szeimies, B. Love, C. Abels, Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA ex vivo, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2007) 545–551, <https://doi.org/10.1039/b614770d>.
- [52] S.R.Dias Tavares, C.M. Carvalho, M.A. Faustino, J.P. Tomé, M.G. Neves, A.C. Tomé, J.A. Cavaleiro, A. Cunha, N.C. Gomes, E. Alves, A. Almeida, Mechanisms of photodynamic inactivation of a gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins, *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 1659–1669, <https://doi.org/10.1039/c1pp05097d>.
- [53] M. Wainwright, Safe photoantimicrobials for skin and soft-tissue infections, *Int. J. Antimicrob. Agents* 36 (2010) 14–18, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.03.002>.
- [54] L. Misba, S. Zaidi, A.U. Khan, Efficacy of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm: Role of singlet oxygen, *J. Photochem. Photobiol. B* 183 (2018) 16–21, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.024>.
- [55] Laskowski, J. Strzelecki, K. Pawlak, H. Dahm, A. Balter, Effect of ampicillin on adhesive properties of bacteria examined by atomic force microscopy, *Micron* 112 (2018) 84–90, <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.05.005>.
- [56] K. To, R. Cao, A. Yegiazaryan, J. Owens, V. Venketaraman, General overview of nontuberculous mycobacteria opportunistic pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 2541, <https://doi.org/10.3390/jcm9082541>.
- [57] Y.M. Wi, Treatment of extrapulmonary nontuberculous mycobacterial diseases, *Infect. Chemother.* 51 (2019) 245–255, <https://doi.org/10.3947/ic.2019.51.3.245>.
- [58] N. Gong, Y. Tan, M. Li, W. Lu, X. Lei, ALA-PDT combined with antibiotics for the treatment of multiple skin abscesses caused by *Mycobacterium fortuitum*, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 15 (2016) 70–72, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.05.009>.
- [59] K. Sun, H. Yang, X. Huang, N. Gong, Q. Qin, W. Lu, X. Lei, ALA-PDT combined with antibiotics for the treatment of atypical mycobacterial skin infections: Outcomes and safety, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 19 (2017) 274–277, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.06.015>.

4 DISCUSSÃO

A ocorrência das MCR vem aumentando em todos os países e as infecções de pele são cada vez mais estudadas, principalmente com o aumento de condições imunossupressoras e com o desenvolvimento de novos medicamentos que afetam a função imunológica (LOPEZ-LUIS et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2021, MIRETTI et al., 2022). Micobacteriose é uma doença considerada desafiadora para medicina visto que apresenta uma natureza persistente, com requisitos prolongados de tratamento e recidivas frequentes. Além dessas limitações, a crescente resistência aos esquemas terapêuticos tradicionais é um fator preocupante no meio clínico (DUMIC; LUTWICK, 2021; MIRETTI et al., 2022; QUANG; JANG, 2021).

Dentre o conjunto de novas modalidades eficientes em eliminar microrganismo, o tratamento antimicrobiano desencadeado por luz, a chamada TFIa, se apresenta como uma ferramenta poderosa para erradicar microrganismos diretamente pelo controle remoto da irradiação de luz (HU et al., 2019; ZHANG et al., 2020). As vantagens dessa modalidade em relação à terapia convencional incluem a curta duração do tempo de tratamento, o que favorece a adesão do paciente; trata-se de um mecanismo de ação multialvo, o que implica uma baixa probabilidade de desenvolver resistência; a falta de interação medicamentosa, que facilita uma possível combinação com antimicrobianos; é facilmente reprodutível, econômica, com efeitos adversos leves e perfil de risco-benefício aceitável (NAVARRO-BIELSA et al., 2022; SUVOROV et al., 2021). Ademais, o efeito secundário da luz sobre a velocidade de cicatrização e o reparo do tecido lesado torna este regime de tratamento uma escolha valiosa para feridas e outras infecções cutâneas (ASPIROZ et al., 2017; MYLONA et al., 2020; RASTELLI, 2021; TORABI et al., 2021).

Porfirinas e seus derivados estão entre os FS mais explorados neste meio devido à sua alta eficiência na produção de $^1\text{O}_2$ e à capacidade de absorver luz em todo o espectro visível (TANG et al., 2021; ZHANG et al., 2020; YU et al., 2020). Além disso, suas excelentes perspectivas de desenvolvimento em síntese farmacêutica favorecem modificações superficiais em sua estrutura permitido, assim, o controle de suas propriedades físico-químicas e farmacológicas (DEDA et al., 2020; MAHAJAN et al., 2020). Desta forma, essas moléculas estão no centro das aplicações médicas, com um foco cada vez maior em sua capacidade de gerar EROs para TFD (COCCA et al., 2018; LIN et al., 2020; VALLECORSA, 2021), juntamente com propriedades de bioimagem (FATHI; PAN, 2020; HOU et al., 2022) e biossensor (CHAN et al., 2021; NORVAIŠA; KIELMANN; SENGE, 2020).

Com base nas considerações acima, este estudo avaliou uma série de porfirinas com propriedades fotodinâmicas para atuarem como agentes antimicrobianos no controle de infecção micobacterianas. No primeiro momento comparou-se a atividade das porfirinas de bases livres (**3-TPyP** e **4-TPyP**) com as porfirinas tetra-catiônicas contendo complexos de platina(II) (**3-PtTPyP** e **4-PtTPyP**) e a importância da presença de cargas e da posição dos substituintes na periferia do anel porfirínico. Aqui foi detectada a ação superior do FS na presença de carga positiva, principalmente quando o complexo se encontrava na posição *meta*.

Sabe-se que a alta geração de EROs pela molécula é uma das exigências para um FS ideal (DA FONSECA; DE PAOLI; MENCALHA, 2022; RAN et al., 2021). Sendo assim, **4-PtTPyP** e **3-PtTPyP** se destacam na literatura, em relação às bases livres, por apresentarem valores de Φ_{Δ} superiores, de 0.71 e 0.63 respectivamente. Da mesma forma, **3-TPyP** também geram 1O_2 , mas com valores de Φ_{Δ} inferiores, de 0.09. Entretanto, para **4-TPyP** não foram descritos valores de Φ_{Δ} devido a elevada agregação desse FS em solução (DA SILVEIRA et al., 2020; PINTO et al., 2021; SILVA et al., 2021; TASSO et al., 2017).

Essa agregação é característica das porfirinas e está atribuída à sua alta hidrofobicidade, sobretudo quando a molécula se encontra na forma desmetalada. A hidrofobicidade é um aspecto interessante da TFIa, pois a menor compatibilidade com a água implica, em geral, em maior afinidade por membranas micobacterianas. Por outro lado, essa propriedade faz com que haja grande tendência à agregação por esses compostos em solução aquosa, acarretando em alterações nas propriedades espectrais e energéticas das moléculas, reduzindo, assim, o tempo de vida dos estados excitados gerados e, conseqüentemente, comprometendo a eficácia da terapia (KHAN et al., 2019; PARK et al., 2021; LIU et al., 2021b).

Outro dado que justifica essa agregação e, portanto, a redução da produção de EROs pelas moléculas de **4-TPyP** e **3-TPyP**, são seus valores de coeficiente de partição ($\log P_{OW}$). A literatura descreve esses compostos como FS mais hidrofóbicos, com valores de $\log P_{OW}$ de 3.370 e 2.142, respectivamente. Entretanto, as porfirinas **4-PtTPyP** e **3-PtTPyP** são descritas como mais hidrofílicas, apresentando valores de $\log P_{OW}$ de 0.852 e 0.244, respectivamente (DA SILVEIRA et al., 2020; PINTO et al., 2021).

Deste modo, pode-se afirmar que além de uma lipofilicidade desejável, a eficiência antimicrobiana de um FS também depende da acessibilidade e exposição de cargas para interação com as estruturas micobacterianas. Isso, por sua vez, é determinado pela forma e flexibilidade da molécula. Nesta primeira parte do trabalho, apesar das porfirinas tetra-

catiônicas de Pt(II) possuem o mesmo número de cargas e os mesmos substituintes, a posição desses elementos na estrutura da molécula foi essencial para ação fotodinâmica.

Em um segundo momento, foi avaliada a variação do efeito fotodinâmico sobre as cepas micobacterianas através da troca do metal na estrutura macrocíclica. As porfirinas tetra-catiônicas de Pd(II) (**PdTPyP**) utilizadas neste estágio possuem uma química muito similar à **PtTPyP** testada inicialmente. A escolha do metal Pd(II) é baseada no fato de serem comumente substitutos da Pt(II) na busca por compostos de coordenação com menores efeitos colaterais e uma maior segurança terapêutica; uma vez que esse elemento apresenta uma menor toxicidade e maior solubilidade em solução (ABU-SURRAH; KETTUNEN, 2006; CZARNOMYSY et al., 2021).

A partir dessa troca, notou-se que a molécula permaneceu mais ativa que a base livre, entretanto, sua atividade foi inferior à da porfirina de Pt(II) *meta*-substituída. Os seus valores de Φ_{Δ} e $\log P_{OW}$ também são encontrados na literatura e, apesar da **3-PdTPyP** ser mais solúvel que **3-PtTPyP**, com valor de $\log P_{OW}$ de 0.180, elas geram menos 1O_2 (Φ_{Δ} de 0.51). Fato esse que justifica sua menor ação frente às MCR em relação à **3-PtTPyP** (DA SILVEIRA et al., 2020; PINTO et al., 2021; SANTOS et al., 2020).

Em geral, este trabalho comprovou que tanto a **3-PtTPyP** quanto a **3-PdTPyP** são mais ativas contra micobactérias e que suas ações estão relacionadas às altas concentrações de EROs geradas por essas moléculas, principalmente via 1O_2 . Contudo, a grande vantagem do uso de FS contendo compostos de coordenação em posições periféricas é que, além de proporcionarem um aumento das taxas de cruzamento intersistemas, com maior preferência de popular o estado excitado tripleto (COCCA et al., 2018; DENG et al., 2020; RODRIGUEZ-SERRANO et al., 2015), esses derivados podem facilmente interagir com biomoléculas (como DNA, proteínas, lipídios) causando danos por processos oxidativos que, provavelmente, são muito mais eficientes do que os causados por grupos metila (BASSO et al., 2019; CHAVES et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2017).

Desta forma, é importante lembrar a importância dos derivados contendo complexos de Pt(II) contra, por exemplo, células cancerígenas. Em geral, a Pt(II) é descrita por apresentarem um melhor acúmulo no núcleo celular. Esse acúmulo favorece sua interação com o DNA, que é o principal alvo biológico identificado para os compostos de Pt(II) (LONGEVIAL et al., 2018; NAIK et al., 2014). Nesse contexto, acredita-se que a alta afinidade da **3-PtTPyP** com o DNA micobacteriano proporcione seu acúmulo inicial no núcleo celular, favorecendo o efeito fotodinâmico quando o FS é exposto à luz. Entretanto, apesar das muitas semelhanças entre complexos à base de Pt(II) e seus análogos de Pd(II),

tanto em termos de química quanto de mecanismo de ação, o uso do metal Pd(II) é muito mais atraente para driblar inconvenientes de toxicidade e permitir a interação com DNA e proteínas. Essas características, muitas vezes, favorecem o uso de compostos de Pd(II) na substituição da cisplatina para tratamento oncológico (ABU-SURRAH; KETTUNEN, 2006; CZARNOMYSY et al., 2021).

Por fim, os resultados aqui expostos e discutidos são de interesse suficiente para dar continuidade às investigações, principalmente no que diz respeito à elucidação do mecanismo de ação das porfirinas em MCR. A fotoinativação microbiana pode ser uma alternativa promissora para reduzir o uso abusivo de antimicrobianos, desta forma há necessidade de abordar ensaios que permitam esclarecer ainda mais sobre a toxicidade e biocompatibilidade desses compostos *in vitro* e *in vivo*.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Considerando os objetivos propostos neste trabalho e os resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que os FS em estudo apresentaram ação fotodinâmica frente às cepas de MCR. A ação superior das porfirinas tetra-catiônicas *meta*-substituídas (**3-PtTPyP/3-PdTPyP**) evidenciam a importância do rearranjo dos substituintes na periferia do anel, sendo responsáveis pela forma da molécula, sua solubilidade no meio e à acessibilidade de suas cargas. Além disso, foi observada a ação bactericida desses compostos a partir do segundo dia de aplicação de irradiação, comprovando a força dessa estratégia terapêutica na erradicação micobacteriana.

Apesar dos mecanismos de ação da TFIa não serem totalmente esclarecidos, percebemos a importância do $^1\text{O}_2$ na inibição do crescimento das MCR, sendo a principal EROs detectada pelo ensaio com os sequestradores. Por fim, as propriedades nano-mecânica, elétrica e morfológicas da cepa de *M. smegmatis* foram alteradas após o tratamento com as porfirinas mais ativas em estudo, demonstrando que a parede celular micobacteriana é o principal alvo das EROs geradas.

O fato desses compostos perturbarem a camada externa micobacteriana, traz muito entusiasmo sobre o potencial da sua combinação com outros agentes antimicobacterianos usados rotineiramente, sendo que poderiam facilitar sua penetração no microrganismo. As modalidades de combinação destacam-se por terem o potencial de mesclar de forma eficiente seus respectivos benefícios, ao mesmo tempo em que compensam suas deficiências correspondentes. Os tratamentos utilizando múltiplas estratégias podem também prevenir o desenvolvimento de resistência bacteriana devido às propriedades multialvo, bem como uma diminuição na dosagem desses agentes.

Da mesma forma, as direções futuras também incluem a aplicação dessa abordagem terapêutica sobre biofilmes micobacterianos. As perturbações causadas pelas porfirinas na força de adesão e nas cargas eletrostáticas que envolvem a interface micobactéria-substrato, são pontos positivos para sua interferência na produção de biofilmes por esse grupo de bactérias. Vale ressaltar que o processo de adesão é crucial para criação da camada de biofilme na superfície biótica ou abiótica.

Sendo assim, embora haja uma necessidade contínua de um estudo mais profundo sobre os mecanismos de ação das porfirinas, a fim de expandir sua aplicação clínica segura e eficaz, os resultados obtidos por essa pesquisa propõem que a TFIa é uma promessa para combater infecções cutâneas causadas por espécies de MCR.

REFERÊNCIAS

- ABU-SURRAH, A. S.; KETTUNEN, M. Platinum group antitumor chemistry: Design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. **Current Medicinal Chemistry**. v. 13, n. 11, p. 1337-1357, 2006.
- AHAMAD, N.; GUPTA, S.; PARASHAR, D. Using omics to study leprosy, tuberculosis, and other mycobacterial diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 12, p. 792617, 2022.
- AKBIYIK, A. et al. The antibacterial activity of photodynamic agents against multidrug resistant bacteria causing wound infection. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 40, p. 103066, 2022.
- ALFFENAAR, J. W. et al. Therapeutic drug monitoring in non-tuberculosis mycobacteria infections. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 60, n. 6, p. 711-725, 2021.
- ALVES, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by Photodithazine[®] in the treatment of denture stomatitis: A case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 21, p.168-171, 2017.
- ALVES, F. et al. Randomized and controlled clinical studies on antibacterial photodynamic therapy: An overview. **Photonics**. v. 9, n. 5, p. 340, 2022.
- AMOS-TAUTUA, B. M.; SONGCA, S. P.; OLUWAFEMI, O. S. Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. **Molecules**. v. 24, n. 13, p. 2456, 2019.
- ARFAATABAR, M.; KARAMI, P.; KHALEDI, A. An update on prevalence of slow-growing mycobacteria and rapid-growing mycobacteria retrieved from hospital water sources in Iran - A systematic review. **Germs**. v. 11, n. 1, p. 97-104, 2021.
- ASPIROZ, C. et al. Photodynamic therapy with methylene blue for skin ulcers infected with *Pseudomonas aeruginosa* and *Fusarium* spp. **Actas Dermo-sifiliográficas**. v. 108, n. 6, p. e45-e48, 2017.
- AZADI, D. et al. Mycobacteriosis and tuberculosis: Laboratory diagnosis. **The Open Microbiology Journal**. v. 12, n. 1, p. 41-58, 2018.
- BACHMANN, N. L. et al. Key transitions in the evolution of rapid and slow growing mycobacteria identified by comparative genomics. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, p. 3019, 2020.
- BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D. Micobactérias "não tuberculosas" no Brasil. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. v. 8, n.1, p. 23-32, 2000.
- BASSO, G. et al. Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-platinated porphyrins. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. v. 23, n. 9, p. 1041-1046, 2019.

BENOV, L.; CRAIK, J.; BATINIC-HABERLE, I. Protein damage by photo-activated Zn(II) *N*-alkylpyridylporphyrins. **Amino Acids**. v. 42, n. 1, p. 117-128, 2012.

BENTO, C. M.; GOMES, M. S.; SILVA, T. Looking beyond typical treatments for atypical mycobacteria. **Antibiotics**. v. 9, n. 1, p. 18, 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Comunicado de Risco Nº 002/2014 - GVIMS/GGTES/ANVISA**. Infecções por micobactérias de crescimento rápido (MCR) relacionadas a procedimentos invasivos em serviços de saúde e clínicas cosméticas, no período de janeiro de 2010 a setembro de 2014, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica - SVS/MS e ANVISA Nº 08**. Micobactérias, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica Conjunta Nº 01/2009-SVS/MS e ANVISA**. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009**, 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Recomendações para o diagnóstico e tratamento das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BROWN-ELLIOT, B. A.; WALLACE, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n. 4, p. 716-746, 2002.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; PHILLEY, J. V.; SCHLOSSBERG, D. Rapidly growing mycobacteria. **American Society for Microbiology**. v. 5, n. 1, 2017.

CARDOSO, A. M. **Surto de infecção após videoscopias causado por *Mycobacterium massiliense* em Goiânia: Análise molecular e determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

CARMELLO, J. C. et al. *In vivo* evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine[®] against *Candida albicans*. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 14, n. 7, p. 1319-1328, 2015.

CARMELLO, J. C. et al. *In vivo* photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. **Oral Diseases**. v. 22, n. 5, p. 415-422, 2016.

CARTER, G.; YOUNG, L. S.; BERMUDEZ, L. E. A subinhibitory concentration of clarithromycin inhibits *Mycobacterium avium* biofilm formation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 48, n. 12, p. 4907-4910, 2004.

- CHAN, W. et al. Lanthanide-tetrapyrrole complexes: Synthesis, redox chemistry, photophysical properties, and photonic applications. **Chemical Society Reviews**. v. 50, p. 12189-12257, 2021.
- CHAVES, O. A. et al. Effect of peripheral platinum(II) bipyridyl complexes on the interaction of tetra-cationic porphyrins with human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**. v. 301, p. 112466-112476, 2020.
- CHEN, H. Y. et al. Skin and soft-tissue infection caused by non-tuberculous mycobacteria in Taiwan, 1997-2008. **Epidemiology and Infection**. v. 139, n. 1, p. 121-129, 2011.
- CHIARADIA, L. et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, 2017.
- CHIN, K. L. et al. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections: Current state and future management. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 39, n. 5, p. 799-826, 2020.
- CHOI, H. et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with acquired macrolide-resistant *Mycobacterium abscessus* lung disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 61, n. 10, p. e01146-17, 2017a.
- CHOI, H. et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with macrolide-resistant *Mycobacterium massiliense* lung disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 61, n. 2, p. e02189-16, 2017b.
- CHOI, S. R. et al. *In vitro* efficacy of free and nanoparticle formulations of gallium(III) meso-tetraphenylporphyrine against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* and gallium biodistribution in mice. **Molecular Pharmaceutics**. v. 15, n. 3, p. 1215-1225, 2018.
- CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy - What we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.
- CLARY, G. et al. *Mycobacterium abscessus* smooth and rough morphotypes form antimicrobial-tolerant biofilm phenotypes but are killed by acetic acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 62, n. 3, p. e01782-17, 2018.
- CLSI. **Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: Approved standard**. CLSI document - M24-A2. USA, v. 31, n. 5. 2011.
- COCCA, L. H. Z. et al. Investigation of excited singlet state absorption and intersystem crossing mechanism of isomeric meso-tetra(pyridyl)porphyrins containing peripheral polypyridyl platinum(II) complexes. **Chemical Physics Letters**. v. 708, p. 1-10, 2018.
- COMBA, I. Y. et al. Cardiovascular device infections due to rapidly growing mycobacteria: A review of cases at a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**. v. 26, p. 100296, 2022.
- CONAGLEN, P. D. et al. Systematic review of tattoo-associated skin infection with rapidly growing mycobacteria and public health investigation of a cluster in Scotland, 2010. **Euro**

Surveill. v. 18, n. 32, p. 1-13, 2013.

CZARNOMYSY, R. et al. Platinum and palladium complexes as promising sources for antitumor treatments. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 22, n. 15, p. 8271, 2021.

DA FONSECA, A. S.; DA PAOLI, F.; MENCALHA, A. L. Photodynamic therapy for treatment of infected burns. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.** v. 38. p. 102831, 2022.

DA SILVEIRA, C. H. et al. Investigation of isomeric tetra-cationic porphyrin activity with peripheral [Pd(bpy)Cl]⁺ units by antimicrobial photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.** v. 31, p. 101920, 2020.

DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Advances in Microbial Physiology.** v. 39, p. 131-203, 1998.

DAFFÉ, M.; QUÉMARD, A.; MARRAKCHI, H. Mycolic acids: From chemistry to biology. **Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes.** v 1, n. 36, 2017.

DE GROOTE, M. A.; HUITT, G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases.** v. 42, n. 12, p. 1756-1763, 2006.

DE MELO, W. C. M. A.; PERUSSI, J. R. Photoinactivation versus antimicrobial agents. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences.** v. 33, n. 3, p. 331-340, 2012.

DE ROSSI, E. et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 42, n. 8, p. 1931-1937, 1998.

DEDA, D. K. et al. Porphyrin derivative nanoformulations for therapy and antiparasitic agents. **Molecules.** v. 25, n. 9, p. 2080, 2020.

DEGIACOMI, G. et al. *Mycobacterium abscessus*, an emerging and worrisome pathogen among cystic fibrosis patients. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 20, n. 23, p. 5868, 2019.

DENG, J. et al. Palladium porphyrin complexes for photodynamic cancer therapy: Effect of porphyrin units and metal. **Photochemical & Photobiological Sciences.** v. 19, p. 905-912, 2020.

DIGBY, E. M. et al. Highly potent photoinactivation of bacteria using a water soluble, cell permeable DNA-binding photosensitizer. **ACS Infectious Diseases.** v. 7, n. 11, p. 3052-3061, 2021.

DONDI, R. et al. Flexible synthesis of cationic peptide-porphyrin derivatives for light-triggered drug delivery and photodynamic therapy. **Organic & Biomolecular Chemistry.** v. 14, n. 48, p.11488-11501, 2016.

DOVIGO, L. N. et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medical Mycology**. v. 51, n. 3, p. 243-251, 2013.

DUKIC, W. et al. Clinical effectiveness of diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: A randomized clinical study. **Journal of Periodontology**. v. 84, n. 8, p. 1111-1117, 2013.

DUMIC, I.; LUTWICK, L. Successful treatment of rapid growing mycobacterial infections with source control alone: Case series. **IDCases**. v. 26, n. 2, p. e01332, 2021.

EMBLETON, M. L. et al. Antibody-directed photodynamic therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**. v. 10, n. 2, p. 92-97, 2004.

EMBLETON, M. L. et al. Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG-tin (IV) chlorin e6 conjugate. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 50, n. 6, p. 857-864, 2002.

EMMERICH, K.; FABRI, M. Atypische mykobakterien. **Der Hautarzt**. v. 68, n.5, p. 403-411, 2017.

ERBER, J. et al. Successful bedaquiline-containing antimycobacterial treatment in post-traumatic skin and soft-tissue infection by *Mycobacterium fortuitum* complex: A case report. **BMC Infectious Diseases**. v. 20, n. 1, p. 365, 2020.

FALKINHAM, J. O. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, n. 2, p. 250-254, 2007.

FARIA, S.; JOÃO, I.; JORDÃO, L. General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. **Journal of Pathogens**. v. 2015, 2015.

FATHI, P.; PAN, D. Current trends in pyrrole and porphyrin-derived nanoscale materials for biomedical applications. **Nanomedicine**. v. 15, n. 25, p. 2493-2515, 2020.

FEESE, E.; GHILADI, R. A. Highly efficient *in vitro* photodynamic inactivation of *Mycobacterium smegmatis*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 64, n. 4, p. 782-785, 2009.

FILA, G.; KAWIAK, A.; GRINHOLC, M. S. Blue light treatment of *Pseudomonas aeruginosa*: strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors. **Virulence**. v. 8, n.6, p. 938-958, 2016.

FLORES, V. C. et al. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. **Microbial Pathogenesis**. v. 99, p. 229-235, 2016.

FORBES, B. A. et al. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 31, n. 2, p. e00038-17, 2018.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Cutaneous mycobacterial infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 32, n. 1, p. e00069-18, 2019.

- GARCÍA-COCA, M. et al. Inhibition of *Mycobacterium abscessus*, *M. chelonae*, and *M. fortuitum* biofilms by *Methylobacterium* sp. **The Journal of Antibiotics**. v. 73, n. 3, p. 40-47, 2020.
- GILABERTE, Y. et al. Antimicrobial photodynamic therapy in dermatology. **Piel**. v. 27, n. 5, p. 274-282, 2012.
- GILABERTE, Y. et al. Cutaneous sporotrichosis treated with photodynamic therapy: An *in vitro* and *in vivo* study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 32, n. 1, p. 54-57, 2014.
- GILL, L. I.; DOMINIC, C.; TIBERI, S. Atypical mycobacterial infections - management and when to treat. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**. v. 27, n. 3, p. 216-223, 2021.
- GIROLDO, L. M. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**. v. 24, n. 1, p. 109-112, 2009.
- GJUROSKI, I.; FURRER, J.; VERMATHEN, M. Probing the interactions of porphyrins with macromolecules using NMR Spectroscopy techniques. **Molecules**. v. 26, n. 7, p. 1942, 2021.
- GONG, N. et al. ALA-PDT combined with antibiotics for the treatment of multiple skin abscesses caused by *Mycobacterium fortuitum*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 15, p. 70-72, 2016.
- GONZÁLEZ-DELGADO, J. A. et al. Use of photosensitizers in semisolid formulations for microbial photodynamic inactivation. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 59, n. 10, p. 4428-4442, 2016.
- GOPALASWAMY, R. et al. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - A comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Biomedical Science**. v. 27, n. 1, p. 74, 2020.
- GREENDYKE, R.; BYRD, T. F. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 6, p. 2019-2026, 2008.
- GRIFFITH, D. E.; DALEY, C. L. Treatment of *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. v. 161, n. 1, p. 64-75, 2022.
- GSPONER, N. S.; SPESIA, M. B.; DURANTINI, E. N. Effects of divalent cations, EDTA and chitosan on the uptake and photoinactivation of *Escherichia coli* mediated by cationic and anionic porphyrins. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 12, n. 1, p. 67-75, 2015.
- GUGLIELMETTI, L. et al. Human infections due to nontuberculous mycobacteria: The infectious diseases and clinical microbiology specialists' point of view. **Future Microbiology**. v. 10, n. 9, p. 1467-1483, 2015.
- GUIMARÃES, T. et al. Pseudo-outbreak of rapidly growing mycobacteria due to *Mycobacterium abscessus* subsp *bolletii* in a digestive and respiratory endoscopy unit caused

by the same clone as that of a countrywide outbreak. **American Journal of Infection Control**. v. 44, n. 11, p. e221-e226, 2016.

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, n. 67, 2018.

GUTERRES, K. B. et al. Nanomolar effective and first report of tetra-cationic silver(II) porphyrins against non-tuberculous mycobacteria in antimicrobial photodynamic approaches. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 38, p. 102770, 2022.

GUTERRES, K. B. et al. Preliminary evaluation of the positively and negatively charge effects of tetra-substituted porphyrins on photoinactivation of rapidly growing mycobacteria. **Tuberculosis**. v.117, p. 45-51, 2019.

HAMBLIN, M. R. et al. Polycationic photosensitizer conjugates: Effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 49, n. 6, p. 941-951, 2002.

HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Inorganic salts and antimicrobial photodynamic therapy: Mechanistic conundrums? **Molecules**. v. 23, n. 12, p. 3190, 2018.

HANSON, K. E. et al. Rapid molecular detection of inducible macrolide resistance in *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus* strains: A replacement for 14-day susceptibility testing? **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52, n. 5, p. 1705-1707, 2014.

HARRIS, K. A.; KENNA, D. T. D. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis: Molecular typing and clinical outcomes. **Journal of Medical Microbiology**. v. 63, n. 10, p. 1241-1246, 2014.

HATAKEYAMA, S. et al. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. **BMC Infectious Diseases**. v. 17, n. 1, p. 197, 2017.

HEFFRON, J. et al. A comparison of porphyrin photosensitizers in photodynamic inactivation of RNA and DNA bacteriophages. **Viruses**. v. 13, n. 3, p. 530, 2021.

HENKLE, E.; WINTHROP, K. L. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. **Clinics in Chest Medicine**. v. 36, n. 1, p. 91-99, 2015.

HOU, M. et al. Facile synthesis and in vivo bioimaging applications of porphyrin derivative-encapsulated polymer nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**. v. 33, n. 8, p. 4101-4106, 2022.

HU, C. et al. Synergistic chemical and photodynamic antimicrobial therapy for enhanced wound healing mediated by multifunctional light-responsive nanoparticles. **Biomacromolecules**. v. 20, n. 12, p. 4581-4592, 2019.

HUANG, L. et al. Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using photofrin. **ACS Infectious Diseases**. v. 3, n. 4, p 320-328, 2017.

HUANG, L. et al. Potentiation by potassium iodide reveals that the anionic porphyrin TPPS4 is a surprisingly effective photosensitizer for antimicrobial photodynamic inactivation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 178, p. 277-286, 2018.

HUANG, W.; YU, M.; HUANG, Y. Identification and drug susceptibility testing for nontuberculous mycobacteria. **Journal of the Formosan Medical Association**. v. 119, p. S32-S41, 2020.

IMRAN, M. et al. Emerging applications of porphyrins and metalloporphyrins in biomedicine and diagnostic magnetic resonance imaging. **Biosensors**. v. 8, n. 4, p. 95, 2018.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**. v. 123, n. 1-2, p. 11-18, 1994.

JIA, Q. et al. Rejuvenated photodynamic therapy for bacterial infections. **Advanced Healthcare Materials**. v. 8, n. 14, p. e1900608, 2019.

JONES, R. S. et al. Current significance of the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 94, n. 3, p. 248-254, 2019.

KHAN, R. et al. Water-dispersible glycosylated poly(2,5'-thienylene)porphyrin-based nanoparticles for antibacterial photodynamic therapy. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 18, n. 5, p. 1147-1155, 2019.

KLAUSEN, M.; UCUNCU, M.; BRADLEY, M. Design of photosensitizing agents for targeted antimicrobial photodynamic therapy. **Molecules**. v. 25, n. 22, p. 5239, 2020.

KOH, W. J. Nontuberculous mycobacteria-overview. **Microbiology Spectrum**. v. 5, n. 1, 2017.

KUMAR, K. et al. Management of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease: Therapeutic advances and emerging treatments. **European Respiratory Review**. v. 31, n. 163, p. 210212, 2022.

KWON, Y-S.; KOH, W-J. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease. **Journal of Korean Medical Science**. v. 31, n. 5, p. 649-659, 2016.

LAGE, R. et al. *Mycobacterium chelonae* cutaneous infection in a patient with mixed connective tissue disease. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 90, n. 1, 2015.

LANGE, C. et al. Consensus management recommendations for less common nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 22, n. 7, p. E178-E190, 2022.

LEE, C. N. et al. Daylight photodynamic therapy: An update. **Molecules**. v. 25, n. 21, p. 5195, 2020.

LEI, X. et al. A clinical study of photodynamic therapy for chronic skin ulcers in lower limbs infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Dermatological Research**. v. 307, n. 1, p. 49-55, 2015.

LI, X. H.; LEE, J. H. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. **Journal of Microbiology**. v. 55, n. 10, p. 753-766, 2017.

LI, X. Z.; ZHANG, L.; NIKAIDO, H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 7, p. 2415-2423, 2004.

LIN, Y. et al. Chemical approaches for the enhancement of porphyrin skeleton-based photodynamic therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 35, n. 1, p. 1080-1099, 2020.

LIU, C. F. et al. Nontuberculous mycobacteria in China: Incidence and antimicrobial resistance spectrum from a nationwide survey. **Infectious Diseases of Poverty**. v. 10, n. 1, p. 59, 2021a.

LIU, R. et al. Nanoparticles loading porphyrin sensitizers in improvement of photodynamic therapy for ovarian cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 33, n. 3, p. 102156, 2021b.

LIU, Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**. v. 1, n. 3, p. 140-167, 2015.

LONGEVIAL, J. et al. Peripherally metalated porphyrins with applications in catalysis, molecular electronics and biomedicine. **Chemistry: a European Journal**. v. 24, n. 58, p. 15442-15460, 2018.

LOPEMAN, R. C. et al. *Mycobacterium abscessus*: Environmental bacterium turned clinical nightmare. **Microorganisms**. v. 7, n. 3, p. 90, 2019.

LOPEZ-LUIS, B. A. et al. Nontuberculous mycobacterial infection in a tertiary care center in Mexico, 2001-2017. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 24, n. 3, p. 213-220, 2020.

MACKAY, A. M. The evolution of clinical guidelines for antimicrobial photodynamic therapy of skin. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 21, n. 3, p. 385-395, 2022.

MAHAJAN, P. G. Design and synthesis of new porphyrin analogues as potent photosensitizers for photodynamic therapy: Spectroscopic approach. **Journal of Fluorescence**. v. 30, n. 2, p. 397-406, 2020.

MALATESTI, N.; MUNITIC, I.; JURAK, I. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. **Biophysical Reviews**. v. 9, n. 2, p. 149-168, 2017.

MALDONADO-CARMONA, N.; OUK, T. S.; LEROY-LHEZ, S. Latest trends on photodynamic disinfection of Gram-negative bacteria: Photosensitizer's structure and delivery systems. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 21, n. 1, p. 113-145, 2022.

- MANAGA, M.; ANTUNES, E.; NYOKONG, T. Conjugates of platinum nanoparticles with gallium tetra e (4-Carboxyphenyl) porphyrin and their use in photodynamic antimicrobial chemotherapy when in solution or embedded in electrospun fiber. **Polyhedron**. v. 76, p. 94-101, 2014.
- MEIR, M.; BARKAN, D. Alternative and experimental therapies of *Mycobacterium abscessus* infections. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 21, n. 18, p. 6793, 2020.
- MESQUITA, M. Q. et al. Revisiting current photoactive materials for antimicrobial photodynamic therapy. **Molecules**. v. 23, n. 10, p. 2424, 2018.
- MIMA, E. G. et al. Comparison of photodynamic therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: A randomized clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, n. 10, p. E380-E388, 2012.
- MIMA, E. G. et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. v. 109, n. 3, p. 392-401, 2010.
- MIRABAL, A. B.; FERRER G. Lung nontuberculous mycobacterial infections. **StatPearls [Internet]**. 2020.
- MIRETTI, M. et al. Photoinactivation of non-tuberculous mycobacteria using Zn-phthalocyanine loaded into liposomes. **Tuberculosis**. v.136, p. 102247, 2022.
- MISCH, E. A.; SADDLER, C., DAVIS, J. M. Skin and soft tissue infections due to nontuberculous mycobacteria. **Current Infectious Disease Reports**. v. 20, n. 4, p. 6, 2018.
- MIYAZAKI, A. et al. Effects of Nd:YAG and CO₂ laser treatment and ultrasonic scaling on periodontal pockets of chronic periodontitis patients. **Journal of Periodontology**. v. 74, n. 2, p. 175-180, 2003.
- MOGHADDAM, S. et al. Isolation of nontuberculous mycobacteria species from different water sources: A study of six hospitals in Tehran, Iran. **BMC Microbiology**. v. 22, n. 1, p. 261, 2022.
- MULANI, M. S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, p. 539, 2019.
- MYLONA, V. et al. Laser-assisted aPDT protocols in randomized controlled clinical trials in dentistry: a systematic review. **Dentistry Journal**. v. 8, n. 3, p. 107, 2020.
- NAIK, A. et al. Light induced annihilation of tumor cells with platinum-porphyrin conjugates. **Angewandte Chemie**. v. 53, n. 27, p. 6938-6941, 2014.
- NASIRI, M. J. et al. New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. **Frontiers in microbiology**. v. 8, p. 681, 2017.

NAVARRO-BIELSA, A. et al. Combination of photodynamic therapy and oral antifungals for the treatment of onychomycosis. **Pharmaceuticals**. v.15, n. 6, p. 722, 2022.

NOGUEIRA, L. B. et al. Non-tuberculous cutaneous mycobacterioses. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**. v. 96, n. 5, p. 527-538, 2021.

NORVAIŠA, K.; KIELMANN, M.; SENGE, M. O. Porphyrins as colorimetric and photometric biosensors in modern bioanalytical systems. **Chembiochem**. v. 21, n. 13, p. 1793-1807, 2020.

NQWATA, L.; OUÉDRAGO, A. R. Non-tuberculous mycobacteria pulmonary disease: A review of trends, risk factors, diagnosis and management. **African Journal of Thoracic and Critical Care Medicine**. v. 28, n. 2, p. 157, 2022.

OLIVEIRA, V. A. et al. Photoactive *meso*-tetra(4-pyridyl)porphyrin-tetrakis-[chloro(2,2'-bipyridine)platinum(II) derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation. **Dalton Transactions**. v. 46, n. 5, p. 1660-1669, 2017.

PARK, J. M. Bioinspired applications of porphyrin derivatives. **Accounts of Chemical Research**. v. 54, n. 9, p. 2249-2260, 2021.

PARK, J. M. et al. Bioinspired applications of porphyrin derivatives. **Accounts of Chemical Research**. v. 54, n. 9, p. 2249-2260, 2021.

PEÑA, J. A. et al. Growth detection failures by the non radiometric Bactec MGIT 960 mycobacterial culture system. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 6, p. 2092-2095, 2012.

PÉREZ-LAGUNA, V. et al. A combination of photodynamic therapy and antimicrobial compounds to treat skin and mucosal infections: A systematic review. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v. 18, n. 5, p. 1020-1029, 2019.

PÉREZ-LAGUNA, V. et al. Bactericidal effect of photodynamic therapy, alone or in combination with mupirocin or linezolid, on *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1002, 2017.

PERSADMEHR, A. et al. Bioactive chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation *in vitro*. **Journal of Endodontics**. v. 40, n. 5, p. 703-709, 2014.

PHILIPS, R. C. et al. Cutaneous nontuberculous mycobacteria infections: A retrospective case series of 78 patients from the Texas Gulf Coast region. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 81, n. 3, p. 730-739, 2019.

PHILIPS, R. C. et al. *Mycobacterium fortuitum* infection arising in a new tattoo. **Dermatology Online Journal**. v. 20, n. 6, 2014.

PINTO, S. C. et al. Investigation of powerful fungicidal activity of tetra-cationic platinum(II) and palladium(II) porphyrins by antimicrobial photodynamic therapy assays. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 36, p. 102550, 2021.

PORVAZNIK, I.; SOLOVIC I.; MOKRY, J. Non-tuberculous mycobacteria: Classification, diagnostics, and therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 944, p. 19-25, 2016.

QUANG, N. T.; JANG, J. Current molecular therapeutic agents and drug candidates for *Mycobacterium abscessus*. **Frontiers in Pharmacology**. v. 12, p. 724725, 2021.

RAN, B. et al. Organic photo-antimicrobials: Principles, molecule design, and applications. **Journal of the American Chemical Society**. v. 143, n. 43, p. 17891-17909, 2021.

RASTELLI, A. N. S. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) as a disinfection and biomodulation approach in implant dentistry. **Photochemistry and Photobiology**. v. 97, n. 5, p. 1155-1160, 2021.

RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 52, n. 4, p. 1701-1718, 2021.

REYNOSO, E. et al. Photodynamic inactivation of microorganisms sensitized by cationic BODIPY derivatives potentiated by potassium iodide. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v. 16, n. 10, p. 1524-1536, 2017.

RIBEIRO, M. et al. Photodynamic therapy and combinatory treatments for the control of biofilm-associated infections. **Letters in Applied Microbiology**. v. 75, n. 3, p. 548-564, 2022.

RIBEIRO, M. S. et al. Photodynamic inactivation assisted by localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles: *In vitro* evaluation on *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 22, p. 191-196, 2018.

RODRIGUEZ-SERRANO, A. et al. Internal heavy atom effects in phenothiazinium dyes: Enhancement of intersystem crossing via vibronic spin-orbit coupling. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 17, n. 17, p. 11350-11358, 2015.

RUNYON, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Medical Clinics of North America**. v. 43, n. 1, p. 273-290, 1959.

SAMARANAYAKE, W. A. M. P. et al. Port-site infection due to nontuberculous mycobacteria following laparoscopic surgery. **International Journal of Mycobacteriology**. v. 9, n. 3, p. 231-238, 2020.

SANTOS, F. S. et al. Photophysical, photodynamical, redox properties and BSA interactions of novel isomeric tetracationic peripheral palladium(II)-bipyridyl porphyrins. **Dalton Transactions**. v. 49, n. 45, p. 16278-16295, 2020.

SAXENA, S.; SPAINK, H. P.; FORN-CUNÍ G. Drug resistance in nontuberculous mycobacteria: Mechanisms and models. **Biology (Basel)**. v. 10, n. 2, p. 96, 2021.

SCHWARZ, F. et al. Influence of fluorescence-controlled ER:YAG laser radiation, the vector system and hand instruments on periodontally diseased root surfaces *in vivo*. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 33, n. 3, p. 200-208, 2006.

SHAMAEI, M.; MIRSAEIDI, M. Nontuberculous mycobacteria, macrophages, and host innate immune response. **Infection and Immunity**. v. 89, n. 8, p. e0081220, 2021.

SHARMA, S. K.; UPADHYAY, V. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. **The Indian Journal of Medical Research**. v. 152, n. 3, p. 185-226, 2020.

SHIH, M. H.; HUANG, F. C. Effects of photodynamic therapy on rapidly growing nontuberculous mycobacteria keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 52, n. 1, p. 223-229, 2011.

SHLEEVA, M.; SAVITSKY, A.; KAPRELYANTS, A. Photoinactivation of mycobacteria to combat infection diseases: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 105, n. 10, p. 4099-4109, 2021.

SHRESTHA, A.; CORDOVA, M.; KISHEN, A. Photoactivated polycationic bioactive chitosan nanoparticles inactivate bacterial endotoxins. **Journal of Endodontics**. v. 41, n. 5, p. 686-691, 2015.

SILVA, C. M. et al. Photodynamic control of *Aedes aegypti* larvae with environmentally-friendly tetra-platinated porphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 224, p. 112323, 2021.

SILVA, P. E. et al. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 3, p. 800-804, 2001.

SONGCA, S. P.; ADJEL, Y. Applications of antimicrobial photodynamic therapy against bacterial biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 6, p. 3209, 2022.

SOUZA, E. Q. M et al. Antimicrobial photodynamic therapy compared to systemic antibiotic therapy in non-surgical treatment of periodontitis: Systematic review and meta-analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 31, p. 101808, 2020.

STOUT, J. E. et al. Pedicure-associated rapidly growing mycobacterial infection: An endemic disease. **Clinical Infectious Diseases**. v. 53, n. 8, p. 787-792, 2011.

STRNAD, L.; WINTHROP, K. L. Treatment of *Mycobacterium abscessus* complex. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 39, n. 3, p. 362-376, 2018.

SUN, K. et al. A new approach to the treatment of nontuberculous mycobacterium skin infections caused by iatrogenic manipulation: Photodynamic therapy combined with antibiotics: A pilot study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 37, p. 102695, 2022.

SUN, K. et al. ALA-PDT combined with antibiotics for the treatment of atypical mycobacterial skin infections: Outcomes and safety. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 19, p. 274-277, 2017.

SUVOROV, N. et al. Derivatives of natural chlorophylls as agents for antimicrobial photodynamic therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 12, p. 6392, 2021.

TANG, J. et al. Preparation of a porphyrin metal-organic framework with desirable photodynamic antimicrobial activity for sustainable plant disease management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 69, n. 8, p. 2382-2391, 2021.

TARDIVO, J. P. et al. A clinical trial testing the efficacy of PDT in preventing amputation in diabetic patients. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 11, n. 3, p. 342-350, 2014.

TASSO, T. T. et al. Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. **Dalton Transactions**. v. 46, n. 33, p. 11037-11045, 2017.

TENG, R.; DICK, T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. **FEMS Microbiology Letters**. v. 227, n. 2, p. 171-174, 2003.

THORNTON, C. S. et al. The respiratory microbiome and nontuberculous mycobacteria: an emerging concern in human health. **European Respiratory Review**. v. 30, n. 160, p. 200299, 2021.

TO, K. et al. General overview of nontuberculous mycobacteria opportunistic pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. **Journal of Clinical Medicine**. v. 9, n. 8, p. 2541, 2020.

TORABI, S. et al. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy on wounds infected by *Staphylococcus aureus* in animal models. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 33, n. 27, p. 102092, 2021.

TSUKAMURA, M. Identification of mycobacteria. **Tubercle**. v. 48, p. 311-338, 1967.

TURENNE, C. Y. Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 72, p. 159-168, 2019.

VALLECORSIA, P. et al. Novel *meso*-substituted porphyrin derivatives and its potential use in photodynamic therapy of cancer. **BMC Cancer**. v. 21, n. 1, p. 547, 2021.

VAN INGEN, J.; KUIJPER, E. J. Drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **Future Microbiology**. v. 9, n. 9, p. 1095-1110, 2014.

VIANA-NIERI, L. K. V. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 3, p. 850-855, 2008.

- VOIT, T. et al. Spatial distribution of a porphyrin-based photosensitizer reveals mechanism of photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **Frontiers in Medicine**. v. 19, n. 8, p. 641244, 2021.
- WANG, X. et al. ALA_PDT promotes ferroptosis-like death of *Mycobacterium abscessus* and antibiotic sterilization via oxidative stress. **Antioxidants**. v. 11, n. 3, p. 546, 2022.
- WARRIER, A. et al. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 33, p. 102090, 2021.
- WENG, Y. W. et al. Treatment for *Mycobacterium abscessus* complex-lung disease. **Journal of the Formosan Medical Association**. v. 119, n. 1, p. S58-S66, 2020.
- WENTWORTH, A. B. et al. Increased incidence of cutaneous nontuberculous mycobacterial infection, 1980 to 2009: A population-based study. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 88, n. 1, p. 38-45, 2013.
- WI, Y. M. Treatment of extrapulmonary nontuberculous mycobacterial diseases. **Infection and Chemotherapy**. v. 51, n. 3, p. 245-255, 2019.
- WILDNER, L. M. et al. Micobactérias: Epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**. v. 40, n. 3, p. 207-229, 2011.
- WINBURN, B.; SHARMAN, T. Atypical mycobacterial disease. **StatPearls [Internet]**. 2020.
- WINTHROP, K. L. et al. The clinical management and outcome of nail salon - acquired *Mycobacterium fortuitum* skin infection. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38, n. 1, p. 38-44, 2004.
- WOZNIAK, A.; GRINHOLC, M. Combined antimicrobial activity of photodynamic inactivation and antimicrobials - State of the art. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 930, 2018.
- WU, M. et al. Regulating the bacterial oxygen microenvironment via a perfluorocarbon-conjugated bacteriochlorin for enhanced photodynamic antibacterial efficacy. **Acta Biomaterialia**. v. 142, p. 242-252, 2022.
- WU, M. L. et al. NTM drug discovery: Status, gaps and the way forward. **Drug Discovery Today**. v. 23, n. 8, p. 1502-1519, 2018.
- XIONG, Y.; TIAN, X.; AI, H. W. Molecular tools to generate reactive oxygen species in biological systems. **Bioconjugate Chemistry**. v. 30, n. 5, p. 1297-1303, 2019.
- XU, Z. et al. Mechanism and *in vivo* evaluation: Photodynamic antibacterial chemotherapy of lysine-porphyrin conjugate. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 242, 2016.
- YOUF, R. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: Latest developments with a focus on combinatory strategies. **Pharmaceutics**. v. 13, n. 12, p. 1995, 2021.

YU, W. et al. Porphyrin-based metal-organic framework compounds as promising nanomedicines in photodynamic therapy. **ChemMedChem**. v. 15. n. 19, p. 1766-1775, 2020.

ZHANG, A. N. et al. A versatile bacterial membrane-binding chimeric peptide with enhanced photodynamic antimicrobial activity. **Journal of Materials Chemistry B**. v. 7, n. 7, p. 1087-1095, 2019.

ZHANG, Y. et al. Fe-TCPP@CS nanoparticles as photodynamic and photothermal agent for efficient antimicrobial therapy. **Biomaterials Science**. v. 8, n. 23, p. 6526-6532, 2020.