

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

Dariane Jornada Clerici

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE PORFIRINAS
CATIÔNICAS MESO-TETRA (PIRIDIL) CONTENDO CISPLATINA**

Santa Maria, RS
2022

Dariane Jornada Clerici

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE PORFIRINAS
CATIÔNICAS MESO-TETRA (PIRIDIL) CONTENDO CISPLATINA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos
Coorientador: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Santa Maria, RS
2022

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

Clerici, Dariane Jornada
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE PORFIRINAS
CATIÔNICAS MESO-TETRA (PIRIDIL) CONTENDO CISPLATINA /
Dariane Jornada Clerici.- 2022.
98 p.; 30 cm

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

1. Biofilmes 2. Cateter urinário 3. Porfirinas 4.
Proteus mirabilis 5. Terapia fotodinâmica I. Christ
Vianna Santos, Roberto II. Almeida Iglesias, Bernardo
III. Título.

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

Declaro, DARIANE JORNADA CLERICI, 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.

Dariane Jornada Clerici

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE PORFIRINAS
CATIÔNICAS MESO-TETRA (PIRIDIL) CONTENDO CISPLATINA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 29 de setembro de 2022:

**Roberto Christ Vianna Santos, Doutor (UFSM)
(Presidente/ Orientador)**

Leonardo Quintana Lopes, Doutor (CNEC Santo Ângelo)

Michele Rorato Sagrillo, Doutora (UFN)

Patrícia Kolling Marquezan, Doutora (UFSM)

Priscila de Arruda Trindade, Doutora (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

RESUMO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE PORFIRINAS CATIÔNICAS MESO-TETRA (PIRIDIL) CONTENDO CISPLATINA

AUTORA: Dariane Jornada Clerici

ORIENTADOR: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Os biofilmes são responsáveis por até 80% das infecções hospitalares resistentes aos antimicrobianos. Grande parte dessas infecções está associada ao uso de dispositivos médicos como cateteres urinários, e nesse contexto, estima-se que 90-100% dos pacientes que se submetem a cateterismo de longo prazo desenvolvem bacteriúria, sendo *Proteus mirabilis* o microrganismo mais prevalente, apontado como responsável por 20-45% dessas infecções. Tendo em vista o exposto, devido à dificuldade de tratamento dos biofilmes, novas alternativas têm sido testadas diariamente para combater infecções e a terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma estratégia emergente para o tratamento de microrganismos resistentes a antimicrobianos. Essa terapia utiliza um fotossensibilizador e luz com comprimento de onda específico para geração de espécies reativas de oxigênio. Dentre os fotossensibilizadores utilizados, as porfirinas têm sido extensivamente avaliadas, uma vez que já demonstraram ser eficientes contra diversos microrganismos, além da possibilidade de algumas, serem solúveis em água. Deste modo, este trabalho visou avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de porfirinas sobre a cepa ATCC 25933 de *P. mirabilis* e isolados clínicos bem como os efeitos citotóxicos e genotóxicos das mesmas em células mononucleares humanas. As porfirinas 3-H₂TPyP, 4-H₂TPyP, 3-cis-PtTPyP e 4-cis-PtTPyP foram avaliadas em testes de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. Também foram realizadas curvas de viabilidade microbiana, ensaio de checkerboard, teste com sequestradores de espécies reativas de oxigênio e ensaio de formação de biofilme convencional e biofilme com cateteres. Com células mononucleares humanas foram feitos testes a fim de determinar a citotoxicidade e genotoxicidade das porfirinas. Os resultados dos testes de microdiluição demonstraram eficácia maior contra *P. mirabilis*, quando as porfirinas foram expostas a luz de LED branca (370 a 800 nm), o que também ocorreu quando foi realizado o teste de curva de viabilidade microbiana nos tempos 0, 2, 6 e 12h. *P. mirabilis* foi considerada forte formadora de biofilme quando se utilizou caldo Muller Hinton suplementado com 1% de glicose. Nos ensaios de biofilme (convencional e cateter), as porfirinas obtiveram melhores resultados quando irradiadas com luz. No ensaio de checkerboard, ambas porfirinas apresentaram indiferença quando testadas em associação. A partir dos testes de cito e genotoxicidade realizados em células mononucleares humanas, foi possível observar que a porfirina 3-cis-PtTPyP na presença de luz foi a única a apresentar diminuição da viabilidade celular no teste de viabilidade celular. Essa mesma porfirina causou danos ao DNA quando não irradiada com luz. Nenhuma das porfirinas causou aumento de Diclorofluoresceína e de nitrito nos testes realizados. Pode-se concluir a partir dos resultados que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana juntamente com o uso de porfirinas com cisplatina obteve resultados positivos, podendo vir a tornar-se uma alternativa no tratamento de infecções por *P. mirabilis*.

Palavras-chave: Biofilmes. Cateter urinário. Porfirinas. *Proteus mirabilis*. Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF CISPLATIN-CONTAINING MESO-TETRA (PYRIDYL) CATIONIC PORPHYRINS

AUTHOR: Dariane Jornada Clerici

ADVISOR: Roberto Christ Vianna Santos

Biofilms are responsible for up to 80% of antimicrobial-resistant nosocomial infections. Most of these infections are associated with the use of medical devices such as urinary catheters, and in this context, it is estimated that 90-100% of patients who undergo long-term catheterization develop bacteriuria, with *Proteus mirabilis* being the most prevalent microorganism, indicated as responsible for 20-45% of these infections. In view of the above, due to the difficulty of treating biofilms, new alternatives have been tested daily to fight infections and antimicrobial photodynamic therapy is an emerging strategy for the treatment of antimicrobial-resistant microorganisms. This therapy uses a photosensitizer and specific wavelength light to generate reactive oxygen species. Among the photosensitizers used, porphyrins have been extensively evaluated, since they have already been shown to be efficient against several microorganisms, in addition to the possibility that some are soluble in water. Thus, this work aims to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of porphyrins on the ATCC 25933 strain of *P. mirabilis* and clinical isolates, as well as their cytotoxic and genotoxic effects on human mononuclear cells. The porphyrins 3-H₂TPyP, 4-H₂TPyP, 3-cis-PtTPyP e 4-cis-PtTPyP were evaluated in broth microdilution tests to determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. Time-kill assay, checkerboard assay, test with reactive oxygen species scavengers and conventional biofilm formation assay and biofilm with catheters were also performed. Tests were performed with human mononuclear cells in order to determine the cytotoxicity and genotoxicity of porphyrins. The results of the microdilution tests showed greater efficacy against *P. mirabilis* when the porphyrins were exposed to white LED light (370 to 800 nm), which also occurred when the time-kill test was performed at times 0, 2, 6 and 12h. *P. mirabilis* was considered a strong biofilm former when MH broth supplemented with 1% glucose was used. In biofilm assays (conventional and catheter), porphyrins obtained better results when irradiated with light. In the checkerboard assay, both porphyrins showed indifference when administered together. From the cytotoxicity and genotoxicity tests performed on human mononuclear cells, it was possible to observe that the porphyrin 3-cis-PtTPyP in the presence of light was the only one to show a decrease in cell viability in the MTT test. This same porphyrin caused DNA damage when not irradiated with light. None of the porphyrins caused an increase in DCF and nitrite in the tests performed. It can be concluded from the above that aPDT together with the use of porphyrins with cisplatin obtained positive results, and may become an alternative in the treatment of *P. mirabilis* infections.

Keywords: Biofilms. Urinary catheter. Porphyrins. *Proteus mirabilis*. Photodynamic therapy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.2	OBJETIVOS	10
1.2.1	Objetivo Geral	10
1.2.2	Objetivos Específicos	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	11
2.2	BIOFILMES	12
2.2.1	Etapas da formação do biofilme	14
2.2.2	Fatores que influenciam na formação de biofilmes	15
2.3	CATETERES URINÁRIOS.....	16
2.4	BIOFILME CRISTALINO	18
2.5	<i>Proteus mirabilis</i>	20
2.6	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT).....	21
2.7	FOTOSENSIBILIZADORES (FSs).....	26
2.7.1	Porfirinas	27
2.8	CISPLATINA	30
3	METODOLOGIA	34
3.1	MICROORGANISMOS	34
3.2	LOCAIS	34
3.3	PORFIRINAS	34
3.4	FONTE DE LUZ	34
3.5	TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>in vitro</i>	35
3.5.1	Produção do inóculo bacteriano	35
3.5.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	35
3.5.3	Ensaio de viabilidade celular	36
3.5.4	Teste de sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs)	36
3.5.5	Ensaio semiquantitativo de formação de biofilme	37
3.5.6	Ensaio de avaliação de inibição da formação do biofilme em placas de 96 poços.	38
3.5.7	Ensaio de avaliação de destruição do biofilme pré-formado em placas de 96 poços	38

3.5.8	Ensaio de avaliação de inibição de biofilme pré-formado em cateter urinário.....	39
3.5.9	Ensaio de avaliação de destruição de biofilme pré-formado em cateter urinário..	39
3.5.10	Ensaio de Checkerboard	40
3.6	ENSAIOS DE CITO E GENOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	41
3.6.1	Determinação da viabilidade celular (MTT)	41
3.6.2	Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA através do reagente de PicoGreen®	42
3.6.3	Determinação da taxa total de espécies reativas de oxigênio intracelular.....	42
3.6.4	Ensaio de determinação óxido nítrico.....	42
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	ARTIGO 1	44
4.2	ARTIGO 2	44
4.3	TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>in vitro</i>	45
4.3.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	45
4.3.2	Ensaio de viabilidade celular	47
4.3.3	Sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) – possível mecanismo	48
4.3.4	Ensaio semiquantitativo de formação de biofilme	50
4.3.7	Ensaio de avaliação de inibição e destruição de biofilme pré-formado em cateter urinário.....	55
4.3.8	Ensaio de Checkerboard	58
4.4	ENSAIOS DE CITO E GENOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	59
4.4.1	Determinação da viabilidade celular (MTT)	60
4.4.2	Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA através do reagente de PicoGreen®	62
4.4.3	Determinação da taxa total de espécies reativas de oxigênio intracelular.....	64
4.4.4	Ensaio de determinação de óxido nítrico.....	66
5	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS.....	71
	APÊNDICES	88
	ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes são responsáveis por até 80% das infecções hospitalares resistentes aos antimicrobianos. A grande maioria dos microrganismos está associada a infecções relacionadas a dispositivos médicos, como próteses ortopédicas, lentes de contato, válvulas cardiovasculares, cateteres urinários, marca-passos e implantes mamários (STICKLER, 2008; VERGIDIS; PATEL, 2012). Nesta linha, as infecções do trato urinário associadas ao cateter (ITUACs) representam mais de 1 milhão de casos nos EUA e quase 80% das infecções nosocomiais em todo o mundo. Os custos de tratamento anual excedem \$ 350 milhões por ano, o que mostra a urgência da situação (LO; LANG; CHEW, 2014). Segundo Bruschi (2013), 90-100% de pacientes que se submetem a cateterismo de longo prazo desenvolvem bacteriúria e 80% das infecções do trato urinário hospitalares são causadas por cateteres enquanto apenas 5-10% estão relacionados à operação geniturinária.

Dois fatores principais que acometem os cateteres urinários e assim tornam mais difícil o tratamento das ITUAC são a formação de incrustação e biofilme. Uma das bactérias mais comuns que causa a incrustação é a bactéria urease positiva *Proteus mirabilis*. *P. mirabilis* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo e causa 90% de todas as infecções de *Proteus* em seres humanos e 20-45% de infecções relacionadas ao cateterismo (DONLAN, 2001). Este microrganismo produz um biofilme mais abundante do que outras bactérias, chamado de biofilme cristalino, e essas cepas também tendem a persistir por longos períodos de tempo (PEARSON et al., 2008).

Tendo em vista todas as dificuldades envolvidas na prevenção das ITUACs pelo uso de agentes antibacterianos no cuidado diário de pacientes cateterizados, foram realizadas tentativas para evitar a colonização e infecção bacterianas, incorporando agentes antibacterianos aos próprios cateteres. Entretanto os resultados obtidos não foram satisfatórios (FENELEY; KUNIN; STICKLER, 2011). Além disso, diversos fatores de patogenicidade dessa bactéria favorecem a sua participação em processos infecciosos e dentre elas destaca-se a capacidade de motilidade e fixação celular e produção de urease. Os fatores de patogenicidade mencionados estão associados à dificuldade em atingir o sucesso na terapêutica clínica (HACKER; GOEBEL, 1987).

Desse modo, é necessário encontrar alternativas para superar esse problema. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma estratégia emergente para o tratamento de microrganismos resistentes a antimicrobianos. A aPDT é uma técnica seletiva, indolor, menos

invasiva e pode ser focada em vários alvos, garantindo assim a fotodestruição das células alvo sem produzir células fotorresistentes (SANTIN et al., 2014). O efeito antimicrobiano dessa estratégia depende de uma reação oxidativa que ocorre quando as moléculas fotorreativas são expostas a luz em certos comprimentos de onda. Um corante não tóxico ou molécula fotorreativa chamada fotossensibilizador (FS), luz de comprimento de onda adequado e oxigênio molecular são os três principais componentes envolvidos na aPDT de células microbianas. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenha um papel fundamental na aPDT (CIEPLIK et al., 2014).

As vantagens da aPDT despertaram interesse em projetar FSs antimicrobianos eficientes. Um FS eficiente e seletivo deve ser absorvido rapidamente pelas células microbianas, mas deve ter baixa afinidade pelas células humanas (JOSEFSEN; BOYLE, 2012). Entre os FSs empregados para aPDT, as porfirinas têm sido extensivamente avaliadas, principalmente seus derivados catiônicos, pois já foi demonstrado que são FSs eficazes contra microrganismos, incluindo vírus, bactérias e fungos. A ligação de grupos carregados positivamente ao macrociclo aumenta a solubilidade em água da porfirina e melhora sua interação com as estruturas celulares dos microrganismos (DEMINOVA; HAMBLIN, 2005; HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI et al., 2006).

A cisplatina é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados no tratamento de câncer de testículo, ovário, cabeça e pescoço, dentre outros (KELLAND, 2007). No entanto sua utilidade clínica tem sido limitada por graves efeitos colaterais, como nefrotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, ototoxicidade e neurotoxicidade (FREZZA et al., 2010). Assim, estão sendo desenvolvidos análogos da cisplatina, que possuem atividade equivalente e menor toxicidade. As porfirinas com cisplatina incorporada são um exemplo promissor, pois além de terem um aumento de sua atividade frente a células tumorais, ainda possuem uma especificidade a essas células quando irradiadas com luz, o que pressupõe que seriam eficazes em outras aplicações, como na fotoinativação de células microbianas (KRATOCHWIL et al., 1996; MACKAY et al., 2007).

Portanto, é necessário desenvolver novas abordagens para combater infecções por biofilmes, e neste contexto a aPDT tem sido sugerida como uma abordagem alternativa eficiente. Assim, neste trabalho, a ação de porfirinas neutras (3-H₂TPyP e 4-H₂TPyP) e tetra-catiônicas com complexos de cisplatina (3-cis-PtTPyP e 4-cis-PtTPyP) foram avaliadas para verificar a inativação e/ou destruição de biofilmes formados por *P. mirabilis*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de porfirinas catiônicas frente à bactéria *Proteus mirabilis*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a atividade antimicrobiana das porfirinas 3-H₂TPyP, 4-H₂TPyP, 3-cis-PtTPyP e 4-cis-PtTPyP frente à cepa ATCC 25933 e isolados clínicos de *P. mirabilis*;

- Avaliar *in vitro* a cinética da morte de *P. mirabilis* (ATCC 25933) frente as porfirinas pelo ensaio de viabilidade celular;

- Determinar as espécies reativas de oxigênio envolvidas na foto-inativação antimicrobiana;

- Determinar as melhores condições de cultivo para formação de biofilme;

- Avaliar a atividade antibiofilme das porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP em biofilme convencional e com cateteres urinários;

- Determinar o efeito combinado das porfirinas e do antimicrobiano Cloridrato de Ciprofloxacino;

- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade das porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP frente a células mononucleares de sangue periférico humano;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

As doenças causadas por microrganismos, que antigamente eram as principais causas de morte em humanos, foram aparentemente controladas com a descoberta dos agentes antimicrobianos. Entretanto, durante várias décadas, os microrganismos foram adquirindo resistência a cada novo antimicrobiano que foi descoberto, ocasionando um grave problema para a saúde pública mundial (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014).

Os microrganismos podem tornar-se resistentes por meio de mecanismos específicos, dentre eles: produção de enzimas que podem inativar o antimicrobiano, alteração da permeabilidade ou absorção do antimicrobiano, expressão de bombas de efluxo e redução do número ou afinidade aos locais de ligação do antimicrobiano, transferência de plasmídeos (DNA extracromossômico) contendo genes de resistência e finalmente pela formação de biofilmes em superfícies (SINGH et al., 2017; WOOLHOUSE; FARRAR, 2014). Aliado a isto, outros fatores contribuem para o aumento da resistência a antimicrobianos, como: o uso abusivo e inadequado, bem como a prescrição desnecessária de antimicrobianos, gerando um enorme ônus financeiro aos serviços de saúde, além de ser responsável por milhares de mortes por infecções persistentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

Nos EUA, anualmente, aproximadamente 2 milhões de pessoas apresentam infecções associadas a microrganismos resistentes aos antimicrobianos e pelo menos 23 mil indivíduos morrem em decorrência destes processos (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). Estima-se que a taxa de mortalidade no mundo, associada à resistência antimicrobiana, chega a 700.000 mortes, podendo alcançar o número de 10 milhões, em 2050, se nenhuma medida for tomada (O'NEILL, 2016).

Entre os anos de 1983 e 1992, trinta novos antimicrobianos foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), enquanto que entre os anos de 2003 e 2012, foram apenas sete (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014). Desta forma, o aumento da resistência aos antimicrobianos, aliado à escassez de novos agentes, ameaça o tratamento de doenças infecciosas comuns tornando a era pós-antibiótico – quando infecções banais podem causar a morte – cada vez mais próxima. Neste contexto, a melhoria das condições de higiene e de saneamento básico para prevenir e evitar a propagação de infecções, a busca por diagnósticos rápidos para evitar a prescrição desnecessária de antimicrobianos, o uso de vacinas em humanos e animais e o

investimento em novos fármacos são fundamentais para resolver esta problemática (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015; O'NEILL, 2016).

2.2 BIOFILMES

É denominado biofilme o grupo heterogêneo de microrganismos associados à superfície, encapsulados dentro de uma matriz de polímero constituída por exopolissacarídeos, proteínas e DNA. Trata-se de um modo protegido de crescimento que possibilita a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis. Estima-se que mais de 90% dos microrganismos são capazes de viver sob a forma de biofilmes e, em tese, praticamente não existe superfície que não possa ser colonizada por microrganismos (seja ela natural ou sintética) (COSTERTON et al., 1999; HØIBY et al., 2011). A matriz composta por exopolissacarídeos, oferece proteção às células microbianas, dificultando a ação de agentes germicidas e atuando como barreira de filtragem, o que acarretará em uma penetração lenta ou reduzida dos fármacos antimicrobianos. A matriz também protege os microrganismos contra a dessecação, oxidação, radiação ultravioleta, diferentes faixas de pH e sistema imune. A estabilidade mecânica de um biofilme é atribuída à característica viscoelástica da matriz exopolissacarídica (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Através de sua estrutura, o biofilme possui organização favorável referente a captação de substâncias necessárias à sobrevivência, permitindo a circulação de água, oxigênio e nutrientes. Devido à retenção de enzimas extracelulares, um sistema versátil é gerado, onde os nutrientes são captados e dissolvidos a partir da água existente, permitindo que sejam utilizados como fontes de energia (COSTERTON et al., 1999).

Uma única espécie de bactéria ou grupo de microrganismos de múltiplas espécies pode existir dentro de um biofilme. Vários fatores como mecanismos de defesa bacteriana, área adequada para colonização, benefícios relacionados à cooperação comunitária e modo extraordinário de crescimento em seu habitat aceleram a formação de biofilmes (JEFFERSON, 2004).

A formação de biofilme ocorre em muitas etapas e requer um tipo especial de sinalização, conhecido como *quorum sensing* (QS), entre as células do microrganismo. Este modo de organização pode ser entendido como um “sentido de grupo” ou seja, as células dentro da estrutura do biofilme, se comunicam entre si por meio de moléculas químicas exibindo um modo de vida organizado onde se estabelecem atividades coordenadas (DONLAN, 2001). Esse

comportamento somente é percebido quando os microrganismos atingem uma determinada densidade populacional limitante, do contrário, se comportam como simples organismos celulares (BHARDWAJ et al., 2013). Além disso, requer transcrição de diferentes conjuntos de genes em comparação com as formas planctônicas dos mesmos organismos microbianos (DONLAN, 2002; SHAW et al., 2004). Os biofilmes bacterianos coordenam o seu metabolismo e a produção estrutural de exopolissacarídeos através de sinais do QS, que também induzem o desprendimento de bactérias de biofilmes para posterior propagação. A adesão inicial das células planctônicas às superfícies nos estágios iniciais da formação do biofilme é afetada por sinais de estresse, que geralmente são parte do sistema QS. A produção e detecção simultânea desses sinais resulta na coordenação da expressão gênica dentro de uma população bacteriana, levando a uma regulação fisiológica, que inclui a produção de espécies químicas e fatores de crescimento. Além de regular a produção de substâncias químicas, como fatores de virulência e resistência a antimicrobianos, a coordenação da expressão gênica é uma das principais influências na formação de biofilmes por bactérias (POPAT et al., 2015; WATERS; BRASSLER, 2015).

Os biofilmes são responsáveis por até 80% das infecções hospitalares resistentes aos antimicrobianos. A persistência da infecção é caracterizada por uma grande resposta inflamatória local e pela resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos antimicrobianos. A grande maioria dos microrganismos está associada a infecções relacionadas a dispositivos médicos, como próteses ortopédicas, lentes de contato, válvulas cardiovasculares, cateteres urinários, marca-passos e implantes mamários. As bactérias do biofilme podem ser até 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos em comparação com bactérias planctônicas. Isso indica que os mecanismos envolvidos na resistência de biofilmes aos antimicrobianos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência em células planctônicas (STICKLER, 2008; VERGIDIS; PATEL, 2012; TRENTIN et al., 2013).

Com o aumento da expectativa de vida humana, a utilização de implantes biomédicos é uma necessidade crescente, uma vez que esses dispositivos são úteis no reparo e na manutenção de funções biológicas. Estima-se que a indústria de biomateriais movimente aproximadamente 28 bilhões de dólares todos os anos e, independentemente da tecnologia empregada nesses materiais, todos são suscetíveis à colonização microbiana e formação de biofilmes, devido, principalmente, ao déficit imunológico que ocorre na interface implante-hospedeiro (HOLZAPFEL et al., 2013).

Assim, associou-se à formação de biofilme em tubos endotraqueais ao desenvolvimento de pneumonia associada à ventilação, que ocorre em 9-27% dos pacientes intubados (HØIBY et al., 2014). Em pacientes utilizando cateteres urinários permanentes, mais de 50% são colonizados nos primeiros 10-14 dias de inserção. Os cateteres intravasculares estão associados a riscos elevados de infecção, tanto da pele, no local de inserção, quanto do ponto de vista da sepse, sendo que 60% acabam relacionados com a formação de biofilmes (STICKLER, 2008).

A dificuldade no tratamento de infecções relacionadas aos biofilmes em dispositivos médicos tem impacto direto sobre desfecho clínico, ocasionando maior tempo de internação e custos elevados com medicações. Muitas vezes, a retirada ou troca do dispositivo tem um gasto menor que o tratamento da infecção, sendo este, por conseguinte, o principal manejo realizado atualmente (TRENTIN et al., 2013).

2.2.1 Etapas da formação do biofilme

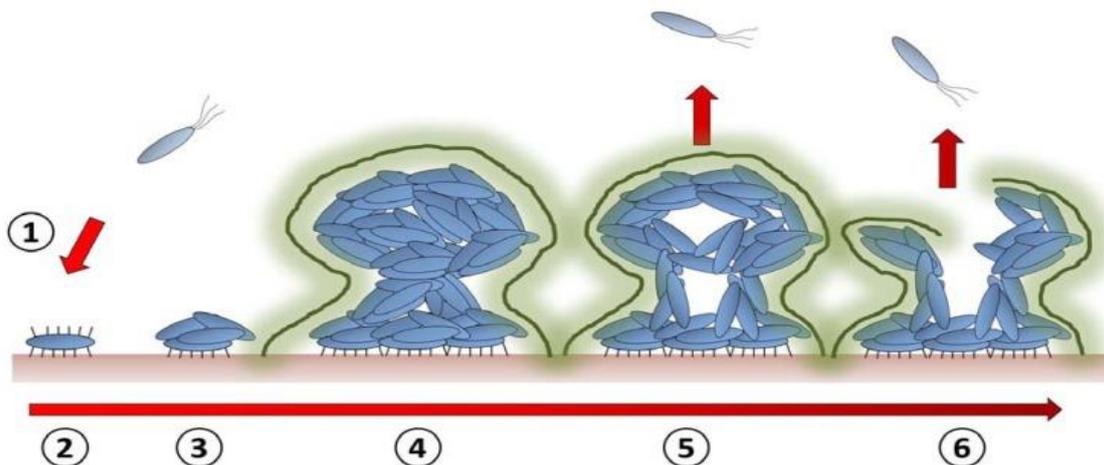
A formação do biofilme (Figura 1) acontece em quatro estágios e tem como característica principal da primeira etapa a aproximação dos microrganismos a superfície, chamada de adesão. A adesão ocorre com auxílio de estruturas denominadas fímbrias e flagelos presentes na superfície celular que possuem função locomotora, conferindo a motilidade necessária para os microrganismos chegarem à base da estrutura do biofilme. Além disso, nas etapas iniciais de adesão, a comunicação entre os microrganismos (QS) desempenha sua função sinalizadora. A adesão do biofilme acontece devido a vários tipos de força que atuam entre a superfície inerte e a célula viva como forças de atração de van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (CARPENTIER; CERF, 1993).

Com a acumulação de nutrientes essenciais aos microrganismos, as células primárias se reproduzem e dão origem a pequenas colônias, que tem a capacidade de atrair e agregar outros microrganismos, denominados secundários, que se aderem aos primários estabelecendo o biofilme. Nesta fase, o biofilme torna-se irreversível se não ocorrer uma remoção mecânica ou química (BONEZ, 2014; MICHELE MIGUEL et al., 2014).

Após a fase irreversível, acontece um aumento na densidade populacional e componentes extracelulares gerados nessa estrutura são depositados, iniciando a maturação do complexo formado, caracterizando-se por sua viscoelasticidade e aspecto gelatinoso. Com o amadurecimento do biofilme a massa que se formou pode se desprender e liberar os microrganismos que irão migrar e colonizar outras superfícies, processo esse que ocorre

repetidamente e de forma bastante acelerada, colaborando para a disseminação dos microrganismos (BONEZ, 2014; CARPENTIER; CERF, 1993).

Figura 1 – Representação das etapas de formação do biofilme



(1) Os microrganismos livres (2) Aderência reversível a superfície (3) Os microrganismos começam a se dividir e formam microcolônias (4) À medida que essas colônias crescem, elas serão encapsuladas através da secreção de uma mistura complexa de carboidratos, proteínas e lipídios (5) Biofilme em sua maturidade com arquitetura complexa (6) Rompimento do amontoado de células, liberando células planctônicas que poderão se disseminar e encontrar um novo habitat. Fonte: Adaptado de Garnett e Matthews, 2012.

2.2.2 Fatores que influenciam na formação de biofilmes

Um grande número de fatores contribui para a adesão de um microrganismo à determinada superfície. Dentre eles, incluem-se as características dos microrganismos - como espécie, concentração, capacidade de produção de exopolissacarídeos, hidrofobicidade, presença de flagelos e pili, as características do material aderente, como porosidade e aspereza, além de elementos como pH, temperatura, pressão e oxigênio (O'TOOLE; KOLTER, 1998; STEWART; COSTERTON, 2001).

A hidrofobicidade da superfície dos microrganismos é um fator que contribui para a sua aderência e colonização de superfícies, sejam inertes ou vivas. Em isolados de *Staphylococcus aureus*, provenientes de cárie dentária, verificou-se que a maioria dos isolados apresentou comportamento hidrofílico, porém, os isolados considerados altamente hidrofóbicos, foram os

que demonstraram maior capacidade de formar biofilmes em placas de poliestireno (KOUIDHI et al., 2010). Especula-se que as interações hidrofóbicas entre microrganismo e superfície diminuem as forças repulsivas e facilitam a adesão microbiana (GUPTA et al., 2015).

A composição química e a hidrofobicidade dos diferentes tipos de materiais utilizados na fabricação dos dispositivos médicos podem influenciar na adesão microbiana. De acordo com Darouiche (2001), o cloreto de polivinila (PVC) e o polietileno (PE) estão entre os materiais mais propensos à adesão microbiana. Além disso, superfícies irregulares e texturizadas favorecem ainda mais a adesão microbiana.

A presença de flagelos e/ou pili facilita a adesão dos microrganismos à superfície e, por conseguinte, a formação do biofilme. A motilidade pode ser necessária para permitir que o microrganismo alcance uma determinada superfície e também para que estes se movam dentro do biofilme maduro, fazendo com que haja a propagação e crescimento do mesmo. Do mesmo modo, a motilidade está envolvida na libertação das células microbianas a partir do biofilme maduro, facilitando a sua fragmentação e dispersão (VERSTRAETEN et al., 2008).

Determinadas condições ambientais e nutricionais como variações de pH, temperatura, meio de cultura e adição de íons e minerais, afetam significativamente a formação de biofilmes por alguns microrganismos. *Citrobacter werkmanii*, por exemplo, tem o seu crescimento planctônico em amplas faixas de pH, em contrapartida, a formação de biofilme é maior em valores de pH mais baixos (ZHOU et al., 2013). Dentre os demais microrganismos, contudo, a maioria é capaz de desenvolver biofilme somente em faixas neutras de pH (MACHADO, 2005).

Verifica-se também, que um aumento na concentração de cátions como sódio, cálcio e íons férrico afetam a fixação de *Pseudomonas fluorescens*, reduzindo as forças de repulsão entre a célula e a superfície, facilitando a formação de biofilme (KOKARE et al., 2009).

2.3 CATETERES URINÁRIOS

Os cateteres urinários são utilizados desde o século III a.C, pelos gregos, egípcios e chineses, mas o primeiro cateter urinário maleável foi apenas confeccionado em 1779 por um ourives. Os cateteres urinários são usados para conter a incontinência urinária, a retenção urinária e/ou após procedimentos prostáticos ou cirúrgicos genitais. Em termos simples, os cateteres urinários são utilizados para remover a urina do organismo (NACEY; DELAHIJNT, 1993).

Existem vários tipos de cateter que atendem a propósitos diferentes. O preservativo ou o cateter de uso único é usado para homens com deficiências mentais e que possam ter problemas para urinar. Estes tipos de cateteres são trocados diariamente. O cateter de uso intermitente ou de curto prazo é usado por algumas semanas. Este é comumente utilizado para cuidados pós-operatórios, quando o paciente não consegue urinar sozinho e precisa de assistência. O uso de cateteres de longo prazo ou de *Foley* são tipicamente usados por vários meses por pacientes com problemas de retenção urinária, incluindo aqueles com lesão/doença da medula espinhal, esclerose múltipla, próstata aumentada ou acidente vascular cerebral (FINK et al., 2012).

Apesar dos cuidados tomados a fim de evitar contaminação e infecções, os cateteres ainda são suscetíveis à acumulação de microrganismos. Nos cateteres urinários, os microrganismos podem se acumular para formar biofilmes de uma única espécie, que podem abranger até mesmo cateteres não-*Foley* de curto prazo em períodos menores que 24 horas, o que pode, em última instância, desenvolver biofilmes de múltiplas espécies causando infecções se não for detectado em estágio inicial. A infecção ocorre em 10-50% dos pacientes submetidos a cateter não-*Foley* ou cateterismo urinário de curto prazo (7 dias), mas praticamente todos os pacientes submetidos a *Foley* ou cateterismo de longo prazo (>28 dias) ficam infectados. Esta infecção é chamada de ITUAC, uma infecção que estimulou a pesquisa de materiais antimicrobianos para cateteres urinários (DONLAN, 2001).

Dois fatores relacionados aos cateteres urinários que tornam mais difícil o tratamento das ITUACs são a formação de incrustação e biofilme. Embora sejam dois mecanismos distintos causados por fatores diferentes, eles podem sobrepor-se e piorar as condições de uma infecção. *Proteus mirabilis* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo e causa 90% de todas as infecções de *Proteus* em seres humanos e 20-45% de infecções relacionadas ao cateterismo. Apesar de haver um esforço dos pesquisadores em encontrar técnicas e métodos para resolver o problema das infecções causadas por cateteres urinários, a maioria das abordagens falha devido aos crescentes problemas associados à resistência microbiana (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012).

Alguns estudos buscaram maneiras de impedir a fixação bacteriana e a subsequente formação de incrustações. Isso inclui o uso de compostos antibacterianos, como a incorporação de prata (DEVENPORT; KEELEY, 2005). No entanto, Pickard e colaboradores (2012) mostraram como o uso de cateteres impregnados com prata não reduziu a prevalência de ITUACs bem como, não encontrou efeito nos bloqueios dos cateteres. Abordagens alternativas

incluem incorporação de nitrofurazona, correntes elétricas, revestimentos de hidrogel e modulação do pH da urina para impedir a formação de cristais. No entanto, apesar dessas soluções variadas, o problema da formação e persistência do biofilme permanece (GABI et al., 2011; MORGAN; RIGBY; STICKLER, 2009; STICKLER; MORGAN, 2006).

2.4 BIOFILME CRISTALINO

O tratamento de muitos pacientes submetidos à cateterização da bexiga por um longo período é complicado quando o fluxo de urina através do cateter é bloqueado por incrustação. O problema resulta da infecção por bactérias produtoras de urease. Estes organismos colonizam cateteres e produzem biofilmes bacterianos extensivos (MORRIS; STICKLER; MCLEAN, 1999).

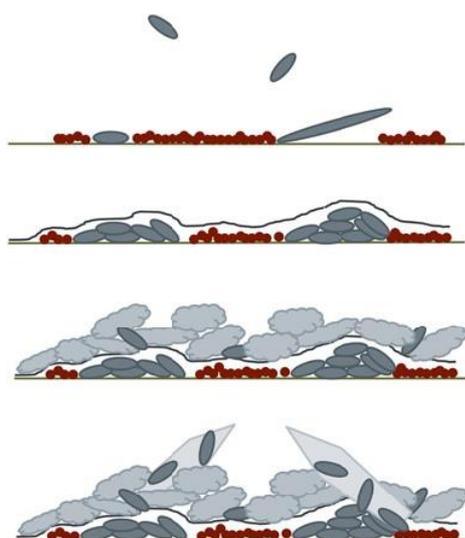
Todos os tipos de cateteres parecem ser vulneráveis à incrustação e atualmente não existem métodos eficazes disponíveis para controlar o problema. Há fortes evidências epidemiológicas e experimentais de que a produção de urease responsável pela maior parte da incrustação do cateter é causada principalmente por *P. mirabilis* (MOBLEY; WARREN, 1987). A enzima urease hidrolisa a ureia em amônia, elevando o pH da urina, favorecendo a adesão microbiana e conseqüentemente o biofilme. Sob às condições alcalinas resultante dessa hidrólise, formam-se cristais de fosfatos de cálcio e magnésio na urina e desenvolve-se um biofilme cristalino (Figura 2) no cateter. Este material pode bloquear o lúmen do cateter, evitando o fluxo de urina da bexiga e causando retenção urinária. O refluxo de urina infectada para os rins pode precipitar sérios episódios sintomáticos como pielonefrite, sepse e choque endotóxico (STICKLER et al., 1993).

Os biofilmes em cateter são caracterizados por conter níveis elevados de depósitos minerais. A capacidade de *P. mirabilis* para colonizar todos os tipos disponíveis de cateteres internos permite que ele forme biofilmes seguros no trato cateterizado e provoque bloqueio persistente do cateter. A infecção pode ser diagnosticada por um aumento no pH da urina e odor de peixe (produzido pela bactéria). As comunidades de biofilmes desenvolvem-se em poucas horas. A taxa de ligação das células bacterianas depende do número e tipos de bactérias na urina ou ambiente ao qual o cateter está exposto, a taxa de fluxo do líquido através do cateter e as características físico-químicas da superfície do cateter (BRISSET et al., 1996; TRAUTNER; DAROUICHE, 2004).

Um grande obstáculo no ataque e na eliminação desses biofilmes é a substância polimérica extracelular que protege as células, o que permite que o biofilme exiba alta tolerância aos antimicrobianos e outros tratamentos bactericidas. A tolerância de um biofilme aos antimicrobianos foi atribuída a três possíveis características do biofilme: penetração lenta de fármacos devido à matriz formada pelos exopolissacarídeos; formação de um fenótipo resistente chamado células persistentes que permanecem em estado latente transiente e podem causar infecções recorrentes; um ambiente alterado dentro do biofilme que é constituído por diferentes nichos anaeróbicos, gradientes de concentração e acumulação local de ácidos e resíduos inibidores (LEWIS, 2007; LYNCH; ROBERTSON, 2008).

O tratamento das ITUACs é desafiador. Antimicrobianos como ciprofloxacino e ampicilina são os agentes terapêuticos comumente recomendados para infecções do trato urinário, entretanto, os biofilmes cristalinos são geralmente resistentes a esses antimicrobianos. Como resultado, muitos pacientes sofrem infecções recorrentes resultando em biofilme e incrustação e bloqueio do cateter. Terapias alternativas, incluindo irrigação com soluções contendo antimicrobianos e o uso de cateteres impregnados com antimicrobianos, também mostram eficácia limitada na prevenção do crescimento de biofilme e precipitação mineral resultante (FLORES-MIRELES et al., 2015).

Figura 2 - Representação esquemática dos quatro estágios de desenvolvimento do biofilme cristalino por *P. mirabilis*



ESTÁGIO 1: Ligação de células individuais circundadas por uma camada basal de polissacarídeos

ESTÁGIO 2: Formação de uma folha microcristalina acima da camada basal

ESTÁGIO 3: Acumulação de grandes quantidades de material cristalino difuso

ESTÁGIO 4: Estruvas bem definidas são encontradas embutidas no material cristalino difuso com bactérias que surgem sobre sua superfície

Fonte: Adaptado de Wilks, Fader e Keevil, 2015.

2.5 *Proteus mirabilis*

P. mirabilis é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bacilo, móvel, urease-positiva, lactose-negativa, indol-negativa, produtora de sulfeto de hidrogênio e pertencente à família *Enterobacteriaceae* (MOBLEY; BELAS, 1995). Diferente dos outros membros dessa família, este microrganismo não é um causador comum das infecções do trato urinário (ITUs) em indivíduos “saudáveis” (PEARSON et al., 2008). Ao contrário, *P. mirabilis* é isolado com relativa frequência em ITUs complicadas, como em pacientes com anormalidades funcionais ou anatômicas, especialmente pacientes com urolitíase ou que fazem uso de cateter urinário permanente. Quanto mais tempo o cateter estiver no local, no entanto, maior a probabilidade de ele ser encontrado na urina. Em pacientes submetidos a cateterismo prolongado, *P. mirabilis* foi isolado em cerca de 40% das amostras de urina (MOBLEY, 1996).

Do mesmo modo, é a terceira causa mais comum de infecções do trato urinário (ITU) complicada (12%) e a segunda causa mais comum de bacteriúria associada ao cateter em pacientes cateterizados a longo prazo (15%), sendo associado à elevada taxa de mortalidade (50%) em pacientes geriátricos. Em 2006, as ITUs nos Estados Unidos foram a causa de 11 milhões de consultas médicas e custaram 3,5 bilhões de dólares. Em ITUACs, geram um custo que varia de 43 milhões a 256 milhões de dólares anualmente no mesmo país (NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010).

As ITUs causadas por *P. mirabilis* são agravadas pela formação de biofilmes associados ao cateter, ou comunidades multicelulares que estão rodeadas por uma matriz de macromoléculas, como polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. A maioria dos pacientes cateterizados a longo prazo que sofrem de incrustação de cateter provavelmente adquirem *P. mirabilis* de sua própria microbiota fecal. Essas cepas acabarão causando colonização crônica da urina, cateteres e pedras na bexiga (STICKLER, 2014).

P. mirabilis é suscetível a β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e trimetoprima/sulfametoxazol, mas é resistente à nitrofurantoína e à tetraciclina. Nos últimos anos, observou-se uma tendência no aumento da resistência aos antimicrobianos nas espécies de *Enterobacteriaceae*, incluindo *P. mirabilis*. Esta resistência aumentada aos agentes antimicrobianos conduziu não apenas a mudanças nas terapias antimicrobianas, mas também aos fracos prognósticos e ao aumento da taxa de mortalidade de pacientes hospitalizados (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2006; LOCKART et al., 2007).

Diversos fatores de patogenicidade, ou seja, características biológicas de *Proteus* que favorecem a sua participação em processos infecciosos têm sido identificados, tais como: a capacidade de motilidade e fixação celular, produção de protease, urease e hemolisina. Os fatores de patogenicidade mencionados com a presença de fímbrias, flagelos, enzimas e toxinas aparentam atuar em conjunto, justificando a dificuldade em atingir o sucesso na terapêutica clínica (HACKER; GOEBEL, 1987; PEARSON et al., 2008). Os dois fatores que melhor estão descritos e investigados são urease e o fator ligado ao flagelo, mas os outros fatores como hemolisinas, aderência e proteases são igualmente importantes (JONES et al., 2005; ZHAO et al., 1999).

2.6 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)

No início do século XX, o potencial da aPDT como terapia antimicrobiana foi revelado quando Moan e Peng (2003) estudaram a eficiência da alaranjado de acridina na morte de *Paramecium* na presença de luz. A aPDT é uma estratégia emergente para o tratamento de microrganismos resistentes a antimicrobianos. Essa técnica é seletiva, indolor, menos invasiva e pode ser focada em vários alvos, garantindo assim a foto destruição das células alvo sem produzir células foto resistentes. A sensibilidade das bactérias a aPDT pode ser modulada pelo tamanho do FS, sua lipofilicidade e/ou presença de um íon metálico central (SANTIN et al., 2014).

O efeito antimicrobiano dessa estratégia se baseia em uma reação oxidativa que ocorre quando moléculas foto reativas são expostas a luz em certos comprimentos de onda. Um corante não tóxico ou molécula foto reativa chamada fotossensibilizador (FS), luz de comprimento de onda adequado e oxigênio molecular são os três principais componentes envolvidos na inativação fotodinâmica de células microbianas (CIEPLIK et al., 2014).

A aPDT provou ser eficiente contra vírus, bactérias, fungos e parasitas, embora com eficiência diferente e, portanto, exigindo protocolos de foto-inativação e FSs adequados. A estrutura e composição do revestimento celular é um dos principais determinantes da suscetibilidade ao aPDT. De fato, os endósporos bacterianos são menos suscetíveis a aPDT do que as células vegetativas e bactérias Gram-positivas, apresentando uma parede celular menos estruturada, são mais facilmente inativadas pelo FS neutro ou carregado. As bactérias Gram-negativas, por terem uma membrana externa, são menos propensas a danos fotodinâmicos. A aPDT de bactérias Gram-negativas requer um FS catiônico ou o uso combinado de destruidores

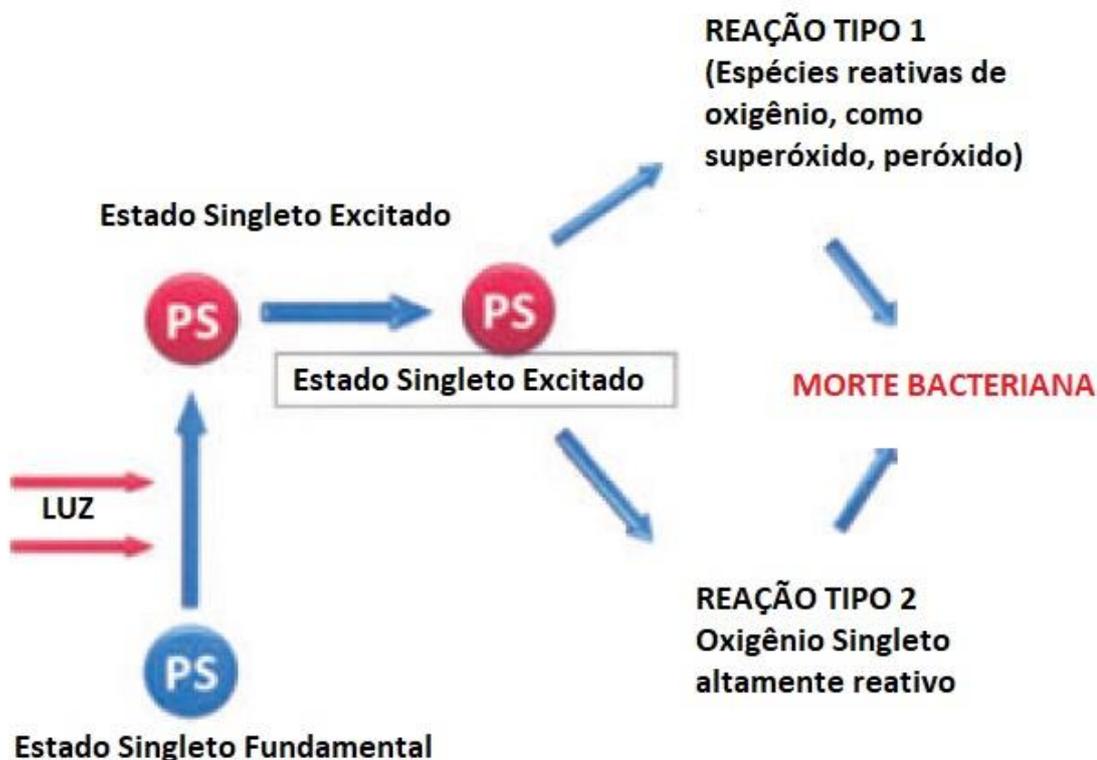
de membrana, como polilisinas, polimixina B não peptídica ou EDTA (JORI; BROWN, 2004; KE et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2009).

Existem dois mecanismos principais da reação fotodinâmica (Figura 3). Ambos são intimamente dependentes das moléculas de oxigênio dentro das células. O primeiro estágio de ambos os mecanismos é semelhante. Um FS, após entrar na célula, é irradiado com um comprimento de onda de luz que coincide com o espectro de absorção do FS e é convertido do estado singlete básico de energia S_0 ao estado singlete excitado S_1 por causa da absorção de fótons. Parte da energia é irradiada na forma de um *quantum* de fluorescência, e a energia restante direciona uma molécula de FS para o estado tripleto excitado T_1 - a forma terapêutica adequada do composto. Então, a geração de EROs pode ocorrer de duas maneiras (CASTANO et al., 2004).

No tipo I, no estado excitado T_1 , o FS pode transferir elétrons para as biomoléculas de seus arredores. Entre o FS no estado T_1 e substrato, um hidrogênio ou elétron é transferido, o que leva à formação de espécies radicalares do FS e do substrato. A molécula de oxigênio sofre um processo redox, que permanecem em seu estado energético básico. Esse processo leva à produção de EROs, que normalmente são radicais do tipo superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (HO^{\bullet}), hidroperóxil (HOO^{\bullet}) e moléculas neutras de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e cria uma geração adicional de EROs no interior das células. A cascata de reações iniciada leva ao estresse oxidativo, resultando na destruição das bactérias (LUKSIENE, 2003; NOWAK et al., 2013).

No Tipo II, como resultado da transição do FS para o estado excitado tripleto, a energia é transferida diretamente para a molécula de oxigênio no estado energético básico (o estado tripleto básico). A transferência direta de energia entre moléculas (FS – O_2) é possível porque elas têm inversão de *spins*. Dessa maneira, partículas de oxigênio excitadas - o chamado oxigênio singlete (1O_2) - são geradas, caracterizadas por propriedades oxidantes extremamente fortes. A maioria dos compostos orgânicos está no estado singlete básico. No entanto, as moléculas de oxigênio são caracterizadas por seu estado tripleto (como base) e excitação no singlete. Devido a esse fato, as partículas estimuladas do FS não danificam as estruturas celulares orgânicas e reagem apenas com moléculas de oxigênio dissolvidas no citoplasma. Supõe-se que o mecanismo do tipo II seja o processo mais importante que condiciona a eficiência da aPDT. No entanto, a proporção da contribuição de ambos os mecanismos depende de muitos fatores, incluindo: concentração de oxigênio, constante dielétrica no local de infecção, pH e estrutura do FS. À medida que o oxigênio se esgota, o primeiro tipo de mecanismo começa a prevalecer (FONSECA et al., 2006; JUZENIENE; MOAN, 2007).

Figura 3 – Representação esquemática dos dois principais mecanismos de reação fotodinâmica



Fonte: Adaptado de Raghavendra, Koregol e Bhola 2009.

Acredita-se que os danos ocorrem principalmente no nível dos constituintes da membrana citoplasmática e da parede celular (fotolesão múltipla) e que os ácidos nucleicos não são o alvo principal ou determinante da aPDT, porque a foto-clivagem de DNA é observada quando as células já estão em grande parte foto-inativadas ou não mais viáveis. Essa afirmação é baseada em estudos com cepas bacterianas facilmente foto-inativadas, defeituosas nos mecanismos de reparo do DNA ou que possuem sistemas de reparo do DNA muito eficientes (BERTOLINI et al., 2000; NITZAN et al., 2001; CAMINOS et al., 2008).

Algumas vantagens da aPDT são: (1) apresenta amplo espectro, sendo eficaz para uma ampla gama de alvos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e até vírus inativos; (2) Possui pouca possibilidade de desenvolver espécies foto resistentes mesmo após múltiplas exposições a terapia; (3) Poderíamos ter como alvo uma aPDT com seletividade para patógenos, a fim de evitar efeitos colaterais nos tecidos do hospedeiro; (4) Possui menor chance de induzir efeito mutagênico; (5) A aPDT é mais rápida que a antibioticoterapia, exigindo apenas alguns minutos para matar os patógenos, o que contrasta

com os antibióticos que podem levar dias ou até semanas para obter efeitos máximos; (6) Estudos relataram que a aPDT pode ser eficaz em infecções por biofilme, onde os antimicrobianos geralmente são ineficazes; (7) aPDT é acessível e de baixo custo (SHARMA et al., 2011).

Outra vantagem da aPDT é a via de administração do FS, que pode ser aplicado topicamente ou localmente na área infectada, o que é crucial para erradicação do biofilme. Biofilmes de várias espécies que crescem tanto em superfícies plásticas quanto naturais foram tratados com aPDT empregando uma ampla gama de FSs, alcançando resultados que variam na redução de menos de 1 log de unidades formadoras de colônias (UFC) a 5 logs. Também, muitas infecções crônicas envolvem um acúmulo de biofilmes microbianos, nos quais os antibióticos administrados sistemicamente não conseguem penetrar. Vários relatórios demonstram a aPDT como procedimento bem-sucedido na morte de células cultivadas por biofilme *in vitro e in vivo* (FREITAS et al., 2017; MAMONE et al., 2016; WANG et al., 2016). No entanto, no aspecto da aPDT relacionado ao biofilme, a capacidade de destruir fatores de virulência secretados também pode ser necessária. Poucos estudos foram realizados empregando porfirinas para o tratamento fotodinâmico de infecções por biofilme. Um trabalho empregando a porfirina tetrametilada TMPyP induziu a redução de 1 a 2 vezes de *Staphylococcus aureus* (DI POTO et al., 2009) e 4 vezes nos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (COLLINS et al., 2010).

A aPDT também tem sido utilizada em infecções superficiais, nas quais o FS é aplicado topicamente por injeção ou na forma de aerossol. Este método é comumente utilizado em dermatologia para a terapia de *Acne vulgaris* e *Acne rosacea* no qual o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seu derivado de metila (MAL) são usados como FSs. Além disso, a aPDT é eficaz em infecções específicas observadas no estômago ou na cavidade oral. O tratamento de infecções estomacais por *Helicobacter pylori* com antimicrobianos e inibidores da bomba de prótons foi significativamente limitado devido ao número crescente de cepas de bactérias resistentes. Portanto, a aPDT se tornou uma alternativa atraente. Na odontologia, a aPDT tem sido utilizado para o tratamento de infecções bacterianas que causam doenças periodontais, inflamação da membrana mucosa peri-implantar, inflamações da polpa dentária e tecidos periféricos. Além disso, essa terapia pode ser utilizada no tratamento de infecções virais (HPV - papilomavírus humano), infecções parasitárias como leishmaniose e infecções por fungos (CHOI; LEE; CHAE, 2010; GARCÍA-MORALES et al., 2010; HAEDERSDAL et al., 2008; LEMBO et al., 2009; ONISZCZUK et al., 2016; ROSE; STABLES, 2008; WILDER-SMITH et al., 2002).

As paredes celulares das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas são distintas e as diferenças na porosidade e composição da estrutura da parede celular nas espécies de microrganismos afetam fortemente o resultado da aPDT. As bactérias Gram-negativas são mais resistentes à aPDT realizada com FSs comumente usados, que por sua vez são eficazes na inativação de espécies Gram-positivas. Normalmente, o FS contendo uma carga positiva ou adição de agentes que aumentam a permeabilidade da membrana externa aumenta notavelmente a eficácia da inativação de bactérias Gram-negativas. Esses efeitos dependentes de carga estão associados à presença de uma intrincada membrana externa ao lado da fina camada de peptidoglicano, que cria uma barreira impermeável aos agentes antimicrobianos. A membrana externa consiste em glicolipídios na camada externa (lipopolissacarídeos) e várias lipoproteínas, proteínas cilíndricas, ácidos lipoteicoicos em uma bicamada fosfolipídica na camada interna que ancora esses constituintes e a camada peptidoglicana. Nas bactérias Gram-positivas, formadas apenas por uma espessa camada de peptidoglicano, as proteínas de superfície (fibronectina, fibrinogênio, elastina) são ligadas ao peptidoglicano com ácidos teicóicos ou para ancorar peptídeos nas camadas de peptidoglicano (ALVES et al., 2009; HAMBLIN; HASAN, 2004).

Existem vários fatores que podem afetar a suscetibilidade de bactérias a aPDT. Muitos deles são derivados da capacidade das bactérias de desenvolver vários mecanismos para evitar o estresse oxidativo induzido fotodinamicamente. Os microrganismos são caracterizados por um sistema protetor contendo enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), que desempenham um papel crucial na defesa contra EROs. A super expressão de SOD é mencionada como componente predominante na estratégia de sobrevivência de bactérias virulentas. Como uma estratégia adicional contra as EROs, também existem várias atividades antioxidantes não enzimáticas. Portanto, quando o estresse oxidativo surge como consequência da aPDT, um sistema de defesa promove a regulação e expressão dessas enzimas (ALVES et al., 2015; BARTOLOMEU et al., 2016).

A aPDT deve ser geralmente usada em doses letais para matar os microrganismos, no entanto, é provável que em hospedeiros humanos que recebem essa terapia, qualquer microrganismo viável no local da infecção possa ser exposto a doses sub-letais. Nessa situação, essa dose não resultaria em morte celular total e os sobreviventes se exporiam ao estresse por EROs. A exposição a baixos níveis de estresse ativa mecanismos de proteção por meio de uma via complexa, envolvendo vários reguladores, para evitar a morte celular, o que poderia gerar resistência (GAMBINO; CAPPITELLI, 2016).

2.7 FOTOSSENSIBILIZADORES (FSs)

Um dos três elementos cruciais da aPDT, além de luz e oxigênio, é a presença de FSs. Esses corantes são definidos como substâncias capazes de absorver luz com um comprimento de onda específico, desencadeando reações fotoquímicas ou fotofísicas. Algumas características e condições podem definir um FS ideal, como: processo de síntese adequado com alta pureza química; alto coeficiente de extinção molar na região do visível; um alto rendimento quântico na formação de tripleto (T) para produzir eficientemente EROs; foto estabilidade suficiente para realizar a terapia de forma eficaz; baixa tendência a agregar em meios biológicos; localização e incorporação seletiva em células microbianas e toxicidade mínima na ausência de luz (BOYLE; ROCHFORD; PRYCE, 2010; HAMBLIN, 2016).

Após a excitação do FS com radiação de comprimento de onda específico, EROs são geradas e, em seguida, envolvidas em reações citotóxicas, levando à destruição de bactérias. O termo "antimicrobiano" foi regulamentado pela Sociedade Americana de Microbiologia e Administração de Alimentos e Medicamentos (em inglês, FDA) como uma redução do crescimento microbiano de pelo menos 3 log de UFC. Por outro lado, Jori e colaboradores (2006) descreveram o FS como eficiente quando reduz o crescimento bacteriano em cerca de 4 logs (SPAETH et al., 2017; VERA et al., 2012).

É essencial escolher o FS adequado, pois a eficácia da aPDT depende significativamente da capacidade de permeação tecidual, interação com a parede celular bacteriana e geração de EROs. A eficácia desse método em relação às bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas é determinada principalmente pela estrutura química e pela carga elétrica da molécula de FS. Outro fator determinante é o fato de as bactérias encontrarem-se em suspensão ou na forma de biofilme (MARTINEZ et al., 2017; NAGATA et al., 2012).

As moléculas de FS escolhidas se ligam à superfície da célula microbiana, na maioria das vezes à membrana citoplasmática, para que a aPDT possa ocorrer. Assim, a eficiência de conexão do FS tem uma grande influência na eficiência da aPDT. Considerando as diferenças arquiteturais na estrutura da superfície celular, diferentes células microbianas mostram diferentes suscetibilidades à aPDT, dependendo da estrutura química do FS. Em geral, as bactérias Gram-positivas e leveduras são facilmente afetadas pelo FS neutro e aniônico, enquanto as bactérias Gram-negativas não, porque essas espécies possuem uma membrana externa assimétrica adicional contendo numerosas moléculas fortemente carregadas negativamente, como o lipopolissacarídeo. Essa membrana externa reduz a permeabilidade e

enfraquece a ligação do FS neutro ou repele o FS aniônico. Para superar a desvantagem, várias estratégias foram desenvolvidas, como a síntese de FS com carga positiva, o acoplamento de FS a outras moléculas com carga positiva, como a polietilenimina, ou o pré-tratamento de células bacterianas com Tris-EDTA ou polimixina B (GEORGE et al., 2009; NITZAN et al., 1992).

Entre as estruturas de FS comumente empregadas na aPDT, o alaranjado de acridina foi a primeira a ser utilizada, e destacam-se ainda os macrociclos tetrapirrólicos, como porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas sintéticas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). A descoberta de FSs naturais, bem como o desenvolvimento de novos sintéticos, é um ponto chave no sucesso do tratamento de infecções, especialmente aquelas causadas por biofilmes. Corantes de fenotiazínico, porfirinas, cloro, corantes de xanteno, produtos naturais como curcumina, derivados de bacterioclorofila e fulerenos funcionalizados estão entre os agentes mais amplamente utilizados na foto-inativação de bactérias planctônicas e biofilme. Até o momento, 400 compostos são conhecidos como FSs. A maioria deles é usada em medicamentos, cosméticos, produtos químicos (CIEPLIK et al., 2013; DEMINOVA; HAMBLIN, 2004; KUBLER, 2005; YIN; CRAIG; HAMBLIN, 2015).

O FS eficiente pode ser racionalmente projetado para atingir sua seletividade aos microrganismos sobre as células dos mamíferos hospedeiros, pois as células microbianas são caracterizadas por uma carga negativa mais pronunciada do que as células dos mamíferos. É possível introduzir os grupos-alvo que agem sinergicamente para obter efeito bactericida ou porções com carga catiônica na estrutura molecular do FS. A ligação do FS catiônico às células microbianas é mais rápida do que seu acúmulo nas células de mamíferos. Assim, usando um intervalo curto de droga para luz (alguns minutos), é possível obter seletividade razoável (MAISCH et al., 2007; TIM et al., 2017).

2.7.1 Porfirinas

As porfirinas foram testadas em seres humanos pela primeira vez em 1913, quando Friedrich Meyer-Betz descobriu que a aplicação de hematoporfirina em sua própria pele resultava em dor em áreas expostas à luz (MEYER-BETZ, 1913). Na década de 1950, descobriu-se que um derivado da hematoporfirina obtido pelo tratamento da mesma com ácidos acético e sulfúrico localizava tumores e emitia fluorescência (LIPSON et al., 1961; SCHWARTZ et al., 1955).

As porfirinas são classificadas como moléculas que contêm um anel tetrapirrólico. A estrutura fundamental da porfina consiste em quatro subunidades pirrólicas ligadas em lados opostos (posições α) através de quatro pontes metilênicas (CH) conhecidos como átomos/posições *meso*-carbono. O macrociclo planar conjugado resultante pode ser substituído nas posições *meso*- e/ou posições β . Se um único átomo de hidrogênio estiver ligado a cada um dos *meso* e β -carbonos e dois dos átomos de nitrogênio interno (pirroloeninas) forem protonados, o composto se tornará conhecido como porfirogênio. Se os hidrogênios *meso* e/ou β forem substituídos por átomos ou grupos que não sejam hidrogênio, os compostos resultantes são conhecidos como porfirinas (ANDERSON, 1999; MILGROM; WARREN, 1997; STERNBERG et al., 1998).

O grupo de derivados de porfirina tem se destacado, não apenas por incluir a primeira formulação aprovada para terapia fotodinâmica do câncer, mas também na perspectiva de aplicações ambientais, considerando que o uso de porfirinas que ocorrem naturalmente ou análogos sintéticos relacionados surge como uma opção econômica, ecológica e segura para humanos/animais (ERZINGER et al., 2011; MILGROM; WARREN, 1997).

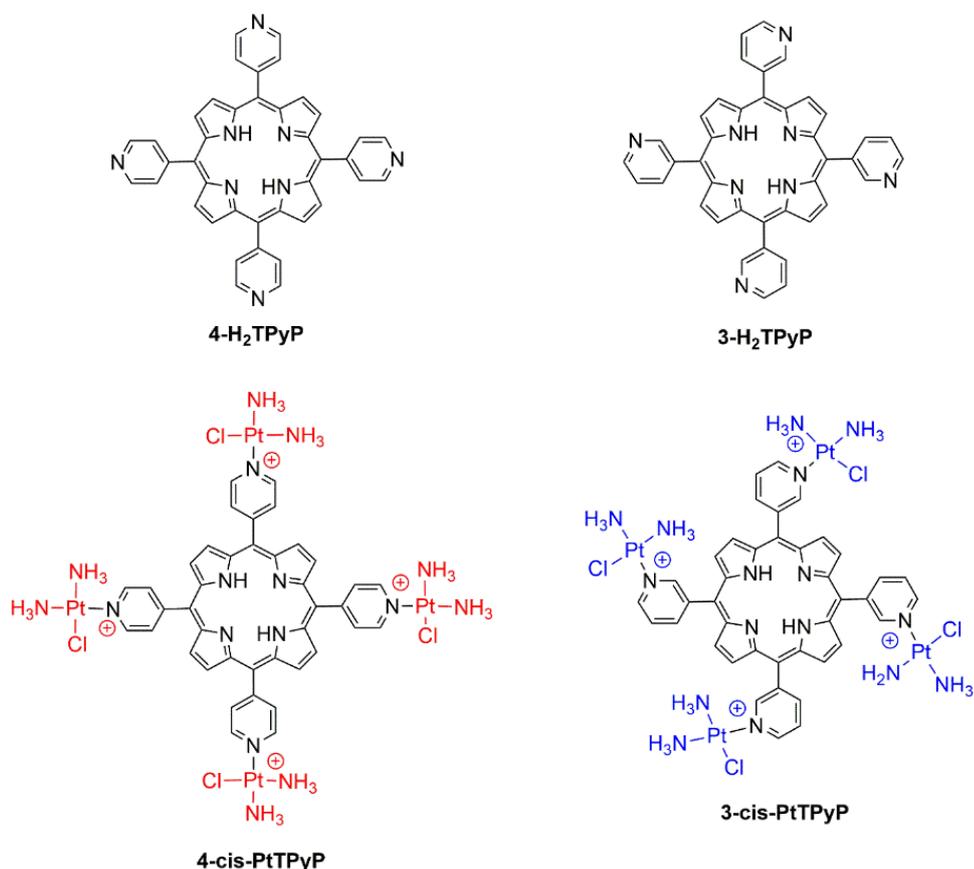
A presença desses compostos é onipresente por natureza, como parte de processos bioquímicos vitais, como transporte de oxigênio (grupo heme) e fotossíntese (clorofila) (MILGROM; WARREN, 1997). Também, realizam uma extensa multiplicidade de funções em estruturas naturais e sintéticas, como por exemplo, enzimas artificiais em química biomimética, cofatores, vitamina B12. Foram usados como FSs na terapia fotodinâmica do câncer, inativação fotodinâmica microbiana, atividade de foto-nuclease, terapia genética e também interações proteicas (DAVIES et al., 2016; MALATESTI et al., 2017; QUIROGA et al., 2016; VANDRESEN et al., 2016; ZHAI; YANG, 2015).

As porfirinas catiônicas são mais promissoras para uso como FSs na aPDT, pois absorvem a luz na região do visível (400-800 nm) e são foto-estáveis. Um FS carregado positivamente tende a se mover para a membrana externa por uma via de captação autopromovida por um mecanismo que envolve a interação entre cátions divalentes do composto com o lipopolissacarídeo bacteriano adjacente. As informações relatadas na literatura indicam que a ação das porfirinas é mais eficiente na banda Soret (região do azul – entre 400 a 450 nm) do que na região de mais baixa energia (região do vermelho – entre 630 a 660 nm). Além disso, cientistas destacam que o coeficiente de excitação de porfirinas na banda Soret é 20 vezes maior que nas bandas Qs (MOREIRA et al, 2008; PEREIRA-ROSA; DA SILVA, 2014).

Porfirinas com três ou quatro cargas positivas são altamente eficientes contra cepas bacterianas. Além disso, porfirinas portadoras de grupos catiônicos em posições *meso* adjacentes são significativamente mais eficientes do que aquelas com grupos catiônicos localizadas em posições *meso* opostas. Embora seja consensual que o número da carga, a distribuição da carga e a natureza dos grupos *meso*-substituintes na porfirina sejam altamente relevantes no processo de foto-inativação, é difícil discriminar o único efeito da carga, uma vez que nos estudos já realizados o FS testado diferem no número da carga, mas também têm diferentes grupos *meso* substituintes (COSTA et al., 2008; KESSEL et al., 2003).

Os macrociclos porfirínicos foram desenvolvidos e utilizados clinicamente nas últimas décadas. Cadeias laterais contendo grupos funcionais, como átomos de nitrogênio ácido carboxílico e açúcar, são frequentemente incorporadas ao esqueleto da porfirina. Estudos de mecanismo indicaram que podem induzir a morte celular pela via apoptótica mitocondrial, desencadeada principalmente por fotolesão lisossômica. Além disso, houve um crescimento recente do interesse na preparação de conjugados de metaloporfirinas como potenciais agentes foto-citotóxicos. As porfirinas funcionalizadas com complexos periféricos de Pt (II) foram os primeiros derivados de metaloporfirina desenvolvidos para aplicação biomédica. Posteriormente, exemplos relacionados a outros conjugados de metaloporfirina foram descritos (CHEN et al., 2015; LI et al., 2015; LIAO et al., 2016; NAKAI et al., 2013). As estruturas químicas das porfirinas que foram utilizadas neste trabalho podem ser visualizadas na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura química das porfirinas 3 e 4-H₂TPyP; 3 e 4-cis-PtTPyP



Fonte: (NAIK et al., 2014).

2.8 CISPLATINA

Diaminodichloroplatina (II) é um complexo com geometria quadrática-planar e dois possíveis isômeros geométricos *cis* e *trans*, cisplatina e transplatina. A cisplatina também chamada de *cis*-diaminodichloroplatina (II), é um composto de coordenação formado por um íon de platina (II) coordenado a ligantes amino (NH₃) e cloreto (Cl⁻) na posição *cis* de um plano horizontal, apresenta-se como um pó cristalino branco ou amarelo e até mesmo amarelo-alaranjado à temperatura ambiente. É solúvel em solventes orgânicos polares como DMSO e ligeiramente solúvel em água. Apresenta-se estável sob temperaturas e pressões normais, mas pode se transformar lentamente no isômero *trans*. A cisplatina tem peso molecular de 301,1 g/mol, densidade de 3,74 g/cm³, ponto de fusão de 270 °C, um log K_{ow} de 2,19 e uma solubilidade em água de 2,53 g/L a 25 °C (IARC, 1981). Estudos farmacocinéticos em humanos

indicaram uma meia-vida inicial no plasma de 25-49 minutos e uma meia-vida secundária de 58-73 horas, a ligação às proteínas ocorre rapidamente, até 90% em 2 horas. A cisplatina é principalmente excretada pelos rins; 27–45% da platina é excretada nos primeiros 5 dias e 43% da platina é excretada na urina por mais de 50 dias (WEINER; JACOBS, 1983).

Estudos detalhados sobre o mecanismo de ação molecular da cisplatina os quais usaram uma variedade de métodos espectroscópicos, incluindo raios-X, ressonância magnética nuclear e outros métodos físico-químicos, revelaram sua capacidade de formar complexos com ácidos nucleicos, quando o cloreto labiliza (dissocia) em solução, deixando um complexo reativo que interage com ácido desoxirribonucléico (DNA). Então, a cisplatina causa reticulação intra e inter-cadeia do DNA, o que resulta na desnaturação local da cadeia de DNA (JAMIESON; LIPPARD, 1999).

A cisplatina foi sintetizada pela primeira vez em 1845 pelo químico italiano Michele Peyrone, e sua estrutura química foi elucidada pela primeira vez por Alfred Werner em 1893. Curiosamente, o mesmo ambiente químico que levou à descoberta e síntese do composto de platina, ou seja, uma reação envolvendo amônia, cloreto e platina, foi replicado ao acaso em um experimento conduzido pelo biofísico Barnett Rosenberg na Universidade de Michigan, 120 anos depois (KAUFFMAN et al., 2010; PEYRONE, 1845). O objetivo do experimento era investigar os possíveis efeitos da corrente elétrica no crescimento de *Escherichia coli*, mas acabaram descobrindo que um produto de eletrólise, mais tarde identificado como *cis*-diaminodichloroplatina (II), que inibiu a divisão celular e promoveu o alongamento celular até 300 vezes o comprimento da célula normal. Além disso, eles observaram que, enquanto o isômero *cis* estava ativo, o isômero *trans* da diaminodichloroplatina (II), também formado pela reação redox nos eletrodos de platina, não teve efeito no crescimento da bactéria (KRIGAS, 1965; ROSENBERG; VAN CAMP). Com base na inibição da divisão celular em *E. coli*, os pesquisadores especularam a utilidade dos compostos de platina como agentes antitumorais (ROSENBERG et al., 1967, 1970).

A cisplatina foi o primeiro composto de coordenação a ser usado como antineoplásico e, desde sua aprovação pelo FDA em 1978, é um dos agentes mais amplamente utilizados na terapia do câncer (CEPEDA et al., 2007; CHIORAZZI et al., 2015). Foi utilizado, único ou combinado com outros agentes quimioterápicos ou mesmo em combinação com radioterapia, no tratamento de vários tipos de câncer, como: câncer de testículos, ovário, bexiga, pulmão, cabeça e pescoço, pâncreas, mama, endométrio, esôfago, câncer cervical avançado, linfomas, osteossarcomas metastáticos, melanomas entre outros (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003).

O efeito terapêutico da cisplatina é aumentado significativamente com o aumento da dose, mas a terapia com altas doses é limitada por toxicidades graves, sendo nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e cardiotoxicidade as complicações mais importantes (DOS SANTOS et al., 2012; PARK et al., 2013). Muitos eventos cardíacos foram relatados em muitos relatos de casos, incluindo alterações eletrocardiográficas, arritmias, miocardite, cardiomiopatia e insuficiência cardíaca congestiva. A redução no sistema de defesa antioxidante é relatada devido ao estresse oxidativo através da geração de EROs, incluindo enzimas antioxidantes e moléculas não enzimáticas, glutatona reduzida, que são as principais alterações na toxicidade da cisplatina (OZBEN, 2007; SAAD et al., 2004; SHRIVASTAVA et al., 2011).

Para superar esses inconvenientes da cisplatina, foram feitos grandes esforços para desenvolver novos análogos de cisplatina com atividade antitumoral equivalente ou melhor e menor toxicidade (PASINI.; ZUNINO, 1987). As porfirinas são candidatas promissoras para o transporte ativo de fragmentos citostáticos de platina para as células cancerígenas. Dois aspectos as tornam interessantes para o tratamento do câncer; o notável enriquecimento das células tumorais e o efeito foto-tóxico alterado pela irradiação com luz vermelha. Essas propriedades são usadas na terapia fotodinâmica para destruir seletivamente tumores de pele e outros tipos de tumores, acessíveis a instrumentos endócrinos (HILLEGERSBERG; KORT; WILSON, 1994).

Para a acumulação das porfirinas nos tecidos tumorais, duas teorias desempenham papel importante na literatura. A primeira baseia-se na captação de porfirinas por células tumorais induzidas por lipoproteínas de baixa densidade responsáveis pelo transporte do colesterol para as regiões dos tecidos periféricos. As porfirinas lipofílicas se ligam a essas lipoproteínas. As células tumorais têm um número aumentado de receptores de lipoproteína de baixa densidade, levando a um aumento na captação de porfirina em comparação com as células normais (KESSEL; WOODBURN, 1993; KORBELIK; HUNG, 1991).

Outra teoria associa o menor valor de pH do tecido tumoral em comparação com o tecido normal com a captação mais fácil de porfirinas nas células tumorais. As porfirinas mostram equilíbrios de protonação/desprotonação dependentes do pH. Nos baixos valores de pH no tecido tumoral (faixa ácida), são espécies predominantemente neutras, um pré-requisito para a passagem das membranas celulares. Em valores mais altos de pH, as porfirinas não são protonadas, o que leva a estruturas iônicas e impede que as porfirinas passem pelas membranas

celulares. Como o pH dentro das células é mais baixo do que no ambiente celular, uma protonação de porfirinas as faz acumular dentro das células (POTTIER; KENNEDY, 1990).

3 METODOLOGIA

3.1 MICRORGANISMOS

Foi utilizada a cepa padrão ATCC 25933 da bactéria *Proteus mirabilis* e isolados clínicos (oriundos de infecções do trato urinário) da mesma bactéria, provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). O projeto foi aprovado pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos) da UFSM sob registro CAAE: 42122821.1.0000.5346 (Anexo A).

3.2 LOCAIS

Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM e os testes de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Franciscana (UFN).

3.3 PORFIRINAS

As porfirinas 3-H₂TPyP e 4-H₂TPyP foram adquiridas da empresa Frontier Scientific®. O precursor intermediário de platina(II) [Pt(NH₃)₂(H₂O)Cl]⁺ e seus respectivos derivados isoméricos porfirínicos 3-cis-PtTPyP e 4-cis-PtTPyP foram sintetizados de acordo com metodologia descrita por Naik e colaboradores (2014). As porfirinas testadas neste estudo são solúveis em Dimetil Sufóxido (DMSO) e estáveis nesta solução.

3.4 FONTE DE LUZ

Todos os experimentos de irradiação foram realizados utilizando luz branca (370 a 800 nm) com fluência luminosa de 50 mW/cm² e dosagem luminosa de 360 J/cm² (tempo total de irradiação de 120 min). A distância necessária entre a placa e a fonte de luz foi de 8 a 10 cm (GUTERRES et al., 2019).

3.5 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *in vitro*

Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados em triplicata, de forma independente e de duas maneiras: com irradiação de luz branca (luz) por duas horas e sem irradiação de luz (escuro) (GUTERRES et al., 2019).

3.5.1 Produção do inóculo bacteriano

As cepas foram semeadas em ágar MYPG (*Mueller Hinton*, Extrato de levedura, Fosfato de Potássio e Glicose) e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação, parte da colônia foi suspensa em solução fisiológica estéril e a turvação foi ajustada em espectrofotômetro para 0,5 na escala de *Mc Farland* (Densidade Óptica 600 nm = 0,08 a 0,1).

3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O teste para determinação da CIM foi realizado através do Método de Microdiluição em Caldo segundo CLSI M100 (CLSI, 2020). O teste foi realizado em triplicata em microplacas de 96 poços de poliestireno com fundo chato. As porfirinas (3-H₂TPyP, 4-H₂TPyP, 3-cis-PtTPyP e 4-cis-PtTPyP) foram diluídas (330 – 1,28 µg/mL) em Caldo *Mueller Hinton* (MH), de forma que a concentração inicial fosse duas vezes mais concentrada que as concentrações finais desejadas. Foram adicionados 100 µL de cada concentração dos agentes nos poços das colunas 1 a 10. As colunas 11 e 12 foram utilizadas para inoculação dos controles negativo e positivo, respectivamente. Posteriormente foram adicionados 10 µL do inóculo, previamente ajustado na escala 0,5 de *Mc Farland*, em todas as colunas exceto a 11ª coluna. O controle positivo foi considerado o poço com a suspensão bacteriana e MH, enquanto o controle negativo foi apenas o MH. Um controle com DMSO foi utilizado para descartar a atividade do diluente. Foram realizados dois ensaios da mesma maneira; uma placa foi exposta por duas horas à irradiação de luz branca e outra placa foi incubada na condição escura (sem qualquer exposição à luz) (GUTERRES et al., 2019). Depois, as placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. Os ensaios foram revelados com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,1%. A concentração mais baixa que não mostrou mudança na cor foi considerada como a CIM.

Para determinar a CBM, uma alíquota de 1,0 µL foi coletada de cada poço, semeada em placa de ágar Nutriente e incubada por 24 horas à 37 °C. Após as Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) foram identificadas e a menor concentração que não demonstrou crescimento bacteriano foi considerada a CBM.

3.5.3 Ensaio de viabilidade celular

Este ensaio foi conduzido utilizando a CIM, 2x CIM e CBMs para determinar o tempo e em qual concentração, as porfirinas são eficientes em eliminar os microrganismos (LOPES et al., 2016). Placas de microdiluição de 96 poços contendo a mesma quantidade de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e porfirinas nas concentrações citadas anteriormente foram incubadas a 37 °C e expostas à luz branca. Uma placa foi preparada da mesma maneira sem exposição à luz. Nos tempos de 0, 2, 6 e 12 horas, 1,0 µL de cada poço foi semeada em placa com ágar Nutriente. As placas foram mantidas a 37 °C durante 24 horas e as UFCs foram então contadas. Como controles positivos consideram-se os poços com caldo BHI e microrganismo sem porfirinas. O ensaio foi realizado com três repetições em três experimentos independentes.

3.5.4 Teste de sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os ensaios foram realizados determinando-se previamente os valores de CIM de substâncias descritas na literatura como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre eles: *tert*-butanol (radical hidroxila), ácido ascórbico (espécies de oxigênio singlete), N-acetilcisteína (NAC - radical hidroperóxil), dimetil sulfoxido (DMSO - espécies superóxido) e ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA - quelante de íons). A avaliação das EROs envolvidas na atividade antimicrobiana das porfirinas foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, previamente já descrito (CLSI, 2020).

A diluição das porfirinas seguiu os mesmos critérios de determinação da CIM. A seguir foram adicionados, em cada poço da placa, 90µL dos sequestradores das EROs na concentração desejada (10x ½ CIM) e por último 10µL de inóculo bacteriano padronizado de acordo com a escala 0,5 de *Mc Farland*. As placas foram irradiadas durante 2 horas (irradiação de luz branca a 50 mW/cm²) e após incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa bacteriológica, sendo a distância necessária entre a placa e a fonte de luz de 8 a 10 cm. Foram preparadas placas para cada um

dos sequestradores testados, além de controles apenas com porfirinas e controle sem dosagem de luz branca. A CIM foi determinada utilizando o corante TTC a 0,1%.

3.5.5 Ensaio semiquantitativo de formação de biofilme

Para a formação do biofilme, o ensaio foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços como descrito por BONEZ et al., 2013, com algumas modificações. Primeiramente, foi selecionado o melhor meio de cultura (*Mueller Hinton* - MH, *Brain Heart Infusion* - BHI, *Luria Bertani* - LB e *Tryptic Soy* - TS), concentração de glicose, tempo de incubação bacteriana (24, 48, 72 horas) e tempo de incubação para a formação do biofilme. Foram adicionados à placa de microdiluição 100µL de cada caldo suplementado com diferentes concentrações de glicose (0 – 1.0 – 3%) e 10 µL de suspensão microbiana (escala 0,5 de *Mc Farland*). As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas a 37 °C a fim de promover a adesão. Como controle positivo para a formação de biofilme foi utilizada a cepa de *P. mirabilis* ATCC 25933 e controle negativo apenas o meio de cultura. O ensaio foi realizado em triplicata.

A fim de revelar o biofilme, as placas foram lavadas três vezes com água destilada para remover as células fracamente aderidas e secas em estufa a 60 °C por 60 minutos para fixar o biofilme no poliestireno. Foram adicionados 100 µL de cristal violeta 1% por 10 minutos. As placas foram lavadas 5 vezes com água destilada. Ao final, foram adicionados 100 µL de etanol 95% por 15 minutos para eluir o cristal violeta e após transferidos para uma nova placa para ser lida em densidade óptica (DO) de 570 nm.

Os valores médios de DO foram calculados para a cepa testada e controles negativos, uma vez que todos os testes foram realizados em triplicata. O valor de corte (DOc) também foi estabelecido. É definido como três desvios-padrão (DP) acima da DO média do controle negativo: $DOc = \text{média da DO do controle negativo} + (3x DP \text{ do controle negativo})$. O valor DO final de uma cepa testada é expresso como valor DO médio da cepa reduzido pelo valor de DOc. Para uma interpretação mais fácil dos resultados, as cepas podem ser divididas nas seguintes categorias: não produtor de biofilme (0), fraco produtor de biofilme (+ ou 1), moderado produtor de biofilme (++ ou 2) e forte produtor de biofilme (+++ ou 3), com base nos valores de DO previamente calculados: $DO \leq DOc$, não produtor de biofilme; $DOc < DO \leq 2xDOc$, fraco produtor de biofilme; $2xDOc < DO \leq 4xDOc$, moderado produtor de biofilme; $4xDOc < DO$, forte produtor de biofilme (STEPANOVIC et al., 2007).

3.5.6 Ensaio de avaliação de inibição da formação do biofilme em placas de 96 poços

A inibição da formação de biofilmes, foi realizada de acordo com Sandberg e colaboradores (2008), com algumas alterações. Em uma placa de 96 poços, 100 µL de caldo MH suplementado com 1% de glicose, 100 µL de cada porfirina (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP) nas concentrações ½ CIM e CIM e posteriormente 10 µL do inóculo bacteriano (0,5 na escala de *Mc Farland*) foram adicionados e após incubados em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. Após esse período o meio foi retirado e a placa foi lavada de 3-5 vezes e seca em estufa a 60 °C por 60 minutos para fixar o biofilme no poliestireno. Foram adicionados 100 µL de cristal violeta 1% por 10 minutos. As placas foram lavadas de 3-5 vezes com água destilada. Ao final, foram adicionados 100 µL de Etanol 95% por 15 minutos para eluir o cristal violeta e após transferidos para uma nova placa para que fosse lida a absorbância em 570 nm. Como controle positivo foi realizado somente o crescimento microbiano com o meio de cultura e como controle negativo somente o meio de cultura, sem inóculo. Os testes foram realizados em triplicata.

3.5.7 Ensaio de avaliação de destruição do biofilme pré-formado em placas de 96 poços

A quantificação de biofilmes, foi realizada de acordo com Agarwal e colaboradores (2008) com modificações. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 100 µL de caldo MH suplementado com 1,0% de glicose. As alíquotas das culturas foram colocadas em solução fisiológica estéril (0,9%) até a concentração de 0,5 na escala de *Mc Farland* e foram adicionados 10 µL do inóculo em cada poço. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 72 horas a 37 °C. Após as 72 horas o meio foi retirado, a placa foi então lavada de 3-5 vezes com água destilada e foram adicionadas as porfirinas (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP), na concentração de CIM e 2x CIM. Após 24 horas de tratamento, o meio foi retirado e a placa lavada e seca em estufa a 60 °C por 60 minutos para fixar o biofilme no poliestireno. Foram adicionados 100 µL de cristal violeta 1,0% por 10 minutos. As placas foram lavadas 5 vezes com água destilada. Ao final, foram adicionados 100 µL de Etanol 95% por 15 minutos para eluir o cristal violeta e após transferidos para uma nova placa e a absorbância foi lida em 570 nm. Como controle positivo foi realizado somente o crescimento microbiano com o meio de cultura e como controle negativo somente o meio de cultura, sem inóculo. Os testes foram realizados em triplicata.

3.5.8 Ensaio de avaliação de inibição de biofilme pré-formado em cateter urinário

Cateteres urinários foram cortados em porções de 1 cm, desinfetados em álcool 70% por 90 minutos e deixados secar em cabine de fluxo laminar. Em seguida, as porções esterilizadas dos cateteres foram colocadas em placas de 24 poços e totalmente cobertas com 1 mL de meio de cultura (caldo MH) e porfirinas (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP) nas concentrações de ½ CIM e CIM para inibição do biofilme. Por fim, 100 µL do inóculo microbiano (0,5 na escala *Mc Farland*) foram adicionados aos poços contendo as porções esterilizadas dos cateteres. O controle positivo foi considerado o meio de cultura, inóculo e porção do cateter e o controle negativo foi considerado o meio de cultura e porção do cateter. As placas foram incubadas a 37° C por 72 horas para formação do biofilme (CAMPANA et al., 2017; DALCIN et al., 2017).

Após incubação, foi realizada a análise de biomassa usando coloração de cristal violeta (CV) a 0,1%. Resumidamente, os pedaços de cateter foram removidos, lavados com solução fisiológica (0,9%) por 3 vezes, secos a 60° C por 60 minutos, transferidos para um novo poço contendo 1 mL de CV e incubados em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as amostras foram lavadas novamente com solução fisiológica (0,9%) e secas ao ar. O CV restante foi dissolvido em 1 mL de álcool etílico (95%) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, 100 µL de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços para serem analisados em leitor de microplacas (570 nm). O experimento foi realizado em triplicata (CAMPANA et al., 2017; DALCIN et al., 2017).

3.5.9 Ensaio de avaliação de destruição de biofilme pré-formado em cateter urinário

Em uma placa de 24 poços foi adicionado 1mL de caldo MH. As alíquotas das culturas foram colocadas em solução fisiológica estéril (0,9%) até a concentração de 0,5 na escala de *Mc Farland* e foram adicionados 100 µL do inóculo em cada poço. Após foram adicionados os cateteres urinários estéreis cortados em porções de 1 cm. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 72 horas a 37 °C. Após as 72 horas o meio foi retirado, os cateteres foram lavados de 3-5 vezes com solução fisiológica (0,9%) e foram adicionadas as porfirinas (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP), na concentração de CIM e 2x CIM. Após 24 horas de tratamento, foi realizada a análise de biomassa usando coloração de cristal violeta (CV) a 0,1%. Resumidamente, os pedaços de cateter foram removidos, lavados com solução fisiológica (0,9%) por 3 vezes, secos a 60° C por 60 minutos, transferidos para um novo poço contendo 1

mL de CV e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas novamente com solução fisiológica (0,9%) e secas ao ar. O CV restante foi dissolvido em 1 mL de álcool etílico (95%) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, 100 µl de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços para serem analisados em leitor de microplacas (570 nm). O experimento foi realizado em triplicata (CAMPANA et al., 2017; DALCIN et al., 2017).

3.5.10 Ensaio de Checkerboard

Teste que tem como objetivo quantificar o efeito de combinações de fármacos em crescimento *in vitro*, assim, potencializando a ação antimicrobiana. Nesse contexto, optou-se por avaliar a associação de cloridrato de ciprofloxacino (utilizado na prática clínica) e as porfirinas utilizadas no estudo (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP).

Em um primeiro momento foi determinada a CIM do cloridrato de ciprofloxacino que foi testado para a associação (CLSI, 2020). Posteriormente, em microplacas de poliestireno de 96 poços, foram adicionadas inicialmente 50µL do meio de cultura MH e 50 µL da diluição de cada porfirina na coluna 2 e diluído seriadamente até a 12^a coluna. Após esse procedimento foram adicionados 50 µL do fármaco cloridrato de ciprofloxacino. As combinações testadas consistiram de cloridrato de ciprofloxacino + 3-H₂TPyP e cloridrato de ciprofloxacino + 3-cis-PtTPyP. A seguir, foram adicionados 10 µL do inóculo bacteriano (0,5 na escala *Mc Farland*) em todos os poços, exceto controle negativo. Na coluna, 1 linha A o controle positivo e na coluna 12, linha H o controle negativo. Após as placas serem incubadas por 24h a 37° C, a leitura foi realizada visualmente observando a turbidez macroscópica ou sua ausência nas amostras nos poços. Para avaliar a interação dos agentes foi calculada a concentração inibitória fracionária (CIF) de cada agente dividindo a CIM do agente em combinação pela CIM do agente isolado. Somando-se os valores das CIFs teve-se determinado o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) resultante da combinação dos agentes. O sinergismo foi definido como $ICIF \leq 0,5$. Indiferença $0,5 < ICIF \leq 4,0$ e antagonismo $ICIF > 4,0$ (JOHNSON et al., 2004; KUMAR et al., 2013).

3.6 ENSAIOS DE CITO E GENOTOXICIDADE *in vitro*

O sangue periférico foi obtido através de amostras de descarte do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Franciscana, que foi submetido ao Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição (CAAE: 31211214.4.0000.5306), com ausência de dados de identificação pessoal. As amostras foram coletadas por punção venosa usando tubos de heparina Vacutainer[®]. As células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) foram separadas seguindo o protocolo descrito por Sagrillo e colaboradores (2015) usando o reagente ficoll (Histopaque[®]-1077) que é capaz de separar elementos sanguíneos através de diferenças de densidade. Uma concentração de 2×10^5 células/mL foi obtida contando-se em uma câmara Neubauer com 0,4% de azul de tripano.

Para testar os efeitos citotóxicos das porfirinas na viabilidade celular de CMSPs, nos biomarcadores de danos no DNA e no metabolismo oxidativo, uma exposição celular foi realizada de maneira semelhante às descrições de Wilms e colaboradores (2005). Células sob nenhum tratamento foram usadas como controle negativo. Enquanto o controle positivo compreende CMSPs expostas a 100mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 24 horas. Além disso, os tratamentos das porfirinas incluem as concentrações de ½ CIM, CIM e 2x CIM durante 24 horas, com ou sem 2 horas de exposição à luz branca. Após todos os tratamentos e períodos de incubação, as CMSPs foram avaliadas através de diferentes ensaios experimentais colorimétricos e fluorimétricos. Todos os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* foram realizados em quintuplicata.

3.6.1 Determinação da viabilidade celular (MTT)

No ensaio MTT, o reagente brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio é solúvel em água, possui cor amarelada e é facilmente incorporado em células viáveis, o que reduz esse composto via atividade mitocondrial usando a enzima succinato desidrogenase. Após ser reduzido, o MTT é convertido em cristais de formazan, insolúveis em água e de cor púrpura-azulada, que são armazenados no citoplasma celular e subsequentemente solubilizados pela adição de DMSO e quantificados colorimetricamente por espectrofotometria.

Células mononucleares humanas foram expostas às porfirinas diretamente diluídas em meio, e então incubadas por 24 horas a 37 °C. Após o tratamento e incubação, foi adicionado MTT e a placa foi incubada a 37 °C por até 4 horas. O meio foi removido e DMSO

(dimetilsulfóxido) foi adicionado em cada poço. Após 10 minutos de incubação a 37 °C, a absorbância da placa foi lida a 570 nm usando um leitor de microplacas. O valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis em comparação ao controle negativo (MOSMANN, 1983).

3.6.2 Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA através do reagente de PicoGreen®

O ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA livre no meio foi realizado com o reagente Invitrogen-DNA-PicoGreen® (Life Technologies), que é um corante fluorescente que se liga à fita dupla do DNA. Este procedimento foi realizado no meio em que as células são tratadas e expostas à luz de LED, a fim de determinar a presença de DNA nesse meio devido a uma possível interrupção celular e morte celular. O corante foi adicionado à amostra em uma placa de Elisa escura de 96 poços, incubado por 5 minutos e foi lida a intensidade da fluorescência por excitação a 480 nm e emissão a 520 nm (HA et al., 2011).

3.6.3 Determinação da taxa total de espécies reativas de oxigênio intracelular

O reagente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) de acordo com Esposti (2002), tem a capacidade de atravessar a membrana celular, é desacetilado por enzimas mitocondriais, dando origem a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína, que reage com espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e produz 2',7'-diclorofluoresceína que emite fluorescência. Assim, a fluorescência foi determinada com base na excitação dos comprimentos de onda de 488 nm e emissão a 525 nm, respectivamente.

3.6.4 Ensaio de determinação óxido nítrico

O teste de óxido nítrico detecta a presença de nitrito orgânico na amostra. O nitrito é detectado e analisado pela formação de uma cor rosada quando o reagente Griess é adicionado a uma amostra contendo NO²⁻. A sulfanilamida do reagente de Griess é responsável pela formação de diazônio a partir de nitrito na amostra. Quando o composto azo (N-1-naftilenodiamino-bicloridrato) interage com sais de diazônio, uma cor rosa aparece na amostra. Sobrenadantes da cultura celular (100 µL) foram utilizados para este ensaio, realizado em uma placa de 96 poços. Em seguida, 100 µL do reagente Griess foram adicionados ao sobrenadante

e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. A absorbância a 540 nm foi lida em um espectrofotômetro (CHOI et al., 2012; NOH et al., 2015).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados numéricos obtidos nos ensaios descritos acima foram tabulados em planilhas eletrônicas do Microsoft Excel[®]. Todos os dados foram analisados a fim de determinar se eram paramétricos ou não-paramétricos, e assim determinar qual teste estatístico seria o mais adequado. Os testes de formação e avaliação de biofilmes foram analisados por análise de variância (ANOVA de uma via), seguido de teste de *Tukey*. Todos os experimentos de citotoxicidade e genotoxicidade foram conduzidos em quintuplicata e os resultados foram convertidos em porcentagem de controle negativo (CN) \pm desvio padrão. Estes dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram analisadas pelo teste de *Dunnnett*. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$) para todos os testes estatísticos. Os gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism[®] 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO 1

Título: **Investigation of the triplet excited state and application of cationic meso-tetra (cisplatin) porphyrins in antimicrobial photodynamic therapy**

Autores: Dariane Jornada Clerici, Rafael de Queiroz Garcia, Carolina Hahn da Silveira, Lino Misoguti, Cleber Renato Mendonça, Roberto Christ Vianna Santos, Leonardo De Boni e Bernardo Almeida Iglesias

Artigo publicado no periódico **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** (Fator de Impacto: 3,631; Qualis Farmácia: B1 (Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 35, n. 102459, 2021) Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102459> (Apêndice C)

4.2 ARTIGO 2

Título: **First evidence of antibiofilm action of *Proteus mirabilis* with tetra-cationic porphyrins containing cisplatin by antimicrobial photodynamic therapy**

Autores: Dariane Jornada Clerici, Carolina Hahn da Silveira, Bernardo Almeida Iglesias, Roberto Christ Vianna Santos

Artigo submetido ao periódico **Microbial Pathogenesis** (Fator de Impacto: 3,848; Qualis Farmácia: B2).

4.3 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *in vitro*

4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os valores de CIM (82,5 µg/mL) e CBM (330 µg/mL) da porfirina 4-H₂TPyP não variaram em condições de ausência ou presença de luz branca. O mesmo ocorreu com a porfirina 4-cis-PtTPyP, em que os valores de CIM (41,25 µg/mL) e CBM (165 µg/mL) foram iguais em condições de ausência e presença de luz branca, frente à bactéria *P. mirabilis* ATCC 25933.

A CIM (82,5 µg/mL) e CBM (330 µg/mL) da porfirina de base livre (3-H₂TPyP) não variaram em condições escuras ou de luz branca. Quando considerada a porfirina com cisplatina (3-cis-PtTPyP), a luz permitiu uma diminuição na CIM de até 4 vezes, quando comparada com a condição escura. Da mesma forma, quando empregada a luz, houve uma diminuição de 2 vezes na CBM. Foi possível observar que na condição escura a CIM das porfirinas foi menos eficaz contra o microrganismo testado. Os resultados podem ser observados na Tabela 1. Da mesma forma, a CBM das porfirinas na presença de luz branca teve melhores resultados quando comparadas com as condições escuras. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Os resultados encontrados para as porfirinas na posição *para* (4-H₂TPyP e 4-cis-PtTPyP) foram iguais em condições escuras e com presença de luz, desse modo, optou-se por seguir os demais testes apenas com seus derivados isoméricos na posição *meta* (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP). Os resultados de CIM e CBM frente aos isolados clínicos de *P. mirabilis* podem ser encontrados no Apêndice A. Os resultados indicam que a redução na concentração bacteriana foi devida ao tratamento com porfirinas e não ao DMSO, que foi utilizado como diluente para as porfirinas testadas.

Tabela 1 - CIM ($\mu\text{g/mL}$) de porfirinas 3-H₂TPyP, 4-H₂TPyP, 3-cis-PtTPyP e 4-cis-PtTPyP na ausência e presença de luz branca

Microrganismo	3-H ₂ TPyP		3-cis-PtTPyP		4-H ₂ TPyP		4-cis-PtTPyP	
	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 25933)	82,5	82,5	41,25	10,31	82,5	82,5	41,25	41,25

Tabela 2 - CBM ($\mu\text{g/mL}$) de porfirinas 3-H₂TPyP, 4-H₂TPyP, 3-cis-PtTPyP e 4-cis-PtTPyP na ausência e presença de luz branca

Microrganismo	3-H ₂ TPyP		3-cis-PtTPyP		4-H ₂ TPyP		4-cis-PtTPyP	
	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 25933)	330	330	82,5	41,25	330	330	165	165

A técnica de microdiluição para determinação da CIM é considerada o “padrão ouro” para determinar a suscetibilidade de microrganismos. As CIMs são definidas como a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo (ANDREWS, 2001; DAVIDSON; PARISH, 1989). Subculturas de amostras são realizadas em um meio (geralmente sólido), livre de agentes antimicrobianos e incubadas novamente por 18 a 24 h adicionais para determinar a CBM, que é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede totalmente o crescimento ou resulta em uma diminuição de 99,9% no inóculo inicial (ou seja, uma redução de 3- \log_{10} nas UFC/mL) na subcultura (PANDEY; SABATH, 2004).

As porfirinas exibiram uma menor CIM quando expostas à luz branca, quando comparadas com condições escuras. Isto mostra que o efeito inibitório do crescimento das porfirinas foi máximo quando as células microbianas foram expostas à luz, o que é consistente com a hipótese de que as EROs geradas pela reação do oxigênio com estados excitados de porfirinas são um fator contribuinte para a toxicidade desses compostos. Os resultados do estudo corroboram com o efeito de porfirinas em *Candida albicans* (CORMICK et al., 2008; DAI et al. 2011), *Staphylococcus aureus* (DASTGHEYB et al., 2013; LAMBRECTS et al., 2009; NAFEE et al., 2013) e *Pseudomonas aeruginosa* (MANNUCCI et al., 2014; MORLEY et al., 2013). Atingir valores baixos de CIM, como $<20 \mu\text{g/mL}$ ou comparáveis aos antimicrobianos padrões, aumenta a importância dos derivados de porfirina em estudos de

atividade antimicrobiana (TASLI et al., 2019), como o que ocorreu com a porfirina com cisplatina utilizada nesse estudo quando irradiada com luz branca.

4.3.2 Ensaio de viabilidade celular

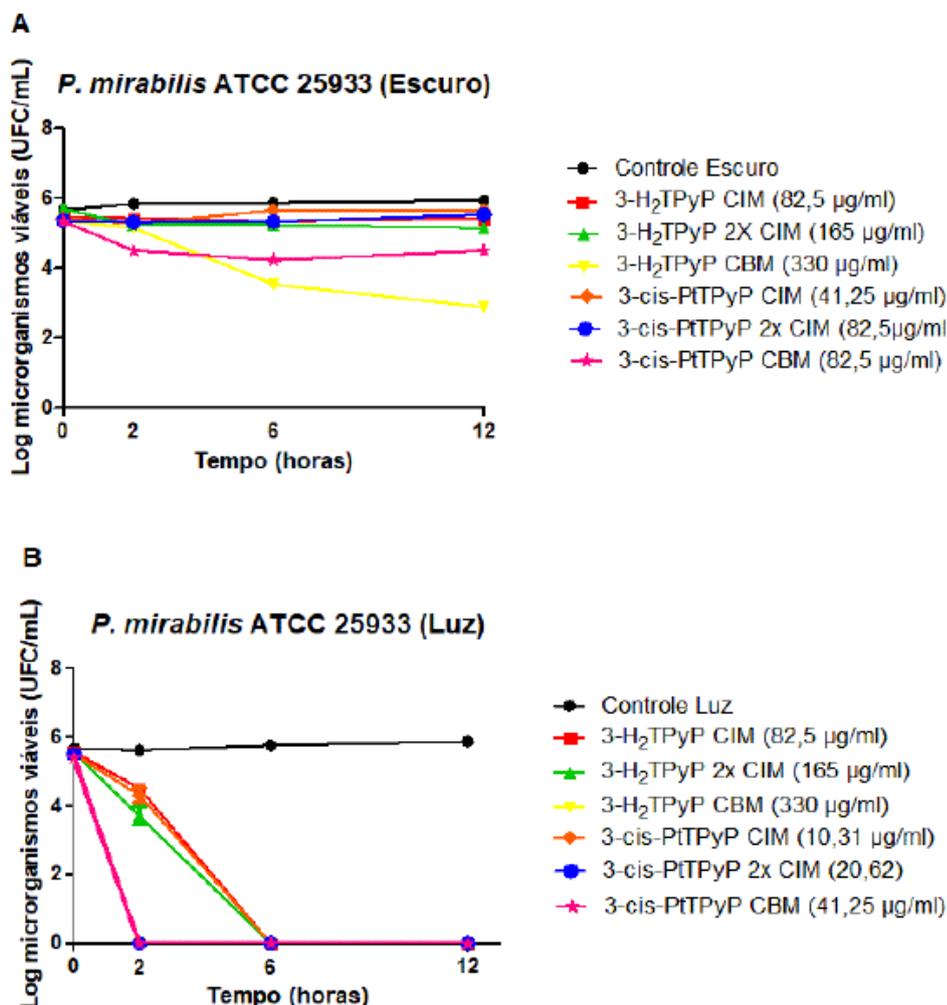
As curvas de morte foram usadas para determinar a cinética da morte bacteriana *in vitro*. Elas podem ser úteis para distinguir se a morte bacteriana depende da concentração e/ou do tempo: a morte bacteriana dependente da concentração ocorre quando a taxa e a extensão da morte aumentam com concentrações antibacterianas progressivamente mais altas, e a morte dependente do tempo ocorre quando aumentar as concentrações antibacterianas para mais do que a CIM não resulta em aumentos proporcionais na morte (PANDEY; SABATH, 2004).

Após tratamento com as porfirinas em condições escuras e de irradiação de luz, as células microbianas viáveis foram contadas. O ensaio mostrou que houve uma diminuição no número de UFCs do microrganismo testado quando irradiados com luz branca. O ensaio também revelou que a presença de porfirinas sem exposição à luz não demonstrou atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações utilizadas.

Pode-se observar que em condições de luz, a porfirina de base livre (3-H₂TPyP) na sua maior concentração (330 µg/mL), e a porfirina com cisplatina (3-cis-PtTPyP) na concentração de 20,62 e 41,25 µg/mL causaram a morte do microrganismo testado já no tempo de 2h. No tempo de 6h, foi possível observar que todas as concentrações das duas porfirinas testadas causaram morte de *P. mirabilis*. Os resultados podem ser observados na Figura 5.

Os resultados deste estudo corroboram com os apresentados por Lopes et al. (2019), onde o emprego de porfirinas de Platina causou uma diminuição no número de UFCs dos microrganismos testados, quando irradiados com luz.

Figura 5 – Ensaio de viabilidade celular de *P. mirabilis* tratados com porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, nas condições escura (A) e de luz branca (B)



4.3.3 Sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) – possível mecanismo

Foram realizados ensaios com os sequestradores das EROs para averiguar quais espécies reativas de oxigênio estão participando do processo de foto-inativação (mecanismo oxidativo ou hidrolítico). A Tabela 3 mostra os valores de CIM na ausência e presença dos sequestradores das EROs. Cada substância está relacionada com uma EROs, desse modo a que causou um aumento na CIM é a que está participando do processo de foto-inativação. Pode-se observar que para ambas porfirinas, provavelmente, o tipo de EROs majoritária são espécies radiculares. Nesta linha, a espécie radicalar mais provável responsável pela foto-inativação a partir de 3-

H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP é o superóxido, não se descartando uma ação mista das demais espécies (Tipo I e Tipo II).

Tabela 3 - Valores de CIM (µg/mL) das porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP na ausência e presença de sequestradores das EROs, em condições de irradiação de luz branca

Porfirina	CIM (µg/mL)					
	Ausência	Ácido Ascórbico	DMSO	NAC	<i>Tert</i> -butanol	EDTA
3-H₂TPyP	82,5	82,5	82,5	82,5	165	82,5
3-cis-PtTPyP	10,31	10,31	20,62	10,31	10,31	10,31

Muitos dos resultados esperados desse trabalho podem ser atribuídos ao potencial de geração de EROs. As porfirinas absorvem uma porção significativa do espectro visível e, na presença de oxigênio, produzem EROs que podem contribuir para a morte celular. Especificamente, esta produção de EROs torna as porfirinas úteis para o tratamento de infecções em áreas acessíveis à luz (áreas cutâneas e subcutâneas) (DASTGHEYB et al. 2013).

A literatura difere um pouco quando se trata de determinar qual mecanismo (tipo I e II) é o responsável pela inativação de microrganismos. As porfirinas utilizadas nesse trabalho (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP) causaram foto-danos provavelmente pelo mecanismo do tipo I (radicais superóxido e hidroxila), o que difere do estudo de Costa et al. (2013) e Huang et al. (2014), em que as porfirinas utilizadas nesses estudos causaram foto-inativação mais pela presença de oxigênio singleto do que por radicais livres. Entretanto, alguns estudos (MROZ et al., 2009; HUANG et al., 2012) corroboram com os resultados apresentados aqui.

Também, Huang e colaboradores (2012) sugeriu que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis ao oxigênio singleto (tipo II) e bactérias Gram-negativas a radical hidroxila (tipo I), o que vai de encontro a este estudo, que utilizou a bactéria Gram-negativa *P. mirabilis*.

O uso de inibidores de oxigênio singleto (por exemplo, azida de sódio, histidina, colesterol, β-caroteno, imidazol, α-tocoferol, ácido ascórbico, triptofano e glutathione reduzida) e de sequestradores de radicais livres (superóxido dismutase, catalase, manitol, glutathione, melatonina e a cisteína) representam uma abordagem simples para determinar quais vias estão envolvidas na inativação fotodinâmica (SONG; AN; JIANG, 1999; GIROTTI, 2001; PEROTTI et al., 2002). Outras abordagens também podem ser usadas como alternativa aos sequestradores

de EROs em sistemas biológicos, como ressonância eletrônica paramagnética (LIN et al., 2006; GRIESBECK; MIRANDA; UHLIG, 2011) ou método de fosforescência a 1270 nm, entretanto esses métodos não são acessíveis a muitos grupos de pesquisa (SCHLOTHAUER et al., 2010). O uso de sequestradores de EROs, como utilizado neste estudo, é um método bem estabelecido para identificar o mecanismo fotoquímico, mas não fornece informações sobre a localização e quantificação das EROs produzidas (GARCIA-DIAZ; HUANG; HAMBLIN, 2016).

A eficiência da aPDT está relacionada à capacidade de um FS de gerar oxigênio singlete (mecanismo do tipo II) e/ou espécies de radicais livres (mecanismo do tipo I) no decorrer do processo fotodinâmico. Por esse motivo, é importante avaliar o tipo de EROs produzida durante a fotoinativação, a fim de determinar as condições adequadas em que a fotossensibilização microbiana deve ocorrer a fim de projetar moléculas de FS melhores (VIA; MAGNO, 2001).

Os mecanismos de inativação do tipo I e II podem ocorrer em paralelo ou individualmente, e a relação entre esses processos depende do FS utilizado e das concentrações de substrato e oxigênio. A competição entre substratos orgânicos e oxigênio molecular pelo estado excitado tripleto do FS determina se a via de reação é do tipo I ou II e o mecanismo predominante pode ser alterado durante o processo de aPDT, à medida que o oxigênio se esgota no sistema (OCHSNER, 1997).

4.3.4 Ensaio semiquantitativo de formação de biofilme

Biofilmes são comunidades de microrganismos aderidas a uma superfície que expressam um comportamento diferente das células no estado livre, estando frequentemente associados à resistência microbiana (COSTERTON et al., 1999). Neste sentido, o método semiquantitativo de formação de biofilme *in vitro* demonstrou a grande capacidade da bactéria *P. mirabilis* em se aderir à superfície de uma placa de 96 poços.

Segundo análises, o meio de cultura, suplementação, tempo de cultura da bactéria e incubação foram, respectivamente: caldo MH suplementado com 1% de glicose, microrganismo cultivado por 24 horas e incubado por 72 horas. Nessas condições, *P. mirabilis* ATCC 25933 foi considerado um forte formador de biofilme ($4 \times OD_c < OD$; $0,4 < 0,81$) (STEPANOVIC et al., 2007). Estes resultados podem ser visualizados em Apêndice B.

Abbas e Gad (2014) investigaram a capacidade de formação de biofilme de diferentes bactérias isoladas de infecções em “pé diabético”, e verificaram que os isolados mais prevalentes foram de *P. mirabilis* e ainda que todos apresentaram forte capacidade de formação

de biofilme. Em outro estudo, dentre os 41 isolados de *P. mirabilis*, houve forte formação de biofilme em 80,5% dos isolados, enquanto produção moderada foi encontrada em 19,5% (GOMMA et al., 2019). Estes resultados corroboram com o encontrado neste estudo, que mostrou a forte capacidade de *P. mirabilis* em formar biofilmes.

Os resultados deste estudo vão de encontro ao já encontrado em Sun et al. (2017) que utilizou caldo MH como meio de cultura na formação de biofilmes bacterianos e Song et al. (2017) que suplementou o meio com glicose para formação de biofilmes de bactérias Gram-negativas. Também corroboram com os resultados de Ramjbar-Omid et al. (2015), que utilizou caldo MH para formar biofilmes de *P. mirabilis*.

É importante definir o grau de formação de biofilme que um microrganismo produz, pois, uma classificação incorreta pode afetar as conclusões sobre o tema. A definição de formação de biofilme varia entre os estudos, mas a definição mais comum foi descrita originalmente para *Staphylococcus spp.* Este método utiliza um ponto de corte de DO (DOc), definido como 3 desvios padrão acima da DO média do controle negativo, para determinar a formação de biofilme. A categorização por esse método, no entanto, é limitada quando o controle negativo tem uma leitura de DO negligenciável (STEPANOVIC et al., 2007; YANG; ZHANG 2008).

A densidade óptica continua sendo uma medida indireta da formação de biofilme e são necessários métodos padronizados para quantificação e sua categorização. Definições variadas de formação de biofilme são utilizadas, dificultando comparações diretas entre os estudos. É necessário padronizar a quantificação do biofilme para permitir uma avaliação precisa dos preditores de biofilme em ambientes e quantificar a relação entre isolados formadores de biofilme e resultados clínicos (VUOTTO et al., 2017).

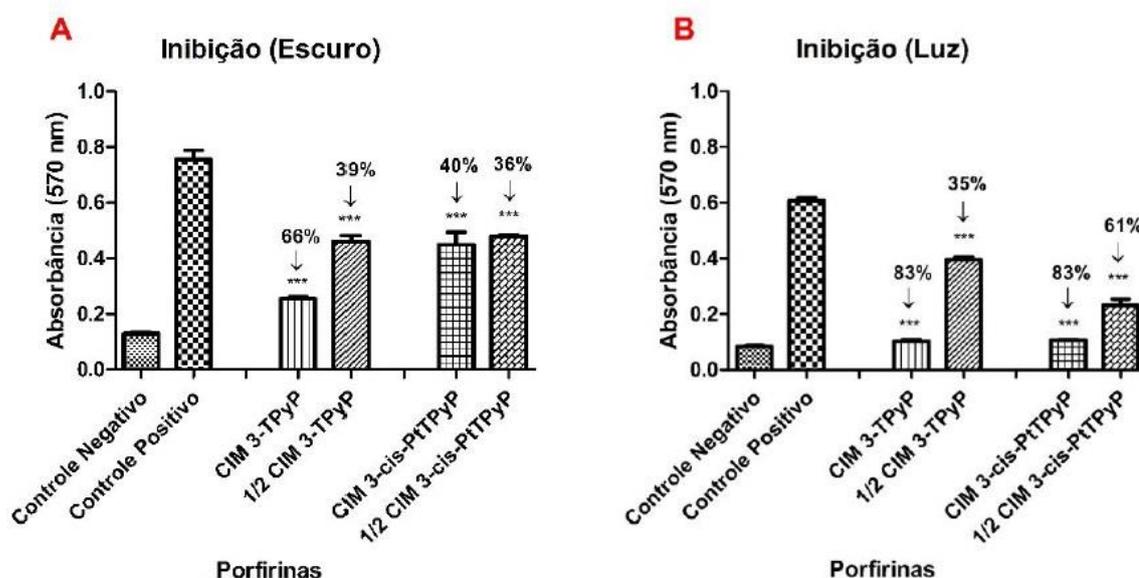
4.3.5 Inibição da formação e destruição de biofilme pré-formado em placas de 96 poços

A coloração de cristal violeta é um dos métodos mais utilizados para comparar e quantificar o desenvolvimento de biofilmes de diferentes patógenos. O cristal violeta se liga proporcionalmente à biomassa do biofilme e apresenta vantagens como baixo custo, sendo uma técnica relativamente rápida e adaptável para uso, além de apresentar alto rendimento com microplacas (OTOOLE; KOLTER, 1998; PITTS et al., 2003).

No ensaio de inibição de formação de biofilme foram utilizadas concentrações inibitórias e subinibitórias. Para a porfirina 3-H₂TPyP as concentrações de CIM (82,5 µg/mL)

e ½ CIM (41,25 µg/mL) causaram uma diminuição do biofilme de 66% e 39%, respectivamente, quando não houve o emprego da luz branca. Já quando a luz foi utilizada, essa diminuição foi de 83% (CIM) e 35% (½ CIM). Para a porfirina com cisplatina (3-cis-PtTPyP), no escuro, as concentrações de CIM (41,25 µg/mL) e ½ CIM (20,62 µg/mL) causaram uma diminuição do biofilme de 40% e 36%, respectivamente. Quando a luz foi empregada, essa diminuição dobrou (83%) na concentração de CIM (10,31 µg/mL) e foi de 61% na concentração de ½ CIM (5,15 µg/mL). Os resultados do ensaio de inibição da formação do biofilme podem ser visualizados na Figura 6.

Figura 6 – Ensaio de inibição da formação do biofilme, tratados com porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, nas condições escura (A) e de luz branca (B)

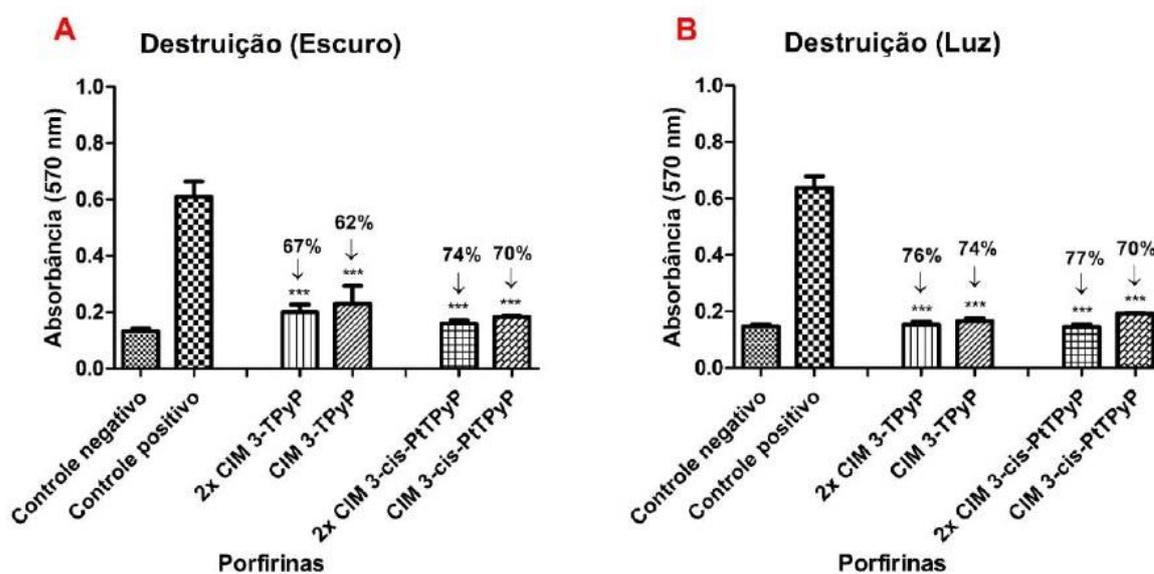


A inibição da formação de biofilme foi avaliada pela técnica colorimétrica utilizando cristal violeta. CIM 3-H₂TPyP Luz e Escuro: 82,5 µg/mL; ½ CIM 3-H₂TPyP Luz e Escuro: 41,25 µg/mL; CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 10,31 µg/mL; ½ CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 5,15 µg/mL; CIM 3-cis-PtTPyP Escuro: 41,25 µg/mL; ½ CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 20,62 µg/mL. Os resultados são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Desvio Padrão). Diferença significativa com relação ao controle positivo para p < 0,05 (*), para p < 0,01 (**), e para p < 0,001 (***)

O ensaio de destruição do biofilme pré-formado revelou que em condições escuras, a utilização da porfirina 3-H₂TPyP causou uma destruição de 67% (2x CIM) e 62% (CIM), e em condições de luz uma destruição de 76% (2x CIM) e 74% (CIM) no biofilme pré-formado. A porfirina 3-cis-PtTPyP causou uma destruição de 74% (2x CIM) e 70% (CIM) em condições

de ausência de luz e 77% (2x CIM) e 70% (CIM) quando a luz foi empregada. A Figura 7 mostra os resultados de destruição de biofilme pré-formado.

Figura 7 – Ensaio de destruição de biofilme pré-formado, tratados com porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, nas condições escura (A) e de luz branca (B)



A destruição de biofilme pré-formado foi avaliada pela técnica colorimétrica utilizando cristal violeta. CIM 3-H₂TPyP Luz e Escuro: 82,5 µg/mL; 2x CIM 3-H₂TPyP Luz e Escuro: 165 µg/mL; CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 10,31 µg/mL; 2x CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 20,62 µg/mL; CIM 3-cis-PtTPyP Escuro: 41,25 µg/mL; 2x CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 41,25 µg/mL. Os resultados são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Desvio Padrão). Diferença significativa com relação ao controle positivo para p < 0,05 (*), para p < 0,01 (**), e para p < 0,001 (***)

Tanto no ensaio de inibição quanto destruição de biofilme, a porfirina com cisplatina 3-cis-PtTPyP apresentou melhores resultados quando irradiada com luz branca, exceto na concentração de CIM no ensaio de destruição, onde o valor permaneceu o mesmo. Quando comparado ao controle positivo, o efeito inibitório da porfirina 3-H₂TPyP sobre o biofilme formado foi melhor na CIM que em ½ CIM, porém a inibição foi satisfatória tendo em vista que obtiveram diferença significativa quando comparados ao controle positivo. No ensaio de destruição de biofilme, para a mesma porfirina, os resultados obtidos quando a luz foi utilizada em ambas concentrações (2x CIM e CIM) foram melhores. Todos os resultados foram estatisticamente significativos.

A adesão bacteriana a superfícies de materiais médicos e a eventual formação de biofilmes podem levar a sérios riscos de segurança, pois uma vez que as bactérias são aderidas a uma superfície e estabelecem um biofilme maduro, se tornam muito difíceis de erradicar, podendo desenvolver novas infecções. Deste modo um passo fundamental para prevenir a formação dos biofilmes é inibir a adesão das bactérias na superfície (MARCINKIEWICZ; STRUS; PASICH, 2013). Os resultados deste estudo vão ao encontro ao já descrito na literatura, onde o emprego da aPDT para o tratamento de biofilmes já vem sendo testado (GARCEZ et al., 2007; MANG et al., 2016; MISBA; ZAID; KHAN, 2017).

Os biofilmes apresentam ao seu redor uma molhabilidade (habilidade de um líquido em manter contato com uma superfície sólida), resultante de um grande número de interações intermoleculares. Este é um dos fatores que limita a penetração de fluidos, representando um obstáculo para a passagem do antimicrobiano através das diferentes camadas de células e da matriz polimérica do biofilme. Isto faz com que a concentração do agente que atinge as células mais internas do biofilme seja muitas vezes inferior (MAH; O'TOOLE, 2004). Dessa forma a aPDT pode ajudar a superar este obstáculo no tratamento dos biofilmes.

A cisplatina já vem sendo testada como agente antibiofilme em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, por ser capaz de interferir no reparo de DNA (necessário para desenvolvimento de resistência a antimicrobianos) e penetrar no biofilme microbiano melhor que outros antimicrobianos (YUAN et al., 2018).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para verificar a eficiência da aPDT na erradicação de biofilmes de bactérias Gram-negativas (DE MELO et al., 2013). Em estudo de Garcez et al. (2007), a aPDT foi utilizada para erradicar biofilmes dentários de *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. O tratamento com aPDT reduziu a massa do biofilme em 95% enquanto que a terapia endodôntica reduziu em 90%.

Lee et al. (2004) utilizaram ácido σ -aminolevulínico (ALA) e aPDT para erradicar biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, em que o biofilme bacteriano foi erradicado com ALA 20 mM na dose de luz branca de 240 J/cm², mas foram necessários dois tratamentos separados para alcançar a erradicação completa do biofilme. Em outro estudo *in vitro*, Wood et al. (2006) coletou biofilmes oral *in vivo* de 7 dias. As células foram incubadas com um fotossensibilizador catiônico de Zn (II) e irradiadas com luz branca. Os resultados demonstraram que o fotossensibilizador foi absorvido pela biomassa do biofilme e a aPDT eliminou significativamente as bactérias do biofilme.

4.3.7 Ensaio de avaliação de inibição e destruição de biofilme pré-formado em cateter urinário

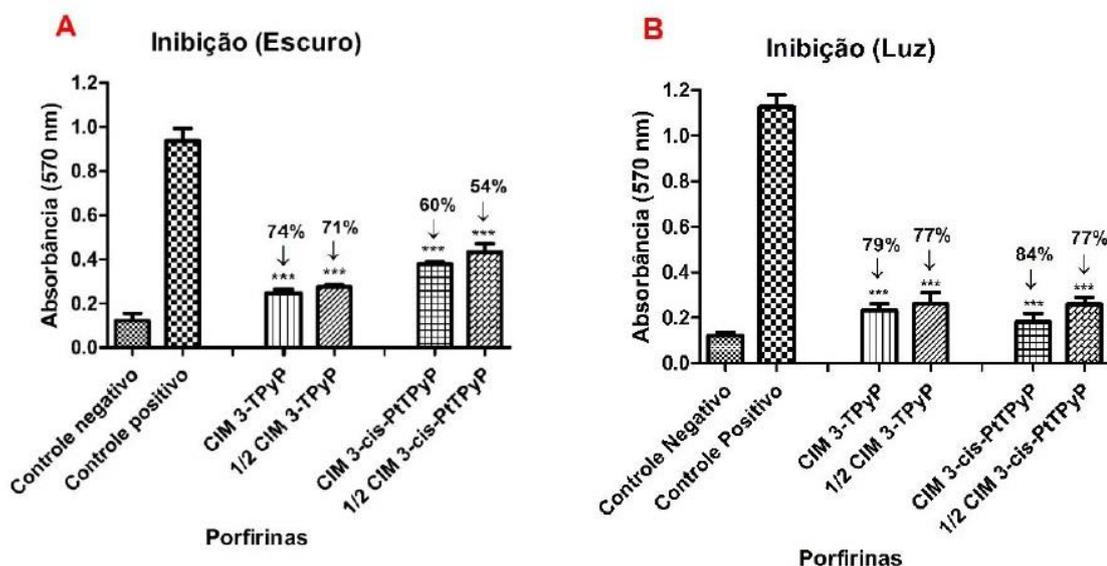
A formação de biofilme microbiano na superfície de cateteres urinários é o maior problema no tratamento das ITUACs, que representam quase 80% das infecções hospitalares em todo o mundo (SALVARTI; KORUGLU; ERAYMAN, 2016). Tais infecções são complicadas pela capacidade única de *P. mirabilis* de formar biofilmes cristalinos, eventualmente levando a cateteres incrustados e bloqueados (JONES et al., 2007).

Após os procedimentos metodológicos, pode-se observar uma mudança na coloração dos cateteres devido à fixação do cristal violeta, o que demonstra a ocorrência da formação do biofilme no material médico hospitalar, confirmando os resultados obtidos através do aumento das absorbâncias das amostras em relação ao controle negativo, indicando o crescimento bacteriano.

O presente trabalho demonstra a prevenção e destruição de bactérias ligadas a biofilmes em superfícies de silicone e látex comumente usadas em dispositivos médicos. Os resultados mostram que o sucesso na foto-inativação é dependente da formação de EROs no meio. Este trabalho detalha a importância do oxigênio na fotoativação e destaca alguns dos desafios da aplicação dessa tecnologia para uso em dispositivos médicos. Essa abordagem tem o potencial de reduzir a alta incidência de infecção associada ao cateterismo urinário de longa duração, reduzindo a morbidade e a mortalidade.

A atividade antibiofilme das porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP sob ausência e irradiação de luz branca foram avaliadas em cateteres urinários infectados com biofilmes de *P. mirabilis* ATCC 25933. Os resultados estão apresentados nas Figuras 8 e 9. No ensaio de inibição de biofilme, a porfirina 3-H₂TPyP, na ausência de luz branca, causou uma diminuição de 74% e 71% na formação de biofilme, nas concentrações de CIM e ½ CIM, respectivamente. Em condições de luz branca, essa diminuição foi de 79% e 77%. Já para a porfirina 3-cis-PtTPyP, quando a luz branca não foi empregada, a diminuição na formação de biofilme foi de 60% e 54% (CIM e ½ CIM), já quando a porfirina foi irradiada com luz, a diminuição aumentou para 84% e 77%.

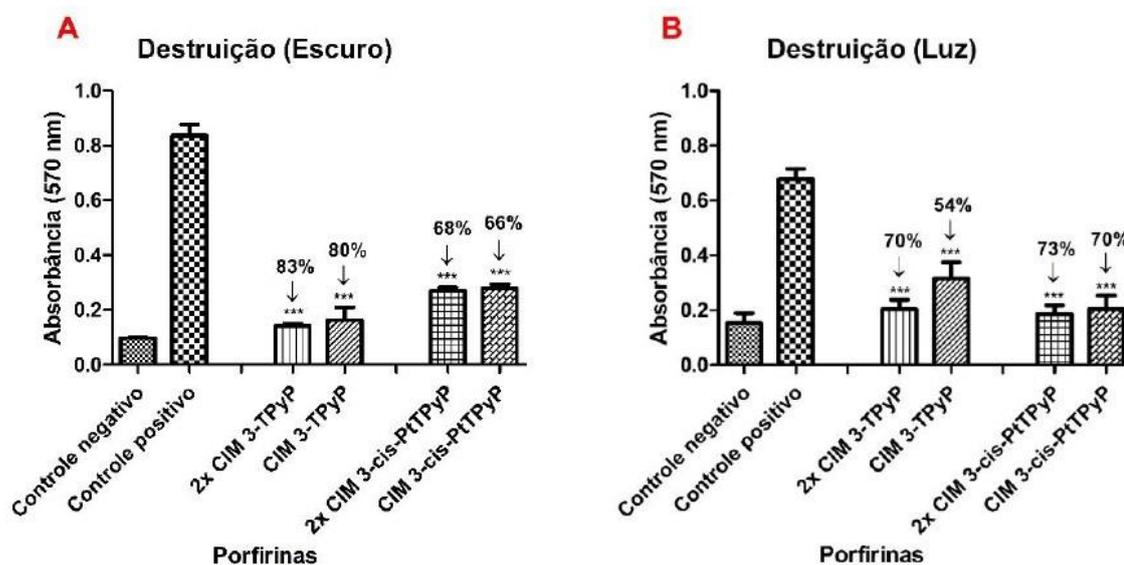
Figura 8 – Ensaio de inibição da formação do biofilme em cateter urinário, tratados com porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, nas condições escura (A) e de luz branca (B)



A inibição da formação de biofilme em cateteres urinários foi avaliada pela técnica colorimétrica utilizando cristal violeta. CIM 3-H₂TPyP Luz e Escuro: 82,5 µg/mL; ½ CIM 3-H₂TPyP Luz e Escuro: 41,25 µg/mL; CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 10,31 µg/mL; ½ CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 5,15 µg/mL; CIM 3-cis-PtTPyP Escuro: 41,25 µg/mL; ½ CIM 3-cis-PtTPyP Escuro: 20,62 µg/mL. Os resultados são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Desvio Padrão). Diferença significativa com relação ao controle positivo para p < 0,05 (*), para p < 0,01 (**) e para p < 0,001 (***)

No ensaio de destruição de biofilme pré-formado, para a porfirina 3-H₂TPyP a destruição de biofilme foi de 83% (2x CIM) e 80% (CIM), em condições escuras e de 70% (2x CIM) e 54% (CIM) em condições de luz. A porfirina 3-cis-PtTPyP, em condições de ausência de luz, causou a destruição de 68% (2x CIM) e 66% (CIM) do biofilme pré-formado, e quando a luz foi empregada essa destruição aumentou para 73% (2x CIM) e 70% (CIM).

Figura 9 – Ensaio de destruição de biofilme pré-formado em cateter urinário, tratados com porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, nas condições escura (A) e de luz branca (B)



A destruição de biofilme pré-formado em cateteres urinários foi avaliada pela técnica colorimétrica utilizando cristal violeta. CIM 3-H₂TPyP Luz e Escuro: 82,5 µg/mL; 2x CIM 3-H₂TPyP Luz e Escuro: 165 µg/mL; CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 10,31 µg/mL; 2x CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 20,62 µg/mL; CIM 3-cis-PtTPyP Escuro: 41,25 µg/mL; 2x CIM 3-cis-PtTPyP Luz: 41,25 µg/mL. Os resultados são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Desvio Padrão). Diferença significativa com relação ao controle positivo para p < 0,05 (*), para p < 0,01 (**) e para p < 0,001 (***).

Tanto no ensaio de inibição quanto destruição de biofilme, a porfirina com cisplatina 3-cis-PtTPyP apresentou melhores resultados quando irradiada com luz branca. O mesmo ocorreu com a porfirina 3-H₂TPyP no ensaio de inibição, entretanto no ensaio de destruição, essa porfirina apresentou resultados melhores na de ausência de luz. Todos os resultados foram estatisticamente significativos.

A maioria dos resultados encontrados neste estudo quando a luz foi utilizada foram melhores em comparação a condição escura. Isso corrobora com estudo de Huang et al. (2018), onde ratas cateterizadas, tratadas com aPDT tiveram melhora no quadro de cistite aguda. A irradiação com luz visível e luz UVA também foi responsável pela inativação de *Escherichia coli* em biofilmes formados em cateteres urinários no estudo de Vollmerhausen et al. (2017).

4.3.8 Ensaio de Checkerboard

Os resultados da análise *in vitro* da associação dos compostos está resumido na Tabela 4. Tanto a associação entre Ciprofloxacino e 3-H₂TPyP quanto Ciprofloxacino e 3-cis-PtTPyP demonstrou indiferença entre os compostos.

Tabela 4 - CIM (µg/mL) das porfirinas (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP) e do Cloridrato de Ciprofloxacino (µg/mL) e interação do Cloridrato de Ciprofloxacino com as porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP frente a *P. mirabilis* ATCC 25933

Combinações	<i>P. mirabilis</i> (ATCC 25933)		
	Interação	ICIF	CIM (µg/mL)
Ciprofloxacino			0,12
3-H ₂ TPyP			82,5
3-cis-PtTPyP			10,31
Ciprofloxacino + 3-H ₂ TPyP	Indiferente	2,75	
Ciprofloxacino + 3-cis-PtTPyP	Indiferente	1,25	

ICIF = Índice de Concentração Inibitória Fracionária

Os resultados da associação dos compostos, através do teste de *Checkerboard*, demonstraram que não houve sinergismo entre os mesmos, sendo assim, o que possibilita a combinação de ciprofloxacino e as porfirinas, uma vez que não houve perda de atividade quando combinados, ou o uso destes isoladamente. A partir de estudos anteriores (HERRMANN et al., 2010) ficou evidente que as bactérias sob biofilmes são mais resistentes aos antimicrobianos do que bactérias no estado planctônico. Portanto, o uso de terapia combinada é preferível em vez de monoterapia com antimicrobianos. Neste estudo também foi realizado o teste de *Checkerboard*, para avaliar possível sinergismo entre as porfirinas e antimicrobiano testados. A sinergia caracteriza-se como uma interação positiva criada quando dois agentes combinados somam e exercem um efeito inibitório maior do que quando isolados. O antagonismo, no entanto, é uma interação negativa observada quando estão associados duas ou mais substâncias. Também são relatadas aditividade, observada quando o resultado de uma

combinação é a soma dos efeitos separados das drogas testadas, e indiferença que sugere que o efeito combinado é simplesmente o efeito da droga mais ativa sozinha (CUENCA-ESTRELLA, 2004).

O Ciprofloxacino é uma fluoroquinolona de amplo espectro com boa atividade bactericida e imunomoduladora, sendo muito utilizado no tratamento de ITUs devido à sua disponibilidade em formulações orais e intravenosas (MEHNERT-KAY, 2005). É representante de drogas sintéticas contra as quais as bactérias desenvolveram resistência rapidamente. De acordo com a literatura, o mecanismo de tolerância se deve ao desligamento da função alvo deixando as células microbianas metabolicamente inativas nas quais o agente antimicrobiano não pode atuar. Na maioria dos casos, a inibição da função alvo é a causa imediata da tolerância aos antimicrobianos (DORR; LEWIS; VULIC, 2009). Desse modo, são necessárias novas alternativas de tratamento que substituam ou atuem em conjunto com este antimicrobiano.

O resultado encontrado neste estudo, difere do que é encontrado na literatura. Estudo de Malik et al. (2011) demonstrou sinergismo entre Ciprofloxacino e óleo essencial de *Pelargonium graveolens* frente à *P. mirabilis*. Efeito aditivo entre Aztreonam e Ciprofloxacino frente à *P. mirabilis* foi encontrado no estudo de Critchley (2003). Estudo de Sha e Greenwood (1988), revelou antagonismo quando foram utilizadas Nitrofurantoína e Ciprofloxacino frente à *P. mirabilis*.

Saini, Chhibber e Harjai (2014), encontraram efeito sinérgico entre Ciprofloxacino e Azitromicina frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. O estudo de Fabry, Kock e Vahlensieck (2014), encontrou indiferença quando Ciprofloxacino foi testado em conjunto com o antisséptico Polihexanida, frente à bactérias Gram-negativas. No trabalho de Aroso e colaboradores (2022), foram testadas porfirinas catiônicas de Imidazol e Ciprofloxacino, onde pôde-se observar efeito sinérgico frente à *E. coli*.

4.4 ENSAIOS DE CITO E GENOTOXICIDADE *in vitro*

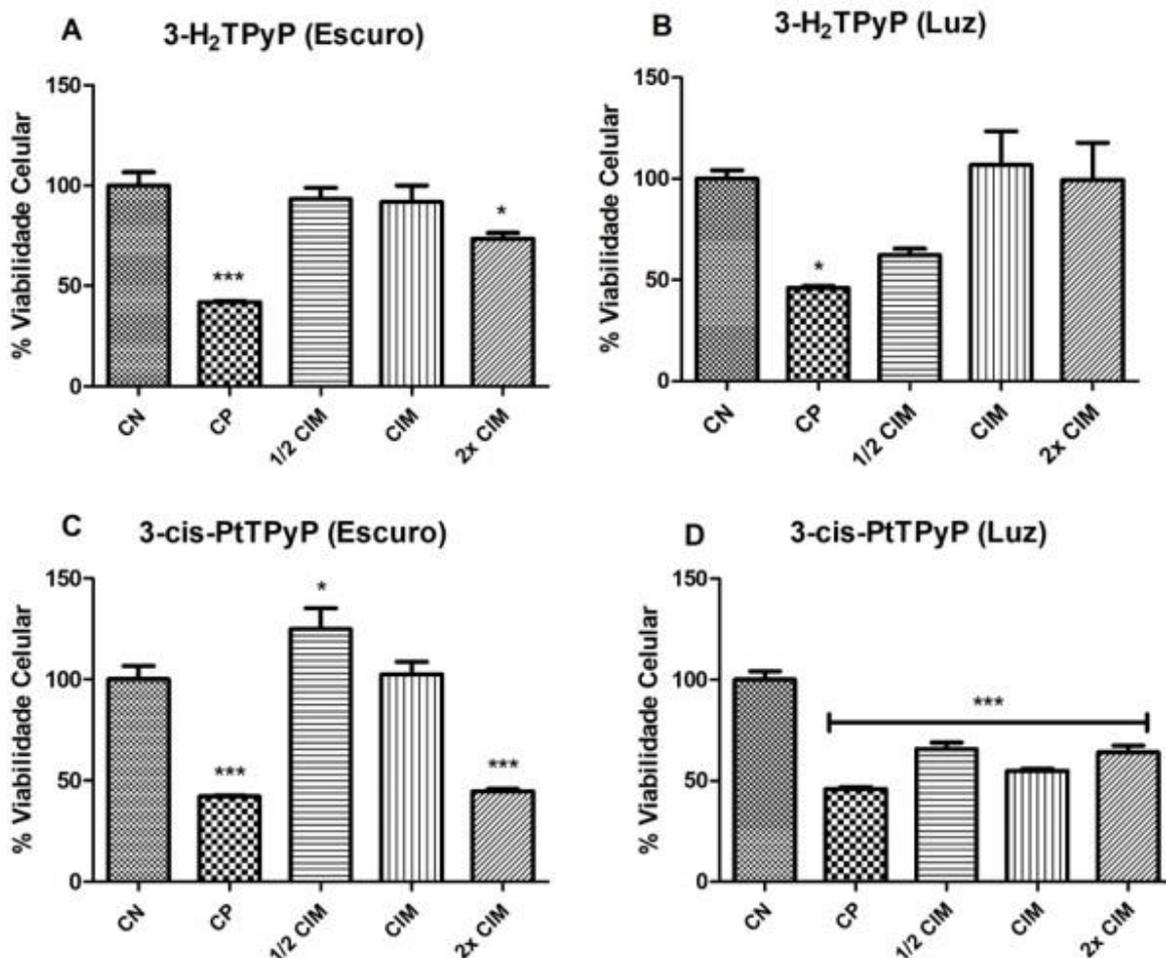
Considerando a composição química e a atividade biológica das porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, foi necessário avaliar seus efeitos citotóxicos e genotóxicos, a fim de estimar possíveis danos a linfócitos e monócitos, células humanas utilizadas para estudos de toxicidade. Portanto, foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), que estão presentes em grandes quantidades na corrente sanguínea (ALLEN et al., 2005).

4.4.1 Determinação da viabilidade celular (MTT)

Como mostrado na Figura 10A, a porfirina 3-H₂TPyP exibiu uma diminuição na viabilidade celular apenas na maior concentração (2x CIM) na condição escura. Quando irradiadas com luz (Figura 10B) a porfirina 3-H₂TPyP não apresentou citotoxicidade dentro de um período de 24 horas em todas as concentrações testadas.

Em relação a porfirina 3-cis-PtTPyP, quando não irradiada com luz, observou-se uma proliferação celular na concentração de ½ CIM (Figura 10C), entretanto houve uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular em relação ao controle negativo na maior concentração utilizada (2x CIM), demonstrando citotoxicidade. Uma vez irradiada com luz, essa mesma porfirina apresentou morte celular em todas as concentrações testadas (Figura 10D).

Figura 10 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) após 24 horas de incubação com as porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, na ausência e sob condição de irradiação com luz branca



Os resultados são expressos como porcentagem do controle negativo (CN) (100%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. CP= controle positivo. CIM = Concentração Inibitória Mínima

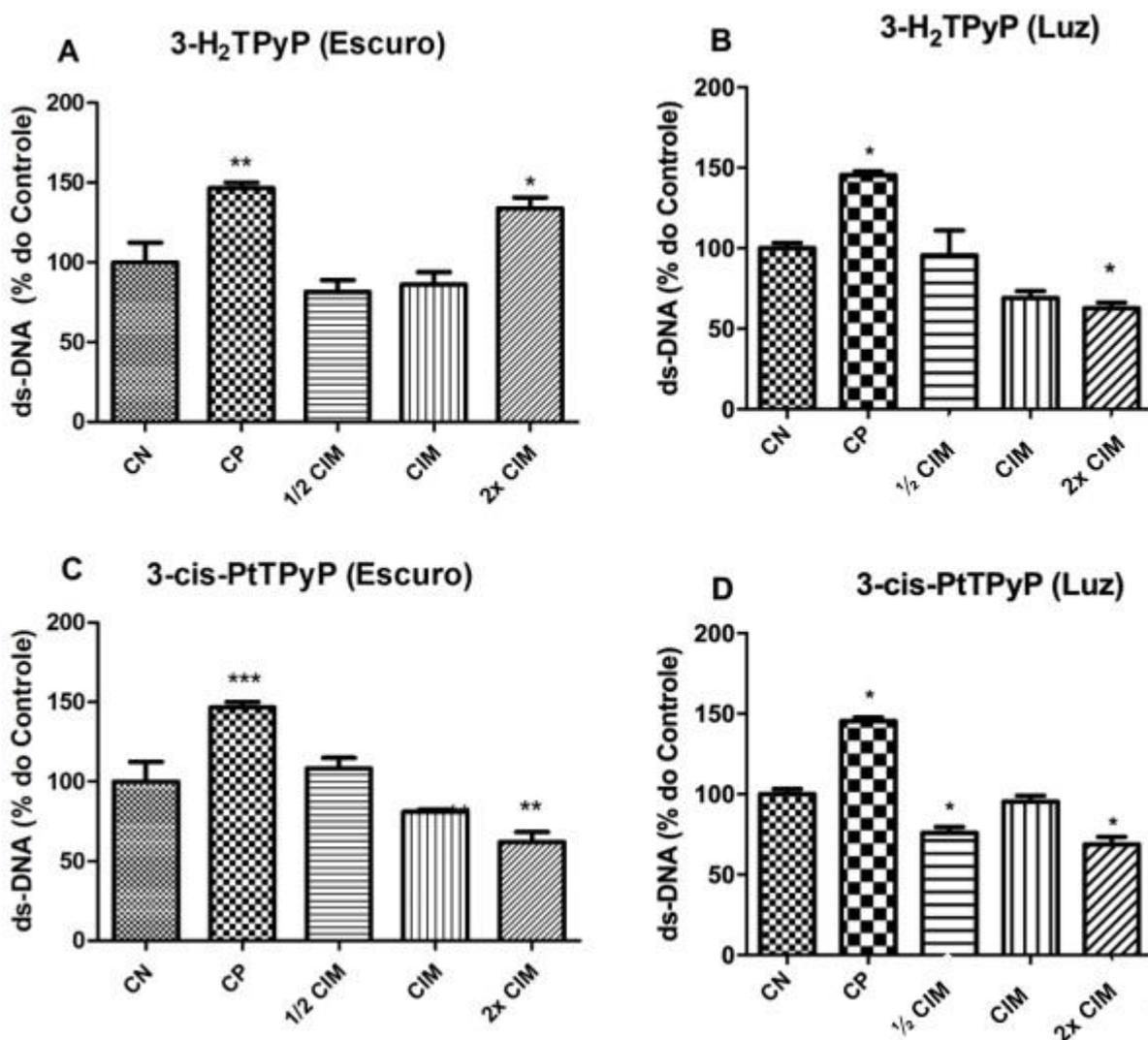
Naik e colaboradores (2014) apresentaram um estudo que mostrou a toxicidade de porfirinas com cisplatina para células tumorais, enquanto que essas mesmas porfirinas não causaram dano algum a células não cancerosas. Nesse mesmo estudo ele apontou uma maior toxicidade quando as porfirinas de cisplatina foram irradiadas com luz, o que condiz o resultado apresentado neste trabalho. Os resultados desse trabalho diferem do que foi apresentado por Vizzotto e colaboradores (2020), onde uma porfirina tetra-catiônica contendo complexos

periféricos de Ru(II) ($H_2RuTPyP$) não induziu citotoxicidade em células humanas, nem em condições de escuro nem em condições de luz branca, em todas as concentrações que foi testada. Nesse mesmo sentido, Sengupta e colaboradores (2018), tratou células mononucleares do sangue com porfirinas e estas não apresentaram citotoxicidade. Um estudo com porfirinas de platina mostrou que estas não foram tóxicas para células não-tumorais, sugerindo uma possível seletividade dos compostos de porfirina em relação às células tumorais, o que pode ser explicado pela tendência de ligação dos FSs, preferencialmente com lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (HAMBLIN; NEWMAN, 1994; COUTO et al., 2020). Essa mesma predileção pode ser observada em estudos de Feng e colaboradores (2018).

4.4.2 Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA através do reagente de PicoGreen[®]

Os dados relacionados à ausência ou presença de dano ao DNA causado pelas porfirinas 3- H_2TPyP e 3-cis-PtTPyP, na ausência e presença de luz branca, estão apresentados na Figura 11. Considerando a porfirina 3- H_2TPyP na condição escura, houve danos significativos ao DNA apenas na maior concentração (2x CIM). Quando essa porfirina foi irradiada com luz, não apresentou presença de danos ao DNA, na maior concentração utilizada (2x CIM) houve uma diminuição dos danos. Para a porfirina 3-cis-PtTPyP, na ausência e presença de luz não houve presença de danos celulares, ao contrário, a concentração de 2x CIM no escuro e $\frac{1}{2}$ CIM e 2x CIM causaram uma diminuição dos danos.

Figura 11 - Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA usando o reagente PicoGreen® com as porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, na ausência e sob condição de irradiação com luz branca



Os resultados são expressos como porcentagem do controle negativo (CN) (100%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. CP= controle positivo. CIM = Concentração Inibitória Mínima.

A porfirina de base livre sem ação da luz branca foi a única que produziu danos significativos a dupla fita de DNA, corroborando os resultados encontrados no MTT, morte celular. Os danos encontrados aqui não poderiam ser justificados pelo fato que porfirinas modificadas se ligam fortemente ao DNA por interação eletrostática, induzindo a clivagem da dupla hélice após irradiação da luz (OLIVEIRA et al., 2017). Isto foi diferente do que ocorreu

com o estudo de Vizzotto e colaboradores (2020), onde foi utilizada uma porfirina tetra-catiônica contendo complexos periféricos de Ru(II) ($H_2RuTPyP$) que quando irradiada com luz, produziu danos ao DNA em células de melanoma.

Sabe-se também que o DNA pode ser danificado pelas porfirinas após a foto-ativação devido à sua capacidade de produzir EROs (DOUGHERTY, 1998). O estresse oxidativo surge quando a geração de EROs (subprodutos do metabolismo oxidativo produzidos principalmente nas mitocôndrias) excede a capacidade celular de eliminá-las e reparar danos celulares, levando à oxidação de biomoléculas, incluindo DNA, lipídios e proteínas (HWANG; KIM, 2007). Assim, o dano oxidativo, causado pelo excesso de EROs, tem sido proposto como um possível modo de ação para o dano ao DNA implicado em várias doenças (LOFT; POULSEN, 1996). Esse dano pode resultar em modificações na base do DNA, rupturas de fita simples e dupla e formação de lesões purínicas/pirimidínicas (HALLIWELL; ARUOMA, 1991; DIZDAROGLU, 1992).

Já foi demonstrado que os danos no DNA induzidos pela cisplatina são semelhantes aos causados pelos agentes alquilantes (MUNCHAUSEN; RAHN, 1975). Com o aquecimento do composto de platina, os dois grupos cloreto são substituídos por água e se ligam a dois locais no DNA. Geralmente, se os dois locais estão na mesma fita de DNA, a lesão é referida como um aduto de DNA e se os locais estão em fitas diferentes, a lesão é referida como uma ligação cruzada de DNA (WEISS; POSTER, 1982).

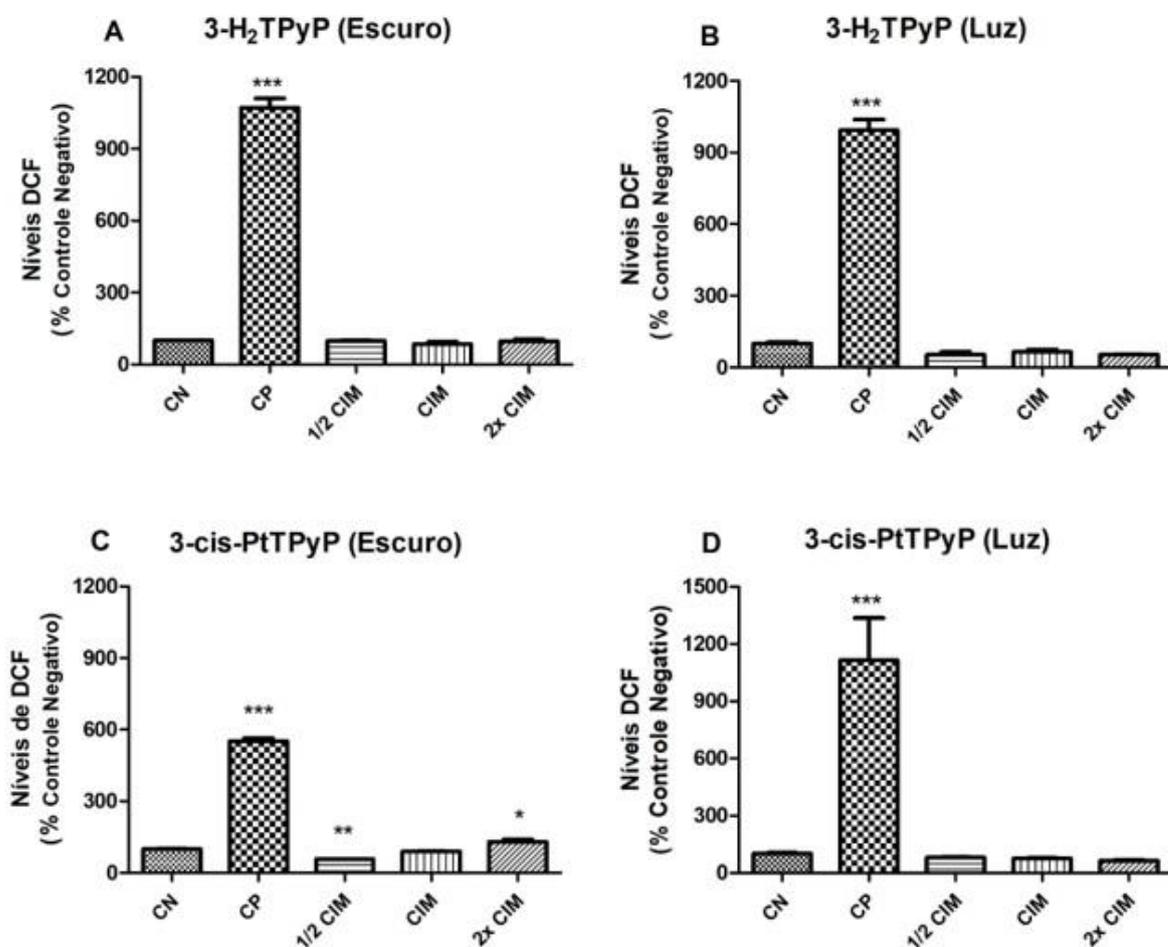
As porfirinas catiônicas, como as utilizadas nesse estudo, são de interesse há muito tempo devido às interações de ligação observadas com o DNA (FIEL et al., 1979; MCMILLIN et al., 2005). Segundo a literatura, existem os seguintes modos de ligação das porfirinas ao DNA: intercalação (formação de complexo intercalado), complexo devido à menor ligação do sulco, complexo devido à maior ligação do sulco, complexo externo, ligação com quadruplexos de DNA G (PRATVIEL, 2016).

4.4.3 Determinação da taxa total de espécies reativas de oxigênio intracelular

Os resultados do teste DCFH-DA são mostrados na Figura 12. Nas figuras 12A e 12B, pode-se observar que a porfirina 3- H_2TPyP não induziu a produção de DCF. A figura 12C mostra que houve aumento na produção de DCF na concentração de 2x CIM e a não produção de DCF na concentração de $\frac{1}{2}$ CIM. A figura 12D mostra que todas as concentrações avaliadas

da porfirina 3-cis-PtTPyP não induziram a produção de DCF e também é possível observar que os valores de todas as concentrações se mantiveram iguais ao controle negativo.

Figura 12 - Ensaio de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) para avaliação dos níveis de produção de DCF após 24 horas de incubação com as porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, na ausência e sob condição de irradiação com luz branca



Os resultados são expressos como porcentagem do controle negativo (CN) (100%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. CP= controle positivo. CIM = Concentração Inibitória Mínima.

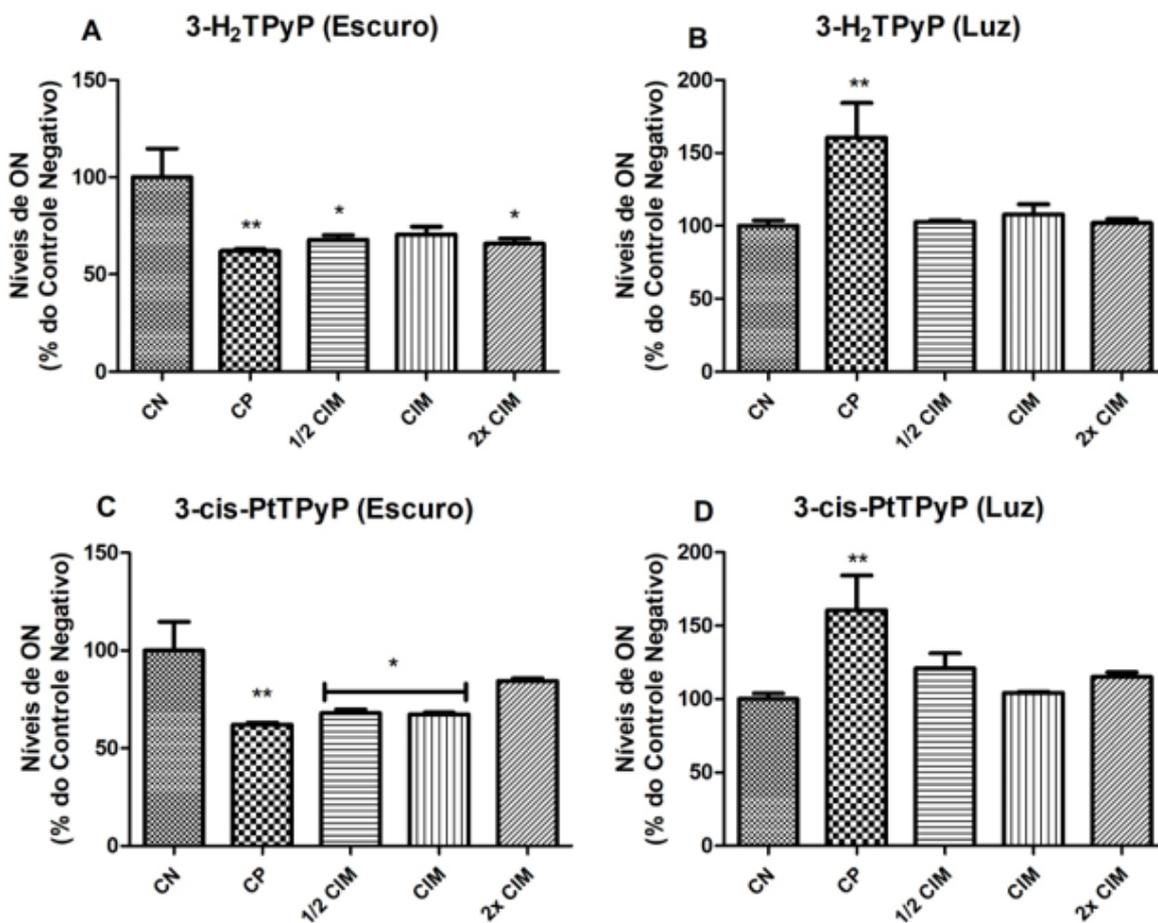
Esses resultados sugerem que as EROs, detectadas pelo ensaio da DCF, não foram responsáveis pela citotoxicidade encontrada na porfirina com cisplatina quando exposta a luz., mas responsável quando a mesma não foi exposta a luz.

Diferente desse trabalho, resultados encontrados na literatura Lange; Badnarski (2018), onde utilizou-se combinações de platina e Temoporfin, mostraram que houve geração de EROs em quantidade maior na condição de irradiação de luz que na condição escura. Isto ocorre pois normalmente, o FS ativado age através do incremento da síntese de EROs, seguido de estimulação por apoptose. Esse mesmo processo é o caminho que foi explorado para explicar o mecanismo de que esses produtos químicos podem apresentar atividade antimicrobiana. Os resultados apresentados aqui podem ser considerados positivos pois, o excesso de EROs pode danificar lipídios, ácidos graxos, proteínas e DNA, levando à ruptura estrutural e funcional da membrana celular, inativação de enzimas e morte celular (MOSHAHID KHAN et al., 2012). O dano oxidativo, causado pelo excesso de EROs, tem sido proposto como um possível mecanismo de ação para o dano ao DNA, implicado em muitas patologias (WANG et al., 2011).

4.4.4 Ensaio de determinação de óxido nítrico

A Figura 13 ilustra a detecção de óxido nítrico a nível celular. A figura 13A, mostra que os tratamentos empregados causaram uma diminuição nos níveis de óxido nítrico nas concentrações de $\frac{1}{2}$ CIM e 2x CIM. A figura 13B mostra que os valores de nitrito encontrado para todas as concentrações da porfirina 3-H₂TPyP foram praticamente os mesmos do controle negativo. Para a porfirina 3-cis-PtTPyP, sem irradiação de luz, as concentrações de $\frac{1}{2}$ CIM e CIM foram consideradas estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, causando uma diminuição dos níveis de óxido nítrico. Quando essa porfirina foi irradiada com luz (13D), pode-se observar que os resultados se mantiveram próximo ao controle negativo.

Figura 13- Determinação de óxido nítrico após 24 horas de incubação com as porfirinas 3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP, na ausência e sob condição de irradiação com luz branca



Os resultados são expressos como porcentagem do controle negativo (CN) (100%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. CP= controle positivo. CIM = Concentração Inibitória Mínima.

O óxido nítrico é uma molécula importante de sinalização celular que está envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos. Os resultados mostram que não foi detectada a produção significativa de óxido nítrico quando as porfirinas (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP) foram irradiadas com luz branca. Isto é positivo pois segundo autores (THOMAS et al., 2008; HEINRICH et al., 2013) o óxido nítrico está associado a vários tipos de tumores, incluindo pulmão, cólon, mama, melanoma e câncer de pâncreas. Os mecanismos pelo qual o óxido nítrico e seu derivado peroxinitrito induzem a carcinogênese incluem: a indução a danos no

DNA, supressão de enzimas de reparo de DNA, modificação pós-traducional de proteínas, aumento da proliferação celular, angiogênese, metástase, inibição da apoptose e imunidade antitumoral (BARATA et al., 2015).

5 CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos neste trabalho e analisando-se os resultados obtidos, é possível obter algumas conclusões em relação ao estudo realizado:

- Dentre as porfirinas testadas a porfirina 3-cis-PtTPyP apresentou melhores resultados sob irradiação de luz branca diminuindo as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas, enquanto as porfirinas 3-H₂TPyP, 4-H₂TPyP e 4-cis-PtTPyP não apresentaram diferença entre CIM e CBM nas condições de irradiação de luz branca e escuro.

- No ensaio de viabilidade celular, pode-se concluir que a irradiação com luz branca causou diminuição de 99,9% das células microbianas, o mesmo não ocorreu em condições escuras. No tempo de 2h, a maior concentração da porfirina 3-H₂TPyP (330 µg/mL) e as concentrações de 20,62 e 41,25 µg/mL da porfirina 3-cis-PtTPyP já causaram a morte dos microrganismos.

- No teste de sequestradores de espécies reativas de oxigênio, para ambas porfirinas o tipo de reação envolvida é a do tipo I. Para a porfirina 3-H₂TPyP o radical responsável pela foto-inativação é hidroxila e para 3-cis-PtTPyP é superóxido.

- Segundo análises, o melhor meio de cultura, suplementação, tempo de cultura da bactéria e incubação foi o microrganismo cultivado por 24h em meio MH com 1,0% de glicose e incubado por 72h. Nessas condições, *P. mirabilis* ATCC 25933 foi considerado um forte formador de biofilme.

- No ensaio de inibição e destruição de biofilme em placas de 96 poços, a porfirina 3-cis-PtTPyP exibiu melhores resultados quando irradiada com luz branca nas concentrações testadas. A porfirina 3-H₂TPyP obteve melhores resultados quando irradiada com luz branca na concentração de CIM no ensaio de inibição de biofilme. Em relação ao ensaio de destruição de biofilme, a mesma porfirina teve os resultados melhorados na presença de luz branca nas duas concentrações testadas (CIM e 2x CIM).

- Em relação ao ensaio de formação de biofilmes em cateteres, no ensaio de inibição quanto destruição de biofilme, a porfirina com cisplatina 3-cis-PtTPyP apresentou melhores resultados quando irradiada com luz branca. O mesmo ocorreu com a porfirina 3-H₂TPyP no ensaio de inibição, entretanto no ensaio de destruição, essa porfirina apresentou resultados melhores em condições escuras.

- Os resultados da análise *in vitro* da associação entre Ciprofloxacino e 3-H₂TPyP quanto Ciprofloxacino e 3-cis-PtTPyP demonstrou indiferença entre os compostos.

- Nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade, os resultados de MTT mostraram que apenas a porfirina 3-cis-PtTPyP quando irradiada com luz branca causou diminuição significativa na viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano. A porfirina com cisplatina incorporada sem ação da luz branca foi a única que produziu danos significativos ao DNA no teste de Picogreen[®]. Os resultados obtidos no teste de diclorofluoresceína mostraram que a porfirina 3-cis-PtTPyP não foi capaz de induzir um aumento nas DCF, enquanto que a porfirina base livre 3-H₂TPyP produziu aumento de DCF apenas em condições sem irradiação de luz branca. No teste de óxido nítrico, os resultados mostram que não foi encontrado um aumento significativo de óxido nítrico quando as porfirinas (3-H₂TPyP e 3-cis-PtTPyP) foram irradiadas com luz branca.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. A.; GAD, A. I. Eradication of biofilms formed by bacteria isolated from diabetic foot infections by potential antibiofilm agents alone and in combination with ciprofloxacin. **Afr J Microbiol Res.**, v. 8, p. 3882–3892, 2014.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem. J.**, v. 473, p. 347–364, 2016.
- AGARWAL, V. et al. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. **Mycopathologia**, v. 165, n. 1, p. 13-19, 2008.
- ALLEN, D. D. et al. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 31, p. 757–768, 2005.
- ALVES, E. et al. **BMC Microbiol.**, v. 9, n. 70, 2009.
- ALVES, E. et al. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 14, p. 1169–1178, 2015.
- ANDERSON, H. L. Building molecular wires from the colours of life: conjugated porphyrin oligomers. **Chem Commun.**, v. 23, p. 2323-2330, 1999.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5-16, 2001.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 743-54, 2012.
- AROSO, R. T. et al. Synergic dual phototherapy: Cationic imidazolyl photosensitizers and ciprofloxacin for eradication of in vitro and in vivo *E. coli* infections. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 233, 2022.
- BARATA, J. F. B. et al. Photodynamic effects induced by meso-tris(pentafluorophenyl) corrole and its cyclodextrin conjugates on cytoskeletal components of HeLa cells. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 92, p. 135–144, 2015.
- BARTOLOMEU, M. S. et al. **Front. Microbiol.**, v. 7, 2016.
- BERTOLINI, G. et al. Photosensitizing activity of water and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 71, p. 149–155, 1990.
- BHARDWAJ, A. K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial Quorum Sensing Inhibitors: Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 8, p. 68-83, 2013.
- BONEZ, P. C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**, v. 41, p. 119-122, 2013.

BONEZ, Pauline Cordenonsi, Atividade da clorexidina sobre biofilmes microbianos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2014.

BOYLE, N. M.; ROCHFORD, J.; PRYCE, M. T. **Coord. Chem. Rev.**, v. 254, p. 77–102, 2010.

BRISSET, L. et al. In vivo and in vitro analysis of the ability of urinary catheter to microbial colonization. **Pathologie-biologie**, v. 44, n. 5, p. 397-404, 1996.

BRUSCH, J. L. Catheter-Related Urinary Tract Infection. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 3, n. 23, 2013.

CAMINOS, D. A. et al. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 7, n. 1071, 2008.

CAMPANA, R. et al. Chitosans inhibit the growth and the adhesion of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates on urinary catheters. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 50, p. 135–141, 2017.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of applied bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CASTANO, A. P. et al. **Photodiag. Photodyn. Therapy**, v. 1, p. 279–293, 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **About Antimicrobial Resistance**. Georgia, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Acesso em: 15 jun. 2021.

CEPEDA, V. et al. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, 2007.

CIEPLIK, F. et al. Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR—an exclusive singlet oxygen photosensitizer. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 65, p. 477–487, 2013.

CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. **Front Microbiology**, p. 1-17, 2014.

CHEN, J. J. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a novel porphyrin-based photosensitizer for photodynamic therapy. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 141, p. 1553–61, 2015.

CHIORAZZI, A. et al. Current View in Platinum Drug Mechanisms of Peripheral Neurotoxicity. **Toxics**, v. 3, n. 3, p. 304-321, 2015.

CHOI, S. S.; LEE, H. K.; CHAE, H. S. *In vitro* photodynamic antimicrobial activity of methylene blue and endoscopic white light against *Helicobacter pylori* 26695. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 101, p. 206-209, 2010.

CHOI, W. S. et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cell. Immunol.**, v. 280, p. 164–170, 2012.

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100 – 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2020.

COLLINS, T. L. et al. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Curr. Microbiol.**, v. 61, p. 411–416, 2010.

CORMICK, M. P. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1592–1599, 2009.

COSTA, L. et al. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 7, p. 415–422, 2008.

COSTA, L. et al. Involvement of type I and type II mechanisms on the photoinactivation of non-enveloped DNA and RNA bacteriophages. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 10–16, 2013.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COUTO, G. K. et al. Tetra-cationic platinum (II) porphyrins like a candidate photosensitizers to bind, selective and drug delivery for metastatic melanoma. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 202, n. 111725, 2020.

CRITCHLEY, I. A. et al. In vitro Synergy Studies Using Aztreonam and Fluoroquinolone Combinations against Six Species of Gram-Negative Bacilli. **Chemotherapy**, v. 49, p. 44–48, 2003.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy--what value are they? **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 5, p. 854-69, 2004.

DAI, T. et al. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. **Antimicrob. Agent Chemother.**, v. 55, p. 5710–5717, 2011.

DALCIN, A. J. F. et al. Anti biofilm effect of dihydromyricetin-loaded nanocapsules on urinary catheter infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 156, p. 282–291, 2017.

DAROUICHE, R. Device-associated infections: a macroproblem that starts with a microadherence. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p. 1567-1572, 2001.

DASTGHEYB, S. S. et al. Photo-activated porphyrin in combination with antibiotics: Therapies against *Staphylococci*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 129, p. 27–35, 2013.

DAVIES, S. A. et al. Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 67, p. 777–783, 2016.

- DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technol.**, p. 148-155, 1989.
- DE MELO, W. et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 11, n. 7, p. 669-693, 2013.
- DEMINOVA, T.; HAMBLIN, M. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 17, p. 245–254, 2004.
- DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photo sensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 2329-2335, 2005.
- DEVENPORT, K.; KEELEY, F. X. Evidence for the use of silver-alloy-coated urethral catheters. **J Hosp Infect.**, v. 60, p. 298–303, 2005.
- DI POTO, A. et al. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Biomaterials**, v. 30, p. 3158–3166, 2009.
- DIZDAROGLU, M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. **Mutation Research**, v. 275, p. 331-342, 1992.
- DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277-281, 2001.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 881-890, 2002.
- DORR, T.; LEWIS, K.; VULIC, M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. **PLoS Genetics**, v. 5, 2009.
- DOS SANTOS, V. et al. Antioxidants and Inhibition of Cisplatin-Induced Kidney Injury: Role of Mitochondria. **Oxidative Stress in Cancer Biology and Therapy**, p. 407-425, 2012.
- DOUGHERTY, T. J. J. **Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n. 889, 1998.
- ERZINGER, G. et al. Optimizing conditions for the use of chlorophyll derivatives for photodynamic control of parasites in aquatic ecosystems. **Parasitol. Res.**, v. 109, n. 781, 2011.
- ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**, v. 26, p. 335-340, 2002.
- FABRY, W. H.; KOCK, H.; VAHLENSIECK, W. Activity of the Antiseptic Polyhexanide Against Gram-Negative Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 2, 2014.
- FENELEY, R. C. L.; KUNIN, C. M.; STICKLER, D. J. An indwelling urinary catheter for the 21st century. **BJU International**, v. 109, p. 1746-1749, 2011.

FENG, X. et al. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of a Porphyrin-Based Photosensitizer and Its Isomer for Effective Photodynamic Therapy against Breast Cancer. **J. Med. Chem.**, v. 61, p. 7189–7201, 2018.

FIEL, R. J. et al. Interaction of DNA with a porphyrin ligand: evidence for intercalation. **Nucleic Acids Res.**, v. 6, n. 3093, 1979.

FINK, R. et al. Indwelling urinary catheter management and catheter-associated urinary tract infection prevention practices in Nurses Improving Care for Health system Elders hospitals. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 8, p. 715-720, 2012.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FLORES-MIRELES, G. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat Rev Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2015.

FONSECA, S. M. J. et al. Triplet-state and singlet oxygen formation in fluorene-based alternating copolymer. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p. 8278–8283, 2006.

FREITAS, M. T. M. et al. **Photomed. Laser Surg.**, 2017.

FREZZA, M. et al. Novel metals and metal complexes as platforms for câncer therapy. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, p. 1813–1825, 2010.

GABI, M. et al. Electrical microcurrent to prevent conditioning film and bacterial adhesion to urological stents. **Urol Res.**, v. 39, p. 81–88, 2011.

GAMBINO, M.; CAPPITELLI, F. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. **Biofouling**, v. 32, n. 2, p. 167-78, 2016.

GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Combined With Conventional Endodontic Treatment to Eliminate Root Canal Biofilm Infection. **Lasers Surg Med.**, v. 39, n. 1, p. 59–66, 2007.

GARCIA-DIAZ, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. **Methods**, v. 109, p. 158–166, 2016.

GARCÍA-MORALES, A. et al. Photodynamic therapy for acne: use of the pulsed dye laser and methylaminolevulinate. **ACTAS Dermo-Sifiliograficas**, v. 101, p. 758-770, 2010.

GEORGE, S. et al. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 8, p. 788–795, 2009.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. et al. Multidrug resistance to antimicrobials as a predominant factor influencing patient survival. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 476-481, 2006.

- GIROTTI, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. **J. Photochem. Photobiol., B**, v. 63, p. 103–113, 2001.
- GOMMA, S. et al. Elimination of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* biofilms using bacteriophages. **Archives of Virology**, v. 164, p. 2265–2275, 2019.
- GRIESBECK, A. G.; MIRANDA, M. A.; UHLIG, J. Sweet chiral porphyrins as singlet oxygen sensitizers for asymmetric Type II photooxygenation. **Photochem. Photobiol. Sci.**, 2011.
- GUPTA, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention-a journey to break the wall: a review. **Archives Microbiology**, p. 1-15, 2015.
- 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.
- HA, T. N. T. et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. 25969, 2011.
- HACKER, J.; GOEBEL, W. Mechanism and methods for analyzing pathogenicity. **Swiss Biotechnology**, v. 5, p. 21–31, 1987.
- HAEDERSDAL, M. et al. Long-pulsed dye laser versus long-pulsed dye laser-assisted photodynamic therapy for *acne vulgaris*: a randomized controlled trial. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 58, p. 387-394, 2008.
- HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett.**, v. 281, p. 9–19, 1991.
- HAMBLIN, M. R. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 33, p. 67–77, 2016.
- HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease, **Photochem. Photobiol. Science**, v. 3, p. 436-450, 2004.
- HAMBLIN, M. R.; NEWMAN, E. L. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy II conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 26, p. 147–157, 1994.
- HANIGAN, M. H; DEVARAJAN, V. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer ther.**, v. 1, p. 47-60, 2003.
- HEINRICH, T. A. et al. Biological nitric oxide: signaling, chemistry and terminology. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, p. 1417–1429, 2013.
- HERRMANN, G. et al. Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. **J Infect Dis**, 2010.
- HILLEGERSBERG, R. V.; KORT, W. J.; WILSON, J. H. P. **Drugs**, v. 48, 1994.

HØIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, p. 55-65, 2011.

HØIBY, N. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical and Microbiology Infection**, p. 1-25, 2014.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do materials need to be? a translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 4, 2013.

HUANG, L. et al. Type I and Type II Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Therapy: An In Vitro Study on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, p. 490–499, 2012.

HUANG, L. et al. Stable synthetic mono-substituted cationic bacteriochlorins mediate selective broad-spectrum photoinactivation of drug-resistant pathogens at nanomolar concentrations. **J Photochem Photobiol B.**, v. 141, p. 119–127, 2014.

HUANG, Y. et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue and potassium iodide to treat urinary tract infection in a female rat model. **Scientific Reports**, v. 8, n. 7257, 2018.

HWANG, E. S.; KIM, G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v. 229, p. 1–10, 2007.

IARC. Cisplatin. In Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. **International Agency for Research on Cancer**, p. 151–164, 1981.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. **Chem Ver.**, v. 99, p. 2467–2498, 1999.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004.

JOHNSON, M. D. et al. Combination Antifungal Therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 693–715, 2004.

JONES, B. V. et al. Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. **Journal Med. Microbiology**, v. 54, p.807-813, 2005.

JONES, S. M. et al. Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 268, p. 16–21, 2007.

JORI, G.; BROWN, S. B. Photochem. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photobiol. Sci.**, v. 3, p. 403–5, 2004.

JORI, G. et al. Photodynamictherapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg. Medical**, v. 38, p. 468-481, 2006.

- JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, W. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. **Theranostics**, v. 2, p. 916-966, 2012.
- JUZENIENE, A.; MOAN, J. The history of PDT in Norway. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 4, p. 3–11, 2007.
- KAUFFMAN, G. B. et al. Michele Peyrone (1813-1883), discoverer of cisplatin. **Platin. Met. Rev.**, v. 54, p. 250–256, 2010.
- KE, M. R. et al. Photodynamic inactivation of bacteria and viruses using two monosubstituted zinc(II) phthalocyanines. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 84, p. 278–83, 2014.
- KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 573–584, 2007.
- KESSEL, D.; WOODBURN, K. **Int. J. Biochem.**, v. 25, 1993.
- KESSEL, D. et al. **Photochem. Photobiol.**, v. 78, p. 431–435, 2003.
- KOKARE, C. R. et al. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 159-168, 2009.
- KORBELIK, M.; HUNG, J. **Photochem. Photobiol.**, v. 53, p. 501, 1991.
- KOUIDHI, B. et al. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, p. 14-22, 2010.
- KRATOCHWIL, N. A. et al. Synthesis and X-ray crystal structure of trans, cis-[Pt(OAc)2I2(en)]: a novel type of cisplatin analog that can be photolyzed by visible light to DNA-binding and cytotoxic species in vitro. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 2499–2507, 1996.
- KUBLER, A. C. Photodynamic therapy. **Med. Laser Appl.**, v. 20, p. 37–45, 2005.
- KUMAR, U. et al. Prospective, open-label, uncontrolled pilot study to study safety and efficacy of sildenafil in systemic sclerosis-related pulmonary artery hypertension and cutaneous vascular complications. **Rheumatol. Int.** v. 33, p. 1047–1052, 2013.
- LAMBRECHTS, S. A. et al. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 4, p. 503–509, 2009.
- LANGE, C.; BEDNARSKI, P. J. Evaluation for Synergistic Effects by Combinations of Photodynamic Therapy (PDT) with Temoporfin (mTHPC) and Pt(II) Complexes Carboplatin, Cisplatin or Oxaliplatin in a Set of Five Human Cancer Cell Lines. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 3183, 2018.
- LEE, C. F. et al. δ -Aminolevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. **J. Photochem. Photobiol. B, Biol.**, v. 75, p. 21–25, 2004.

- LEMBO, A. J. et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection with intra-gastric violet light phototherapy: a pilot clinical trial. **Laser Surg. Med.**, v. 41, p. 337-344, 2009.
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48-56, 2007.
- LI, J. W. et al. Antitumor effects evaluation of a novel porphyrin derivative in photodynamic therapy. **Tumour Biol.**, v. 36, p. 9685–92, 2015.
- LIAO, P. Y. et al. Synthesis, photophysical properties and biological evaluation of β kylaminoporphyrin for photodynamic therapy. **Bioorg Med Chem.**, v. 24, p. 6040–7, 2016.
- LIN, W. et al. Reaction mechanisms of riboflavin triplet state with nucleic acid bases. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 5, p. 422–425, 2006.
- LIPSON, R. L. et al. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 26, p. 1–11, 1961.
- LO, J.; LANG, D.; CHEW, B. Ureteral Stents and Foley Catheters-Associated Urinary Tract Infections: The Role of Coatings and Materials in Infection Prevention. **Antibiotics**, v. 3, n. 1, p. 87-97, 2014.
- LOCKART, S. R. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3352-3359, 2007.
- LOFT, S.; POULSEN, H. E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **J. Mol. Med.**, v. 74, p. 297–312, 1996.
- LOPES, L. Q. S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of glycerol monolaurate nanocapsules against American foulbrood disease agent and toxicity on bees, **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 183-188, 2016.
- LOPES, L. Q. L. et al. Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra(4-pyridyl) platinum(II) porphyrin. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 47–54, 2019.
- LUKSIENE, Z. et al. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Med. (Kaunas)**, v. 39, p. 1137–1150, 2003.
- LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.
- MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, 2005.
- MACKAY, F. S. et al. A potent cytotoxic photoactivated platinum complex. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p. 20743–20748, 2007.

- MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 34-39, 2004.
- MAISCH, T. et al. **Lasers Med. Sci.**, v. 22, p. 83–91, 2007.
- MALATESTI, N. et al. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agentes. **Biophys. Rev.**, v. 9, p. 149–168, 2017.
- MALIK, T. et al. Potentiation of Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* Essential Oil against Selected Uropathogens **Phytother. Res.**, v. 25, p. 1225–1228, 2011.
- MAMONE, L. et al. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 161, p. 222–229, 2016.
- MANG, T. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) Induction of Biofilm Matrix Architectural and Bioadhesive Modifications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2016.
- MANNUCCI, E. et al. Photodynamic topical antimicrobial therapy for infected foot ulcers in patients with diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study—the D.A.N.T.E (Diabetic ulcer Antimicrobial New Topical treatment Evaluation) study. **Acta Diabetol.**, v. 51, p. 435–440, 2014.
- MARCINKIEWICZ, J.; STRUS, M.; PASICH, E. Antibiotic resistance : a “dark side” of biofilm - associated chronic infections. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 123, n. 6, p. 309–313, 2013.
- MARTINEZ, A. et al. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 89, p. 192-206, 2017.
- MCMILLIN, D. R. et al. Understanding binding interactions of cationic porphyrins with Bform DNA. **Cord. Chem. Rev.**, v. 249, p. 1454–1459, 2005.
- MEHNERT-KAY, S. A. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. **Am Fam Physician**, v. 72, p.451–6, 2005.
- MEYER–BETZ, F. Investigations on the biological (photodyanmic) action of hematoporphyrin and other derivatives of the blood and bile pigments. **Arch. Klin. Med.**, v. 112, p. 476–503, 1913.
- MICHELE MIGUEL, E. et al. Formação de biofilmes em trocadores de calor e seus efeitos em leite e derivados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p. 53, 2014.
- MILGROM, L. R.; WARREN, M. J. The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds. **Oxford University Press**, Inc., Oxford, 1997.

- MISBA, L.; ZAIDI, S.; KHAN, A. U. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 24–33, 2017.
- MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Res.**, v. 23, p. 3591-3600, 2003.
- MOBLEY, H. L. T. Virulence of *Proteus mirabilis*. **ASM Press**, p. 245–269, 1996.
- MOBLEY, H. T. L.; WARREN, J. W. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 2216-2217, 1987.
- MOBLEY, H. L. T.; BELAS, R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends in Microbiology**, v. 3, p. 280-284, 1995.
- MOREIRA, L. M. et al. Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. **Aust. J. Chem.**, v. 61, p. 741–754, 2008.
- MORGAN, S. D.; RIGBY, D.; STICKLER, D. J. A study of the structure of the crystalline bacterial biofilms that can encrust and block silver Foley catheters. **Urol Res.**, v. 37, p. 89–93, 2009.
- MORLEY, S. et al. Phase IIa randomized, placebo-controlled study of antimicrobial photodynamic therapy in bacterially colonized, chronic leg ulcers and diabetic foot ulcers: a new approach to antimicrobial therapy. **Br. J. Dermatol.**, v. 168, p. 617–624, 2013.
- MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J.; MCLEAN, R. J. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. **World Journal of Urology**, v. 17, p. 345-350, 1999.
- MOSHAHID KHAN, M. et al. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in animal model of Parkinson's disease. **Neurotox. Res.**, v. 22, p. 1–15, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MROZ, P. et al. Imidazole Metalloporphyrins as Photosensitizers for Photodynamic Therapy: Role of Molecular Charge, Central Metal and Hydroxyl Radical Production. **Cancer Lett.**, v. 8, n. 1, p. 63–76, 2009.
- MUNCHAUSEN, L. L.; RAHN, R. O. Biologic and chemical effects of cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875) on DNA. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 59, p. 643–646, 1975.
- NACEY, J.; DELAHIJNT, B. The evolution and development of the urinary catheter. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 63, n. 10, p. 815-819, 1993.
- NAFEE, N. et al. Antibioticfree nanotherapeutics: hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. **Int. J. Pharm.**, v. 454, p. 249-258, 2013.

- NAGATA, J. Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 9, p. 122–131, 2012.
- NAIK, A. et al. Visible-Light-Induced Annihilation of Tumor Cells with Platinum–Porphyrin Conjugates. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 53, p. 6938–6941, 2014.
- NAKAI, M. et al. Syntheses and photodynamic properties of glucopyranoside-conjugated indium(III) porphyrins as a bifunctional agent. **J Porphyrins Phthalocyanines**, v. 17, p. 1173–82, 2013.
- NIELUBOWICZ, G. R; MOBLEY, H. L. T. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. **Nat Rev Urol.**, v. 7, p. 430–441, 2010.
- NITZAN, Y. et al. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochem. Photobiol.**, v. 55, p. 89–96, 1992.
- NITZAN, Y. et al. **Curr. Microbiol.**, v. 42, n. 408, 2001.
- NOH, H. J. et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 163, p. 106–112, 2015.
- NOWAK, A. et al. Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy—mechanisms and applications. **Postepy Biochem.**, v. 59, p. 53–63, 2013.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendation. **Review on antimicrobial resistance**, p. 1–79, 2016.
- OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 39, p. 1–18, 1997.
- OLIVEIRA, A. et al. Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores. **J. Appl. Microbiol.**, v. 106, p. 1986–95, 2009.
- 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 Trans.**, v. 46, p. 1660–1669, 2017.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: opções de ação**. p. 1–14, 2012. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf?ua=1. Acesso em: 28 de maio de 2021.
- ONISZCZUK, A. et al. The potential of photodynamic therapy (PDT) experimental investigations and clinical use. **Biomed. Pharmacother.**, v. 83 p. 912–929, 2016.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295–304, 1998.

- OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, p. 2181–2196, 2007.
- PANDEY, G. A; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **CID**, v. 38, p. 864-870, 2004.
- PARK, S. B. et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: A critical analysis. **Cancer Journal for Clinicians**, 2013.
- PASINI, A.; ZUNINO, F. **Angew. Chem.**, v. 99, p. 632, 1987.
- PEARSON, M. M. et al. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*: a master of both adherence and motility. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 4027-4037, 2008.
- PEREIRA-ROSA, L.; DA SILVA, F. C. Antimicrobial photodynamic therapy: a new therapeutic option to combat infections. **J. Med. Microb. Diagn.**, v. 3, p. 1–7, 2014.
- PEROTTI, C. et al. Scavengers protection of cells against ALA-based photodynamic therapy-induced damage. **Lasers Med. Sci.**, v. 17, p. 222–229, 2002.
- PEYRONE, M. Ueber die Einwirkung von Ammoniak auf Platinchlorür. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 55, n. 2, p. 205-213, 1845.
- PICKARD, R. et al. Antimicrobial catheters for reduction of symptomatic urinary tract infection in adults requiring short-term catheterisation in hospital: a multicentre randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 380, 2012.
- PITTS, B., M. A. et al. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, p.269-276, 2003.
- POPAT, R. et al. Collective sensing and collective responses in quorum-sensing bacteria. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 12, 2015.
- POTTIER, R. H.; KENNEDY, J. C. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 8, 1990.
- PRATVIEL, G. Porphyrins in complex with DNA: Modes of interaction and oxidation reactions. **Coord. Chem. Rev.**, v. 308, p. 460-477, 2016.
- QUIROGA, E. D. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a tetracationic tentacle porphyrin and its analogue without intrinsic charges in presence of fluconazole. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 13, p. 334–340, 2016.
- RANJBAR-OMID, M. et al. Allicin from garlic inhibits the biofilm formation and urease activity of *Proteus mirabilis* in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, 2015.
- ROSE, R. F.; STABLES, G. I. Topical photodynamic therapy in the treatment of hidradenitis suppurativa. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 5, p. 171-175, 2008.

- ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, p. 698–699, 1965.
- ROSENBERG, B. et al. Platinum-Induced Filamentous Growth in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, p. 716-721, 1967.
- ROSENBERG, B. et al. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. **Cancer res.**, v. 30, p. 1799-1802, 1970.
- SAAD, S. Y. et al. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiology**, v. 31, p. 862–867, 2004.
- SAGRILLO, M. R. et al. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum Meyer*) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chem.**, v. 173, p. 741–748, 2015.
- SAINI, H.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K. Azithromycin and ciprofloxacin: A possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2014.
- SALVARCI, A.; KOROGLU, M.; ERAYMAN, B. Investigation of antibacterial activity and biofilm formation of silicones coated with minocycline-rifampicin, silver nitrate, and nitrofurantoin for short-term utilization in “in vitro” urinary system models. **Urology**, v. 88, p. 66–75, 2016.
- SANDBERG, M. Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 32, p. 233–240, 2008.
- SANTIN, G. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. **Science World Journal**, p.1-9, 2014.
- SHA, S.; GREENWOOD, D. Interactions between antibacterial agents of the quinolone group and nitrofurantoin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 21, p. 41-48, 1988.
- SCHLOTHAUER, J. et al. *In vivo* detection of time-resolved singlet oxygen luminescence under PDT relevant conditions. ed. D. H. Kessel, SPIE, San Francisco, California, USA, p. 755106–755109, 2010.
- SCHWARTZ, S. K. et al. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. **Univ. Minn. Med. Bull.**, v. 27, p. 7–8, 1955.
- SENGUPTA, D. et al. Benzamide porphyrins with directly conjugated and distal pyridyl or pyridinium groups substituted to the porphyrin macrocycles: Study of the photosensitising abilities as inducers of apoptosis in cancer cells under photodynamic conditions. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 2018.
- SHARMA S. K. et al. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. **Curr Pharm Des.**, v. 17, n. 13, p. 1303-1319, 2011.

SHAW, T. et al. Commonality of elastic relaxation times in biofilms. **Physical Review Letters**, v. 93, p. 98-102, 2004.

SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 53-62, 2017.

SHRIVASTAVA, A. et al. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the crosstalk between apoptosis and autophagy. **Mol. Cancer Therapy**, v. 10, p. 1161–1172, 2011.

SONG, C. et al. Influences of graphene oxide on biofilm formation of gram-negative and gram-positive bacteria. **Environ Sci Pollut Res.**, 2017.

SPAETH, A. Cure Cumaric curcuminoids with improved properties and enhanced antimicrobial photodynamic activity. **Eur. J. Med. Chem.**, 2017.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

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

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-138, 2001.

STICKLER, D. J. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. **Natural Clinical Practice Urology**, v. 5, p. 598-608, 2008.

STICKLER, D. J. et al. The structure of urinary catheter encrusting bacterial biofilms. **Cells and Materials**, v. 3, n. 3, p. 315-320, 1993.

STICKLER, D. J. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. **Journal of Internal Medicine**, v. 276, p.120-129, 2014.

STICKLER, D. J.; MORGAN, S. D. Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters. **J Med Microbiol.**, v. 55, p. 489–494, 2006.

SUN, J. et al. Bromopyrrole Alkaloids with the Inhibitory Effects against the Biofilm Formation of Gram Negative Bacteria. **Mar. Drugs**, v. 16, n. 9, 2018.

TASLI, H. et al. Antibacterial Activity of Porphyrin Derivatives Against Multidrug-Resistant Bacteria. **Pak J Pharm Sci.**, v. 32, p. 2369-2373, 2019.

THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 18–31, 2008.

TIM, M. et al. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 150, p. 2–10, 2017.

- TRAUTNER, B. W.; DAROUICHE, R. O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. **American journal of infection control**, v. 32, n. 3, p. 177-183, 2004.
- TRENTIN, D. S., GIORDANI, R. B., MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- VANDRESEN, C. C. et al. *In vitro* photodynamic inactivation of conidia of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum graminicola* with cationic porphyrins. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 15, p. 673–681, 2016.
- VERA, D. M. A. et al. Tegos, Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. **Photochem. Photobiol.**, v. 88, p. 499-511, 2012.
- VERGIDIS, P.; PATEL, R. Novel approaches to the diagnosis, prevention, and treatment of medical device associated infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 173-86, 2012.
- VERSTRAETEN, N. et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in Microbiology**, v.16, n.10, p. 496-506, 2008.
- VIA, L. D.; MAGNO, S. M. Photochemotherapy in the treatment of câncer. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 1405–1418, 2001.
- VIZZOTTO, B. S. et al. DNA photocleavage and melanoma cells cytotoxicity induced by a meso tetra- ruthenated porphyrin under visible light irradiation. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 209, 2020.
- VOLLMERHAUSEN, T. L. et al. Visible and UVA light as a potential means of preventing *Escherichia coli* biofilm formation in urine and on materials used in urethral catheters. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 170, p. 295–303, 2017.
- VUOTTO, C. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **J Appl Microbiol.**, v. 123, p. 1003–18, 2017.
- WANG, D. et al. Black tea supplementation decreases quinocetone-induced ROS generation and oxidative DNA damage in Balb/c mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, 2011.
- WANG, Y. et al. **J. Infect. Dis.**, v.213, p. 1380–1387, 2016.
- WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 319-346, 2015.
- WEINER, M. W.; JACOBS, C. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. **Fed Proc.**, v. 42, p. 2974–2978, 1983.
- WEISS, R. B.; POSTER, D. S. The renal toxicity of cancer chemotherapeutic agentes. **Cancer Treatment Reviews**, v. 9, p. 37–56, 1982.

WILDER-SMITH, C. H. et al. Photoeradication of *Helicobacter pylori* using 5-aminolevulinic acid: preliminary human studies: photoeradication of *Helicobacter pylori*. **Laser Surg. Med.**, v. 31, p. 18-22, 2002.

WILMS, L. C. et al. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes, **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen**, v. 582, p. 155-162, 2005.

WOOD S. et al. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, n. 4, p. 680-684, 2006.

WOOLHOUSE, M.; FARRAR, J. Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature**, v. 509, p. 555-557, 2014.

YANG, D.; ZHANG, Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. **J Hosp Infect.**, v. 68, p. 369–71, 2008.

YIN, R.; CRAIG, HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photosensitizers: drug discovery under the spotlight. **Curr. Med. Chem.**, v. 22, p. 2159–2185, 2015.

YUAN, M. et al. Repurposing the anticancer drug cisplatin with the aim of developing novel *Pseudomonas aeruginosa* infection control agents. **Beilstein J Org Chem.**, v. 14, n. 14, p. 3059-3069, 2018.

ZHAI, L.; YANG, K. W. Porphyrin-vancomycin: a highly promising conjugate for the identification and photodynamic inactivation of antibiotic resistant Gram-positive pathogens. **Dyes Pigments**, v. 120, p. 228–238, 2015.

ZHAO, H. et al. Identification of protease and rpoN-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Microbiology**, v. 145, p. 185-195, 1999.

ZHOU, G. et al. Effects of nutritional and environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation of *Citrobacter werkmanii* BF-6. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1673-82, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – RESULTADOS DE CIM E CBM (µg/mL) DAS PORFIRINAS 3-H₂TPyP E 3-cis-PtTPyP FRENTE AOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Proteus mirabilis*

Isolado clínico	3-H ₂ TPyP				3-cis-PtTPyP			
	Luz		Escuro		Luz		Escuro	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
1	165	330	165	330	41,2	82,5	82,5	82,5
2	165	330	165	330	165	165	82,5	82,5
3	165	330	82,5	330	82,5	165	82,5	165
4	165	330	165	330	41,2	82,5	82,5	82,5
5	82,5	330	82,5	330	20,6	41,2	82,5	165
6	82,5	330	165	330	20,6	165	82,5	82,5
7	82,5	330	165	330	41,2	82,5	82,5	82,5
8	82,5	330	330	330	82,5	165	82,5	165
9	41,2	165	165	165	41,2	165	82,5	82,5
10	82,5	330	165	330	20,6	82,5	82,5	165
11	165	330	165	165	41,2	165	82,5	165
12	82,5	165	330	330	82,5	165	82,5	82,5
13	41,2	330	165	330	41,2	165	82,5	82,5
14	165	330	165	165	20,6	41,2	82,5	82,5
15	165	330	165	330	20,6	41,2	82,5	82,5
16	82,5	330	165	165	82,5	165	82,5	82,5
17	82,5	165	330	330	41,2	165	82,5	165
18	41,2	330	165	330	41,2	82,5	82,5	82,5
19	165	330	165	165	41,2	82,5	82,5	165
20	82,5	330	165	330	82,5	165	82,5	82,5
21	82,5	165	165	330	20,6	165	82,5	82,5
22	82,5	165	330	330	41,2	165	82,5	165
23	165	330	165	165	82,5	165	82,5	82,5

24	41,2	330	330	330	20,6	82,5	82,5	165
25	41,2	165	330	330	20,6	82,5	82,5	165
26	82,5	330	165	165	41,2	82,5	82,5	82,5
27	41,2	330	330	330	20,6	165	82,5	82,5
28	41,2	165	330	330	41,2	82,5	82,5	82,5
29	82,5	330	165	165	20,6	41,2	82,5	82,5
30	82,5	330	330	330	20,6	41,2	82,5	82,5

**APÊNDICE B – RESULTADOS DA FORMAÇÃO DE BIOFILME COM A BACTÉRIA
Proteus mirabilis ATCC 25933**

BHI 24h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
Incubação Bactéria	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
24h	0,089	0,616	Forte	0,104	0,854	Forte	0,087	0,130	Fraco
48h	0,085	0,122	Fraco	0,121	0,412	Moderado	0,084	0,625	Forte
72h	0,104	0,556	Moderado	0,109	0,991	Forte	0,090	0,131	Fraco

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

BHI 48h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
Incubação Bactéria	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
24h	0,086	0,387	Moderado	0,089	0,419	Forte	0,073	0,104	Fraco
48h	0,074	0,233	Fraco	0,095	0,458	Moderado	0,085	0,210	Fraco
72h	0,087	0,561	Forte	0,098	0,669	Forte	0,084	0,150	Fraco

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

BHI 72h de incubação

Incubação Bactéria	% de glicose								
	0%			1%			3%		
	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
24h	0,069	0,407	Forte	0,095	0,577	Forte	0,085	0,135	Fraco
48h	0,085	0,365	Moderado	0,098	0,452	Moderado	0,074	0,142	Fraco
72h	0,082	0,283	Moderado	0,115	0,534	Forte	0,075	0,107	Fraco

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

MH 24h de incubação

Incubação Bactéria	% de glicose								
	0%			1%			3%		
	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
24h	0,090	0,201	Fraco	0,092	0,329	Moderado	0,083	0,456	Forte
48h	0,089	0,264	Moderado	0,100	0,315	Moderado	0,0950	0,489	Forte
72h	0,095	0,276	Moderado	0,116	0,366	Moderado	0,105	0,508	Forte

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

MH 48h de incubação

Incubação Bactéria	% de glicose								
	0%			1%			3%		
	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
24h	0,078	0,176	Fraco	0,096	0,634	Forte	0,08	0,229	Moderado
48h	0,071	0,158	Fraco	0,085	0,241	Moderado	0,077	0,298	Moderado
72h	0,066	0,245	Moderado	0,076	0,388	Moderado	0,079	0,405	Forte

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

MH 72h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
Incubação Bactéria									
24h	0,068	0,197	Moderado	0,068	0,346	Forte	0,069	0,276	Moderado
48h									
72h	0,090	0,150	Fraco	0,080	0,214	Moderado	0,091	0,249	Moderado

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

LB 24h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
Incubação Bactéria									
24h	0,089	0,115	Fraco	0,078	0,120	Fraco	0,066	0,105	Fraco
48h	0,085	0,142	Fraco	0,077	0,114	Fraco	0,074	0,132	Fraco
72h	0,084	0,121	Fraco	0,081	0,125	Fraco	0,071	0,141	F

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

LB 48h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
Incubação Bactéria									
24h	0,071	0,087	Fraco	0,084	0,114	Fraco	0,066	0,102	Fraco
48h	0,075	0,121	Fraco	0,074	0,119	Fraco	0,075	0,123	Fraco
72h	0,087	0,113	Fraco	0,083	0,111	Fraco	0,089	0,133	Fraco

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

LB 72h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
Incubação Bactéria	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
24h	0,077	0,125	Fraco	0,082	0,088	Não formador	0,076	0,142	Fraco
48h	0,078	0,115	Fraco	0,098	0,185	Fraco	0,072	0,121	Fraco
72h	0,075	0,082	Não formador	0,087	0,152	Fraco	0,074	0,165	Fraco

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

TS 24h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
Incubação Bactéria	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
24h	0,094	0,089	Não formador	0,085	0,175	Fraco	0,063	0,142	Fraco
48h	0,081	0,099	Fraco	0,071	0,162	Fraco	0,078	0,157	Fraco
72h	0,079	0,086	Fraco	0,070	0,155	Fraco	0,079	0,136	Fraco

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

TS 48h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
Incubação Bactéria									
24h	0,085	0,096	Não formador	0,089	0,132	Fraco	0,096	0,147	Fraco
48h	0,099	0,187	Fraco	0,087	0,145	Fraco	0,087	0,158	Fraco
72h	0,079	0,078	Não formador	0,074	0,079	Não formador	0,081	0,125	Fraco

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo

TS 72h de incubação

	% de glicose								
	0%			1%			3%		
	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme	CN	CP	Biofilme
Incubação Bactéria									
24h	0,067	0,100	Fraco	0,085	0,126	Fraco	0,078	0,117	Fraco
48h	0,074	0,110	Fraco	0,087	0,145	Fraco	0,085	0,091	Não formador
72h	0,088	0,093	Fraco	0,082	0,123	Fraco	0,092	0,145	Fraco

CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo



Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpt

Investigation of the triplet excited state and application of cationic meso-tetra(cisplatin)porphyrins in antimicrobial photodynamic therapy

Dariane Clerici Jornada^a, Rafael de Queiroz Garcia^b, Carolina Hahn da Silveira^c,
Lino Misoguti^b, Cleber Renato Mendonça^b, Roberto Christ Vianna Santos^a,
Leonardo De Boni^{b,*}, Bernardo Almeida Iglesias^{c,*}

^a Laboratório De Pesquisas Em Microbiologia Oral, Departamento De Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal De Santa Maria, Av. Korlândia 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^c Laboratório De Eletroquímica e Materiais Porfíricos, Departamento De Química, Universidade Federal De Santa Maria, UFSM, Av. Korlândia 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Pt(II) porphyrin
ROS generation
Antimicrobial activity
Antimicrobial photodynamic therapy

ABSTRACT

In this manuscript, we report, the photophysical study of triplet excited states and antimicrobial photo-inactivation of positively charged tetra-cisplatin porphyrin derivatives against Gram + and Gram - bacterial strains. Isomeric cisplatin-porphyrins were used and applied in aPDT assays in the bacilli *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negative) and a cocci *Staphylococcus aureus* (Gram positive) strains. The results show that compound substituted at meta position (3-cis-PtTPyP) is the more efficient photosensitizer against bacteria culture. In this way, tetra-cationic porphyrins containing cisplatin derivatives might be promising aPDT agents with potential applications in clinical infections.

1. Introduction

Porphyrins are a group of tetrapyrrolic macrocyclic molecules, that have an extensive history of applications as photosensitizers (PS) and continue to be studied for artificial photosynthesis [1], bioanalytical detection [2], photocatalysis [3,4,5], photobiology [6] and even photodynamic applications [7]. Presently, there is a great interest in further exploring porphyrins with distinct functional groups and metal complexes, thus pursuing the betterment of a set of properties, e.g., enhanced production of one type of reactive oxygen species between singlet oxygen (1O_2) and radical species ($\bullet OH$, $O_2^{\bullet -}$, $\bullet OOH$), bio-specificity in cancer or antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) or a simple increase in singlet to triplet conversion.

Currently, the search for new and effective strategies to treat infections originating from pathogenic microorganisms has become one of the main objectives of microbiology [8]. However, this search has not been easy, due to the multiple resistance of microorganisms to existing antimicrobials and patients' non-adherence to follow the treatment until the end [9,10]. Thus, treating infections caused by multidrug-resistant microorganisms (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),

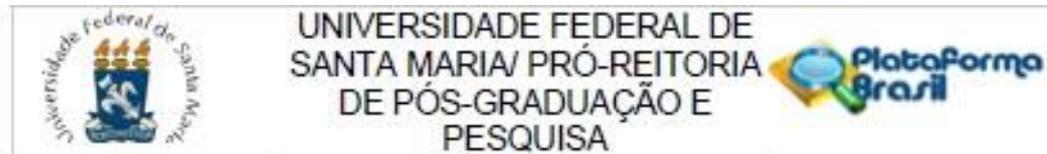
vancomycin-resistant *Enterococcus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* spp. and *Proteus* spp.) with existing antimicrobials it has become an arduous task [2,3,11,12,13,14]. For these reasons, the World Health Organization pointed to the urgency to develop new antimicrobials for the treatment of multidrug-resistant strains [7]. This same organization pointed out in 2017 that if nothing is done in this regard, microbial infections will be the main cause of death in the world by 2050, even surpassing cancer, the current leader [7,15,16].

Thus, new treatment approaches such as antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) are becoming a great alternative to treat microorganisms that are resistant to conventional antimicrobials [17]. This approach consists of the use of light, oxygen and a photosensitizer, which when excited produces reactive oxygen species (ROS). Cellular inactivation results from the interaction of ROS with various targets of the microbial cell, such as lipids, nucleic acids or proteins, causing damage to the cell structure or alteration of function [18]. The main reason why this approach is being used more and more is its action on multiple targets [19] and also the non-creation of resistant strains [20, 21].

* Corresponding author.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CEP DA UFSM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade antibiofilme e anti-fatores de virulência de porfirinas meso-tetra (piridil) contendo cisplatina

Pesquisador: Roberto Christ Vianna Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42122821.1.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.528.054

Apresentação do Projeto:

O projeto se intitula "Atividade antibiofilme e anti-fatores de virulência de porfirinas meso-tetra (piridil) contendo cisplatina" e se vincula ao CCS.

No resumo do projeto o seguinte texto: "Os biofilmes são responsáveis por até 80% das infecções hospitalares resistentes aos antimicrobianos. Grande parte dos microrganismos está associada a infecções relacionadas a dispositivos médicos, como cateteres urinários e nesse contexto, estima-se que 90-100% dos pacientes que se submetem a cateterismo de longo prazo desenvolvem bacteriúria, sendo *Proteus mirabilis* o microrganismo responsável por 20-45% das infecções relacionadas ao cateterismo. Essa bactéria produz um biofilme mais abundante que outras bactérias, chamado de biofilme cristalino. Esta situação pode acarretar formação de cristais e o consequente bloqueio do cateter. Já foram realizadas tentativas para evitar a colonização e infecção bacteriana, incorporando agentes antimicrobianos nos cateteres, entretanto os resultados obtidos até o momento não foram conclusivos. Outro motivo que aumenta a preocupação acerca desse microrganismo é que o mesmo produz importantes fatores de virulência, como a motilidade (flagelos permitem que o microrganismo se mova vigorosamente da uretra para atingir os tecidos da bexiga e permitir contato próximo com as células epiteliais da mesma) e produção da enzima urease (hidrolisa a ureia em amônia, elevando o pH da urina, favorecendo a formação de cristais).

Endereço: Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - sala 763 - Sala Comitê de Ética - 97105-900 - Santa
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E
PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.528.054

Tendo em vista o exposto acima, devido à dificuldade de tratamento dos biofilmes, novas alternativas têm sido testadas diariamente para combater infecções e a terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma estratégia emergente para o tratamento de microrganismos resistentes a antimicrobianos. Essa terapia utiliza um fotossensibilizador e luz com comprimento de onda específico para geração de radicais livres e/ou oxigênio singlete. Dentre os fotossensibilizadores utilizados, as porfirinas têm sido extensivamente avaliadas, uma vez que já demonstraram ser eficientes contra diversos microrganismos, além da possibilidade de algumas, serem solúveis em água. Deste modo, este trabalho visa avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme, anti-fatores de virulência de porfirinas sobre a cepa ATCC 25933 de *P. mirabilis* e isolados clínicos."

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a atividade antibiofilme e anti-fatores de virulência de porfirinas frente a bactéria *P. mirabilis*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Tendo em vista características do projeto a descrição de riscos e benefícios pode ser considerada suficiente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória podem ser considerados suficientes.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <https://www.ufsm.br/pro-reitorias/prpgp/cep/> - modelos e orientações para apresentação dos documentos. ACOMPANHE AS ORIENTAÇÕES DISPONÍVEIS, EVITE PENDÊNCIAS E AGILIZE A TRAMITAÇÃO DO SEU PROJETO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

.

Endereço: Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - sala 763 - Sala Comitê de Ética - 97105-900 - Santa
Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cqp.ufsm@gmail.com

Continuação do Parecer: 4.528.054

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1687738.pdf	15/01/2021 10:44:05		Acelto
Outros	SolicitacaoHUSM.pdf	15/01/2021 10:43:17	DARIANE JORNADA CLERICI	Acelto
Outros	husm.pdf	15/01/2021 10:42:07	DARIANE JORNADA CLERICI	Acelto
Outros	RegistroGAP.pdf	15/01/2021 10:41:17	DARIANE JORNADA CLERICI	Acelto
Outros	termodeconfidencialidade.pdf	15/01/2021 10:38:10	DARIANE JORNADA CLERICI	Acelto
Folha de Rosto	Folhaderostoassinada.pdf	15/01/2021 10:37:07	DARIANE JORNADA CLERICI	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	08/01/2021 16:01:56	Roberto Christ Vianna Santos	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/01/2021 16:01:29	Roberto Christ Vianna Santos	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 07 de Fevereiro de 2021

**Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador(a))**

Endereço: Avorida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - sala 763 - Sala Comitê de Ética - 97105-900 - Santa Maria - Camobi CEP: 97.105-970
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cqp.ufsm@gmail.com