



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

**Ticiane da Rosa Pinheiro**

**APLICAÇÃO DE PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS PARA  
FOTOINATIVAÇÃO DE *Candida albicans* NO TRATAMENTO DE ONICOMICOSE**

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.  
Dezembro de 2023

**Ticiane da Rosa Pinheiro**

**APLICAÇÃO DE PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS PARA  
FOTOINATIVAÇÃO DE *Candida albicans* NO TRATAMENTO DE ONICOMICOSE**

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**.

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.  
Dezembro de 2023

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

DA ROSA PINHEIRO, TICIANE  
APLICAÇÃO DE PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS PARA  
FOTOINATIVAÇÃO DE CANDIDA ALBICANS NO TRATAMENTO DE  
ONICOMICOSE / TICIANE DA ROSA PINHEIRO.- 2023.  
49 p.; 30 cm

Orientador: BERNARDO ALMEIDA IGLESIAS  
Coorientador: ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2023

1. PORFIRINAS 2. TERAPIA FOTODINÂMICA 3. 3PtTPyP 4.  
ONICOMICOSE 5. Candida albicans I. ALMEIDA IGLESIAS,  
BERNARDO II. CHRIST VIANNA SANTOS, ROBERTO 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, TICIANE DA ROSA PINHEIRO, 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.

**Ticiane da Rosa Pinheiro**

**APLICAÇÃO DE PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS PARA  
FOTOINATIVAÇÃO DE *Candida albicans* NO TRATAMENTO DE ONICOMICOSE**

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 18 de dezembro de 2023.

---

Bernardo Almeida Iglesias, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

---

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)  
(Co-orientador)

---

Cheila Denise Ottonelli Stopiglia, Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)

---

Juliana Felipetto Cargnelutti, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)

---

Daniela Fernandes Ramos Soares, Dr<sup>a</sup>. (FURG)

---

Ana Rita Sokolonski Anton, Dr<sup>a</sup>. (UFBA)

Santa Maria, RS.  
2023

## RESUMO

### APLICAÇÃO DE PORFIRINAS TETRA-CATIÔNICAS PARA FOTOINATIVAÇÃO DE *Candida albicans* NO TRATAMENTO DE ONICOMICOSE

AUTORA: Ticiane da Rosa Pinheiro

ORIENTADOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna dos Santos

A onicomicose é uma das infecções fúngicas mais prevalentes entre os distúrbios de unhas. Fungos dermatófitos são os principais agentes causadores, porém leveduras do gênero *Candida* são patógenos emergentes associados a essas infecções. Espécies do gênero *Candida* são constituintes naturais da microbiota humana, mas comportam-se como patógenos oportunistas na presença de alterações homeostáticas do organismo, causando infecções. Além disso, esses fungos são capazes de formar biofilme, produzindo uma matriz polimérica extracelular que se adere fortemente à superfície sólida, conferindo proteção a população microbiana. Os tratamentos usuais para onicomicose restringem-se ao uso de agentes antifúngicos de administração oral e tópica. Porém, o longo período do tratamento e os efeitos indesejáveis dificultam a adesão à terapia, podendo tornar a doença recorrente. Nesse contexto, a fotoinativação de micro-organismos é uma terapia alternativa, que utiliza um composto fotossensível ativado (fotossensibilizador), capaz de produzir espécies reativas, induzindo a morte celular. As porfirinas *meso*-tetra-substituídas são relatadas como bons fotossensibilizadores, devido sua eficácia na fotoinativação. O objetivo desse estudo foi avaliar, pela primeira vez, o potencial antifúngico e antibiofilme da aplicação de porfirinas tetra-catiônicas na fotoinativação de *C. albicans*, visando o tratamento de onicomicoses. A concentração inibitória e fungicida mínima das porfirinas **3PtTPyP** e **4PtTPyp** e **3H<sub>2</sub>TPyP** e **4H<sub>2</sub>TPyP** foi avaliada e os resultados demonstraram eficácia maior da porfirina **3PtTPyP** contra os isolados testados sob irradiação sendo o composto de escolha para os próximos testes. A curva de viabilidade celular demonstrou que ocorreu a inibição de *C. albicans* ATCC 14053 em 60 minutos e de *C. albicans* ATCC SC5314 em apenas 30 minutos de exposição à luz. O possível mecanismo de fotooxidação foi misto com produção de espécies radiculares hidroperoxil e oxigênio singlete. O ensaio de associação entre porfirina e antifúngicos convencionais demonstrou atividade indiferente. Foram formados biofilmes de *C. albicans in vitro* e em modelo *ex vivo* de unhas e após tratamento com **3PtTPyP** as diferentes concentrações testadas foram capazes de destruir de forma significativa o biofilme quando comparado ao controle positivo. A Microscopia de Força Atômica (MFA) mostrou os danos causados na morfologia, estrutura e adesão celular após tratamento com fotossensibilizador. Os ensaios de citotoxicidade não evidenciaram potencial tóxico às células de queratinócitos e fibroblastos sendo as concentrações testadas seguras para uso na TFD. Este estudo revelou que a TFD utilizando porfirinas contendo complexos periféricos de Pt(II) pode ser um promissor candidato como tratamento alternativo contra infecções fúngicas de onicomicose.

**Palavras-chave:** Porfirinas. Terapia Fotodinâmica. 3PtTPyP. Onicomicose. *Candida albicans*.

## ABSTRACT

### APPLICATION OF TETRA-CATIONIC PORPHYRINS FOR *Candida albicans* PHOTOINACTIVATION FOR THE TREATMENT OF ONYCHOMYCOSIS

AUTHOR: Ticiane da Rosa Pinheiro  
ADVISOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias  
CO-ADVISOR: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna dos Santos

Onychomycosis is one of the most prevalent fungal infections among nail disorders. Dermatophyte fungi are the main causative agents, but yeasts of the *Candida* genus are emerging pathogens associated with these infections. Species of the *Candida* genus are natural constituents of the human microbiota, but behave as opportunistic pathogens in the presence of homeostatic changes in the body, causing infections. In addition, these fungi are capable of forming biofilms, producing an extracellular polymeric matrix that strongly adheres to the solid surface, providing protection to the microbial population. The usual treatments for onychomycosis are restricted to the use of oral and topical antifungal agents. However, the long period of treatment and the undesirable effects make it difficult to adhere to therapy, which can make the disease recurrent. In this context, the photoinactivation of microorganisms is an alternative therapy, which uses an activated photosensitive compound (photosensitizer), capable of producing reactive species, inducing cell death. Meso-tetra-substituted porphyrins are reported to be good photosensitizers due to their effectiveness in photoinactivation. The objective of this study was to evaluate, for the first time, the antifungal and antibiofilm potential of the application of tetracationic porphyrins in the photoinactivation of *C. albicans*, aiming at the treatment of onychomycosis. The minimum inhibitory and fungicidal concentration of the porphyrins **3PtTPyP** and **4PtTPyP** and **3H<sub>2</sub>TPyP** and **4H<sub>2</sub>TPyP** was evaluated and the results demonstrated greater efficacy of the porphyrin **3PtTPyP** against the isolates tested under irradiation, being the compound of choice for the next tests. The cell viability curve showed that there was inhibition of *C. albicans* ATCC 14053 in 60 minutes and of *C. albicans* ATCC SC5314 in just 30 minutes of exposure to light. The possible photooxidation mechanism was mixed with production of hydroperoxyl radical species and singlet oxygen. The association assay between porphyrin and conventional antifungals showed indifferent activity. *C. albicans* biofilms were formed *in vitro* and in an *ex vivo* nail model and after treatment with **3PtTPyP**, the different concentrations tested were able to significantly destroy the biofilm when compared to the positive control. Atomic force microscopy showed the damage caused to cell morphology, structure and adhesion after photosensitizer treatment. The cytotoxicity tests did not show any toxic potential to keratinocyte and fibroblast cells, with the concentrations tested being safe for use in PDT. This study revealed that PDT using porphyrins containing peripheral Pt(II) complexes may be a promising candidate as an alternative treatment against onychomycosis fungal infections.

Keywords: Porphyrins. Photodynamic Therapy. **3PtTPyP**. Onychomycosis. *Candida albicans*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	8
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
3.1	ONICOMICOSE.....	9
3.2	<i>Candida albicans</i> .....	10
3.3	BIOFILMES DE <i>Candida albicans</i> .....	11
3.4	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	12
3.5	FOTOINATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS .....	13
3.6	FOTOSENSIBILIZADORES PORFIRÍNICOS .....	14
3.7	MECANISMOS DE FOTOINATIVAÇÃO .....	14
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
4.1	AMOSTRAS .....	16
4.2	FOTOSENSIBILIZADORES .....	16
4.3	FONTE DE LUZ .....	17
4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) .....	17
4.5	ENSAIO DE CURVA DE VIABILIDADE CELULAR .....	17
4.6	DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	18
4.7	TÉCNICA DE CHECKERBOARD.....	18
4.8	ENSAIO DE FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME <i>in vitro</i> .....	19
4.9	ENSAIO DE FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME <i>ex vivo</i> .....	20
4.10	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	21
4.11	CITOTOXICIDADE.....	21
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
5.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	23
5.2	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) .....	23
5.3	CURVA DE VIABILIDADE CELULAR .....	27
5.4	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	29
5.5	CHECKERBOARD .....	30
5.6	FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME <i>in vitro</i> .....	31

5.7	FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME <i>ex vivo</i> .....	33
5.8	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	35
5.9	CITOTOXICIDADE.....	37
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A onicomicose é uma infecção superficial causada por fungos, considerada uma das mais prevalentes entre os distúrbios ungueais existentes (EFFENDY *et al.*, 2005). Essa infecção ocorre devido ao desenvolvimento de fungos que encontram em locais úmidos e escuros, condições ótimas para sua multiplicação e utilizam a queratina das unhas como fonte de nutriente, resultando em enfraquecimento, descoloração, distrofia, aumento da espessura podendo levar ao descolamento da lâmina (BHATTA; KEYAL; WANG, 2016; EFFENDY *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2017). Fungos dermatófitos são os principais agentes causadores de onicomicose, porém leveduras do gênero *Candida* vêm sendo relatadas como patógeno emergente associado a essas infecções, principalmente a *Candida albicans*. Essas leveduras fazem parte da microbiota natural dos seres humanos, contudo, devido a alterações fisiológicas e/ou patológicas do organismo, podem se manifestar na forma infecciosa causando candidíase. Ainda, são capazes de formar biofilmes através da produção de uma matriz polimérica extracelular que se adere fortemente à uma superfície sólida, altamente resistente à agentes antifúngicos conferindo proteção a uma população microbiana (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018; GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; JAYATILAKE *et al.*, 2009; ODDS *et al.*, 1988).

O tratamento convencional para onicomicose é baseado na administração tópica e oral de agentes antifúngicos. A administração tópica apresenta a desvantagem de baixa penetração no leito ungueal, local de desenvolvimento do micro-organismo, exigindo persistência do paciente durante longo período de uso, além de possível recorrência da infecção. Já os antifúngicos orais penetram no leito e placa ungueal, porém, os efeitos indesejáveis comumente relatados como distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça, náuseas e problemas hepáticos, dificultam a adesão ao tratamento (KREIJKAMP-KASPERS *et al.*, 2017; KUSHWAHA *et al.*, 2015; MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2014). Ainda, alguns micro-organismos causadores da onicomicose são capazes de formar biofilme produzindo uma matriz polimérica que faz a população microbiana ficar fortemente aderida favorecendo sua resistência, resultando em um fator limitante ao tratamento (CIEPLIK *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2013).

A fotoinativação microbiana é uma terapia realizada combinando luz visível, um composto fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular. Logo após ser irradiado, o FS absorve luz e pode desencadear foto-oxidação por dois mecanismos, sendo: Tipo I relacionado com danos por meio de espécies radicalares ou peróxido de hidrogênio, levando a formação de radicais como hidroxila e superóxido, e Tipo II relacionado com a

transferência de energia do FS para moléculas de oxigênio, resultando em espécies reativas de oxigênio, capazes de provocar danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, levando a morte celular (PERVAIZ; OLIVO, 2006; WILSON; PATTERSON, 2008; LOPES *et al.*, 2018). O uso de porfirinas *meso*-tetra-substituídas como FS vêm apresentando ótimos resultados, uma vez que a inserção de cargas modula a atividade do FS que interage melhor com as biomoléculas celulares aumentando a eficácia da fotoinativação (ALVES *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2016; TRANNOY *et al.*, 2010).

A descoberta por novos medicamentos antifúngicos caminha a passos lentos enquanto a resistência fúngica é emergente, com isso, a fotoinativação microbiana mostra-se como uma terapia alternativa promissora no combate de infecções bacterianas/fúngicas, pois além de não ser uma técnica invasiva, não há relatos na literatura de mecanismos de resistência e pode ser utilizada em indivíduos comórbidos (BAHTTA *et al.*, 2016; BALTAZAR *et al.*, 2015; HAMBLIN, 2016).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico e antibiofilme da aplicação de porfirinas tetra-catiônicas na fotoinativação de *C. albicans*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima das porfirinas frente aos isolados;
- Determinar a concentração inibitória mínima do antifúngico frente aos isolados;
- Determinar o efeito do tempo de irradiação da porfirina com luz branca;
- Avaliar o possível mecanismo de fotoinativação através da determinação das espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar a associação da terapia combinada *in vitro* da porfirina e antifúngico;
- Avaliar a formação e destruição do biofilme *in vitro*;
- Avaliar a formação e destruição do biofilme em modelo *ex vivo* de unhas;
- Analisar através da microscopia de força atômica o dano celular e força de adesão, das amostras tratadas.
- Avaliar a citotoxicidade das porfirinas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. ONICOMICOSE

A onicomicose é uma das infecções fúngicas superficiais mais prevalentes entre os distúrbios das unhas existentes, sendo um importante problema de saúde pública (EFFENDY *et al.*, 2005). O desenvolvimento da onicomicose ocorre devido a diferentes fatores como: idade avançada, uso excessivo de calçados fechados, traumas nas unhas e atividades esportivas. Além disso, doenças imunossupressoras (diabetes, psoríase, câncer, artrite reumatóide) podem aumentar a suscetibilidade à doença (GHANNOUM *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2016; LIPNER; SCHER, 2019). Essa infecção ungueal ocorre devido à proliferação de fungos dermatófitos, leveduras e não dermatófitos, que obtém nutrientes provenientes da queratinização, causando descoloração ou hipercoloração, descamação e aumento da espessura das unhas podendo levar ao descolamento da lâmina (onicólise). Esses micro-organismos encontram condições favoráveis para seu crescimento em lugares úmidos e escuros, como por exemplo, calçados fechados, sendo as unhas dos pés mais suscetíveis à tal infecção (BHATTA; KEYAL; WANG, 2016; EFFENDY *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2017).

Os principais agentes causadores de onicomicose são os fungos dermatófitos como *Trichophyton rubrum*, porém, leveduras do gênero *Candida* como *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* nas últimas décadas estão sendo relatadas como patógeno emergente associado a essa infecção, principalmente em indivíduos comórbidos (FERREIRA *et al.*, 2019; GE *et al.*, 2019; GUPTA *et al.*, 2020; MUGGE; HAUSTEIN; NENOFF, 2006; OTASEVIC *et al.*, 2016 ). Um grande número de estudos mostra diferença na prevalência dos agentes causadores de onicomicose onde a localização geográfica dos pacientes influencia na distribuição dos patógenos envolvidos. Pesquisas realizadas em países da América do Norte e continente Europeu revelam prevalência de fungos dermatófitos relacionados à onicomicose (MUGGE; HAUSTEIN; NENOFF, 2006; SIGURGEIRSSON; BARAN, 2014). Entretanto, as leveduras aparecem em maior proporção como principal causador de onicomicose em estudos feitos nos países da América do Sul, África e Ásia (FATAHINIA *et al.*, 2017; GODOY-MARTINEZ *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010; SYLLA *et al.*, 2019). Aparentemente, países com clima mais quente apresentam uma tendência epidemiológica emergente de patógenos fúngicos não dermatófitos e leveduras relacionados a infecções ungueais.

As opções de tratamento restringem-se a administração oral (azóis e terbinafina) e/ou tópica (amorolfina e ciclopirox) de agentes antifúngicos, geralmente de ação fungistática e não fungicida, podendo tornar a infecção recorrente. Embora os antifúngicos tópicos apresentem a vantagem de efeitos adversos reduzidos, o tratamento exige um longo período de administração e sua eficácia é limitada pela baixa penetração ao leito ungueal, onde o fungo se desenvolve. Já os medicamentos orais são capazes de penetrar no leito e placa ungueal, contudo, os efeitos adversos de distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça, náuseas e problemas hepáticos, acabam dificultando a adesão ao tratamento (KREJKAMP-KASPERS *et al.*, 2017; KUSHWAHA *et al.*, 2015; MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2014). Outro fator limitante ao tratamento da onicomicose é a formação do biofilme, onde os micro-organismos produzem uma matriz polimérica altamente compactada aderindo fortemente à população microbiana, com a finalidade de proteção contra agressões (mecânicas, medicamentos, sistema imune, irradiação UV) aumentando assim sua sobrevivência (CIEPLIK *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2013). A resistência fúngica é emergente, enquanto o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos caminha a passos lentos, pois um dos maiores desafios é a identificação de um novo agente que seja eficaz sobre a célula fúngica e atóxica para célula hospedeira, haja vista que a célula fúngica é eucariótica assim como a célula humana (BAHTTA *et al.*, 2016; BALTAZAR *et al.*, 2015; MUKHERJEE *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012). Diante de diversas limitações, a demanda por tratamentos mais seguros é alta, e, com isso, a fotoinativação microbiana ganha espaço na pesquisa como uma terapia alternativa contra as infecções fúngicas.

### 3.2. *Candida albicans*

Leveduras do gênero *Candida* são organismos unicelulares, eucariontes, pertencentes ao reino *Fungi*, constituintes da microbiota natural da boca, mucosas, pele, vagina e trato digestivo que convivem de forma comensal com o indivíduo saudável. Contudo, são fungos oportunistas, inofensivos em seu habitat natural, que podem se manifestar na forma infecciosa em decorrência de alterações homeostáticas no organismo humano (orgânicas, fisiológicas, patológicas) causando candidíase ou candidose, podendo atingir superfícies cutâneas (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; JAYATILAKE *et al.*, 2009; ODDS *et al.*, 1988). Além disso, esses micro-organismos possuem em seu favor enzimas hidrolíticas extracelulares que constituem o fator de virulência desse gênero. Essas enzimas têm capacidade de degradar queratina, mucina e colágeno das células hospedeiras, além de

deteriorar componentes do sistema imunológico favorecendo o aumento da aderência ao tecido e maturação do biofilme, avançando assim o processo infeccioso (CAVALCANTE, 2017; VIEIRA, 2016). Aproximadamente 200 espécies constituem o gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie oportunista isolada com maior frequência em humanos. Entretanto, dados epidemiológicos mostram espécies patogênicas de *Candida* não *albicans* (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. auris*) com crescimento emergente (BEN-AMI *et al.*, 2017; DEORUKHKAR *et al.*, 2015; PAPON *et al.*, 2013).

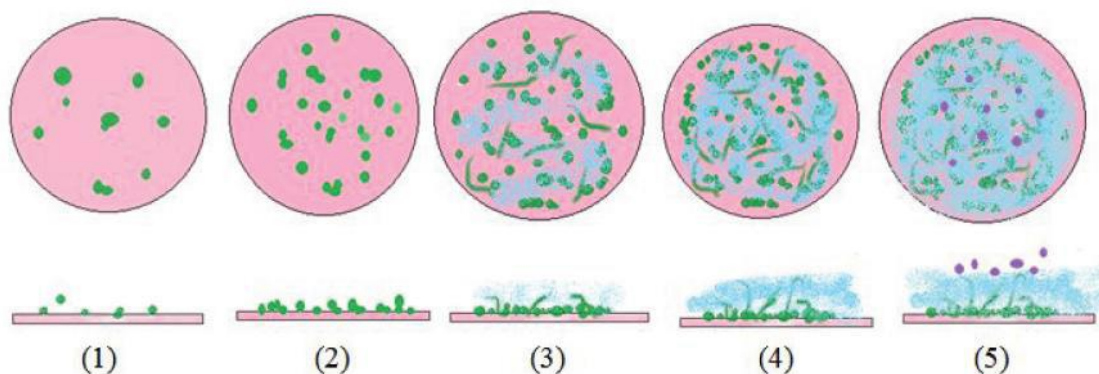
Espécies de *Candida* como agentes causadores da onicomicose variam geograficamente, dessa forma sua epidemiologia não está bem elucidada. A *C. albicans* e *C. parapsilosis* são as espécies mais relatadas em isolados clínicos dessa infecção e sua incidência em geral está associada a múltiplos fatores como hemodiálise, transplantes, doenças imunossupressoras e até prematuridade (AGHAMIRIAN; DAS *et al.*, 2007; GHIASIAN, 2010; FENG *et al.*, 2015; TROFA *et al.*, 2008; SAV *et al.*, 2018). A candidíase ungueal causada por *Candida albicans* inicialmente provoca alterações no aspecto da lâmina ungueal causando espessamento, geralmente assintomático. Posteriormente, as unhas acometidas tornam-se frágeis, com alteração na cor e onicólise. Ao progredir, essa condição patológica passa a causar desconforto, dor e eritema no tecido periungueal, comprometendo a qualidade de vida e afetando atividades diárias, sociais e físicas (TOSTI; PIRACCINI, 2018).

### 3.3. BIOFILMES DE *Candida albicans*

Os biofilmes são definidos como populações de células microbianas organizadas e complexas com capacidade de adesão a uma superfície, envoltos por uma matriz de produtos extracelulares produzidos pelos próprios micro-organismos para fornecer proteção à população microbiana que consegue se manter viável mesmo sob condições desfavoráveis. O biofilme de *C. albicans* acontece de forma complexa, e compreende quatro etapas, sendo a fase de adesão a etapa inicial e mais importante para garantir a formação do biofilme. A aderência das leveduras está associada às adesinas presentes na parede celular fúngica que interagem com a matriz extracelular do hospedeiro (ATRIWAL *et al.*, 2022; BORGHI *et al.*, 2014; SARDI *et al.*, 2014). Seguido da adesão as microcolônias se proliferam na base superficial e as hifas começam a se desenvolver na camada superior levando a fase de maturação do biofilme que ocorre nas primeiras 18h a 24h. O biofilme maduro (24h a 48h) é composto por leveduras, hifas e pseudo-hifas entrelaçadas entre si envoltas por uma matriz

extracelular densa. A etapa final ocorre quando as células se dispersam para colonizar novos locais e formar novos biofilmes (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018; CHEN *et al.*, 2013).

Figura 1. Etapas de formação do biofilme



(1) aproximação e adesão das leveduras à superfície. (2) leveduras formando micro-colônias na base superficial (3) hifas formando uma camada superior. (4) biofilme maduro constituído de leveduras, hifas e matriz extracelular. (5) difusão de novos esporos.

Fonte: GU *et al.*, 2015.

### 3.4. TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) é descrita basicamente como a utilização de um composto fotossensível ativado por um determinado comprimento de onda, capaz de produzir espécies reativas, induzindo a apoptose celular (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). Essa terapia teve início nas antigas civilizações, onde os antepassados faziam uso da luz combinada com sementes de *Psoralea corylifolia* no tratamento de doenças como vitiligo e psoríase (BONNETT, 2014). O uso terapêutico da luz teve início em 1900, na Alemanha, quando Oscar Raab, relatou que baixas concentrações do corante laranja de acridina, associado à luz, inibiam o crescimento de alguns micro-organismos como *Paramecium caudatum* (RAAB,1900).

Em 1903, a primeira aplicação clínica de uso tópico da TFD foi utilizada no tratamento de neoplasia cutânea e, em 1907, Tappeiner sugeriu que a interação entre a luz, compostos fotossensibilizadores e moléculas de oxigênio resultavam na morte dos tecidos tumorais devido ao estresse oxidativo provocado (VON TAPPEINER, 1903; VON TAPPEINER; JODLBAUER, 1907). Em 1920, foi observado que o tecido tumoral apresentava mais fluorescência que o tecido saudável e que moléculas de porfirinas apresentavam toxicidade às células humanas na presença de luz (POLICARD, 1924). Então, em 1940, porfirinas naturais foram administradas em pacientes com tumores a fim de

detectar mais precisamente o tecido afetado através da fluorescência emitida (FIGGE, 1945; RASSMUSSEN-TAXDAL *et al.*, 1955).

O campo da TFD teve seu grande avanço em 1960, quando Schwartz desenvolveu um derivado da porfirina, denominado hematoporfirina (HpD) duas vezes mais tóxico, utilizado posteriormente por Lipson como agente fotossensibilizador na destruição de tecidos tumorais (LIPSON; GRAY; BALDES, 1966; MOORE 1993). Weishaupt e colaboradores identificaram, no fim dos anos 70, que o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) era o principal produto citotóxico gerado pela reação de luz, fotossensibilizador e moléculas de oxigênio (WEISHAUPT *et al.*, 1976). Com isso, a TFD passou a ser usada contra diversos tipos de câncer, doenças ginecológicas, periodontais, dermatológicas e infecções (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; HONGCHARU *et al.*, 2000; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; MAISCH, 2015).

### 3.5. FOTOINATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Embora a aplicabilidade da TFD contra micro-organismos tenha sido demonstrada há mais de 100 anos, essa técnica foi aprimorada e desenvolvida como uma terapia anticâncer e, sua utilização como terapia antimicrobiana permaneceu ociosa por muitos anos, pois em 1940, as penicilinas marcaram o início da era dos antimicrobianos usado contra infecções (FERNANDES, 2000; MOAN; PENG, 2003; WAINWRIGHT, 2002). Já em 1945, o primeiro relato de bactérias resistentes à penicilina era descrito (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). O uso excessivo de antimicrobianos, a dose/duração do tratamento, utilizações inadequadas e o uso desses agentes em ambiente e animais geraram uma pressão seletiva nos micro-organismos que desenvolveram múltiplas estratégias de resistência. Assim, a resistência antimicrobiana, é atualmente um dos mais emergentes problemas de saúde global e ecológico de significativa complexidade, atingindo seres humanos, meio ambiente e animais (WHO, 2015; SO *et al.*, 2015; ZINSSTAG *et al.*, 2012).

De tal forma, a fotoinativação de micro-organismos torna a ser alvo dos pesquisadores como uma terapia alternativa no controle de diferentes infecções fúngicas e/ou bacterianas localizadas e também de desinfecções, dada sua eficácia sobre a morte de micro-organismos, inclusive os multirresistentes, bem como a ausência de relatos de mecanismos de resistência à TFD antimicrobiana (TFDa) (HAMBLIN, 2016; JORI *et al.*, 2006).



### 3.6. FOTOSSENSIBILIZADORES PORFIRÍNICOS

As porfirinas são macrociclos tetrapirrólicos com vinte átomos de carbono e quatro átomos de nitrogênio interligados formando uma estrutura aromática. São fotossensibilizadores capazes de absorver luz a um determinado comprimento de onda (PANDEY; SMITH; DOUGHERTY; 1990). O Photofrin<sup>®</sup>, derivado da hematoporfirina, foi o primeiro FS utilizado na TFD aprovado por órgãos governamentais, contudo, mesmo eficaz em diferentes carcinomas e outros estudos clínicos, algumas limitações como absorção abaixo do comprimento de onda ideal para penetração no tecido tumoral (630 nm) e persistência da fotossensibilidade cutânea, impulsionaram o desenvolvimento de FS de segunda geração (STYLLI *et al.*, 2004; KOU; DOU; YANG, 2017). Os FS de segunda e terceira geração foram aprimorados quanto ao espectro de absorção, fotossensibilidade e seletividade (STYLLI *et al.*, 2004).

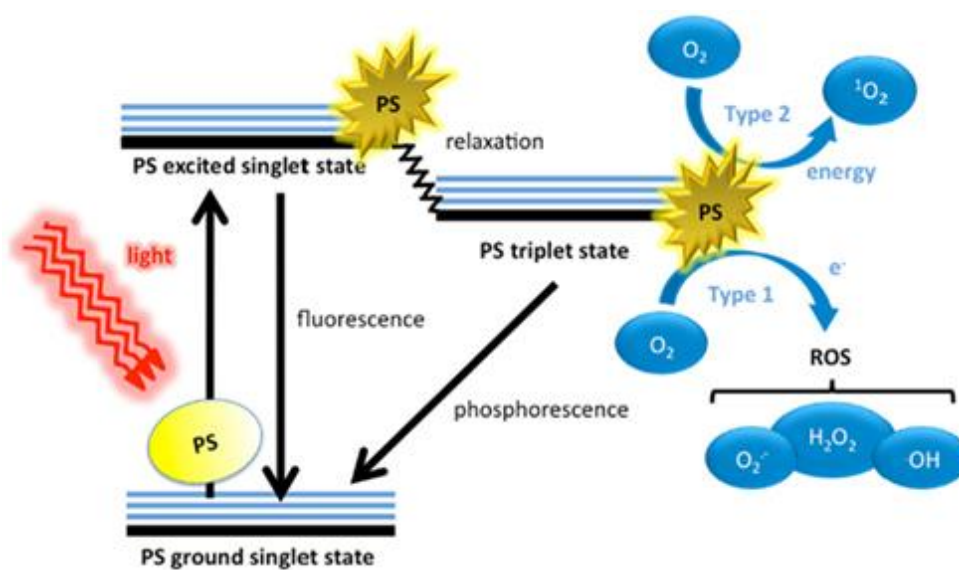
Na fotoinativação de micro-organismos, sabe-se, de acordo com estudos científicos, que as porfirinas neutras apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas diferentemente das Gram-negativas (ALVES *et al.*, 2009). Dessa forma, as porfirinas foram sendo transformadas através da modulação e inserção de diferentes substituintes passando a ter carga (catiônica ou aniônica), nas posições periféricas do anel porfirínico, resultando em uma melhor interação do FS com as membranas celulares (BANFI *et al.*, 2006; JORI *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2016). Com relação ao número de cargas nas moléculas, compostos mono, di, tri ou tetra carregados também são relatados quanto à capacidade de fotoinativação e produção de oxigênio singlete, fundamental para o processo de foto-oxidação (ALVES *et al.*, 2009). A eficiência da fotoinativação das porfirinas catiônicas contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micobactérias, vírus e fungos dermatófitos já é bem estabelecida na literatura (BANFI *et al.*, 2006; CAMINOS *et al.*, 2008; GUTERRES *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2019; MERCHAT *et al.*, 1996; ROSSI *et al.*, 2020; SEEGER *et al.*, 2020; SILVEIRA *et al.*, 2020). Entretanto, o uso da TFDa com porfirinas catiônicas contra leveduras ainda é incipiente (CORMICK *et al.* 2009; ORIEL; NITZAN, 2012; QUIROGA *et al.*, 2012; QUIROGA *et al.*, 2020).

### 3.7. MECANISMO DE FOTOINATIVAÇÃO

O mecanismo de fotoinativação é baseado na combinação de um fotossensibilizador (FS), luz visível em comprimento de onda específico para o FS (400 a 800 nm) e oxigênio molecular (LOVELL *et al.*, 2010; TASSO *et al.*, 2017). O mecanismo de fotoinativação (Figura 1) inicia quando determinado fotossensibilizador absorve energia de uma luz visível,

tornando-se excitado no estado singleto ( $^1\text{FS}^*$ ), podendo atingir seu estado excitado tripleto ( $^3\text{FS}^*$ ) por processo de cruzamento intersistemas. Esse estado excitado tripleto ( $^3\text{FS}^*$ ) pode voltar a seu estado fundamental ( $^1\text{FS}^*$ ) por emissão de fosforescência ou pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) por dois mecanismos: Tipo I ou Tipo II. O mecanismo do Tipo I realiza foto-oxidação através da transferência de hidrogênio/elétrons gerando radicais que reagem com o oxigênio e resultam em produtos oxidados (processo redox). Já o mecanismo do Tipo II, realiza foto-oxidação através da transferência de energia do estado excitado tripleto das moléculas para converter o oxigênio no seu estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ) em uma espécie altamente reativa e citotóxica, neste caso, o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), capaz de interagir com biomoléculas e induzir danos oxidativos e morte celular (PERVAIZ; OLIVO, 2006; WILSON; PATTERSON, 2008; LOPES *et al.*, 2018).

Figura 2. Mecanismo de fotoinativação



Fonte: Tegos *et al.*, 2012

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRAS

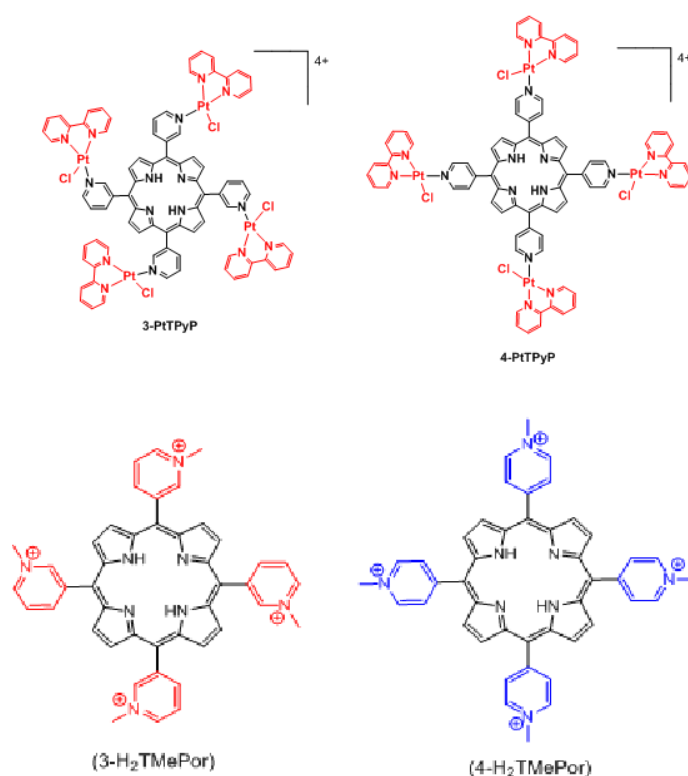
Foram utilizados quatro isolados clínicos de *C. albicans* oriundos de onicomicose cedidos pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e três cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) *C. albicans* ATCC 24433, *C. albicans* ATCC 14053 e *C. albicans* ATCC SC5314, pertencentes ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral (LAPEMICRO) da UFSM.

Fragmentos de unhas utilizados para os ensaios *ex vivo* foram coletados de voluntários saudáveis resguardados pelo projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (CAAE nº 65409222.0.0000.5346).

### 4.2. FOTOSSENSIBILIZADORES

Foram utilizadas quatro porfirinas tetra-catiônicas (Figura 3). Duas porfirinas contendo complexos de Pt(II) **3PtTPyP** e **4PtTPyP** foram previamente sintetizadas pelo Laboratório de Bioinorgânica e Materiais Porfirínicos (LBMP) da UFSM. As porfirinas platinadas testadas neste estudo são solúveis em DMSO e estáveis nesta solução (NAUE *et al.*, 2009). As porfirinas de base livre **3H<sub>2</sub>TPyP** e **4H<sub>2</sub>TPyP**, são solúveis em água e foram adquiridas comercialmente da Frontier Scientific®.

Figura 3. Representação estrutural das porfirinas tetra-catiônicas utilizadas no estudo.



#### 4.3. FONTE DE LUZ

Os ensaios de fotoinativação foram realizados sob irradiação LED de luz branca (400-800 nm, faixa do visível) de 50 mW/cm<sup>2</sup> e dosagem de luz de 360 J/cm<sup>2</sup> por 120 min. As placas de 96 poços irradiadas foram mantidas fechadas a uma distância de 10 cm da luz conforme protocolo padrão (ROSSI *et al.*, 2020). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A CIM das porfirinas e do antifúngico ciclopirox olamina (Dermaris – Farmácia de Manipulação) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, conforme protocolo M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) com modificações. Resumidamente foi adicionado 100µL de caldo Sabouraud (KASVI®) nos poços de uma microplaca, e, posteriormente na coluna 1 foi adicionado 100µL do tratamento testado, porfirina ou antifúngico. A partir disso foi realizada uma diluição seriada: para porfirinas (faixa de concentração de 83,25 µg/mL – 0,325 µg/mL) e ciclopirox olamina (faixa de concentração 50 µg/mL – 3,12 µg/mL), exceto na coluna 11 que recebeu apenas meio de cultura (controle negativo) e coluna 12 que recebeu meio de cultura e inóculo (controle positivo- crescimento). Os inóculos foram preparados em solução salina estéril 0,9% e padronizados na escala 1 de McFarland em densitômetro (DEN-1) seguidos de uma diluição 1:50 e 1:20 em caldo Sabouraud. Após preparo, 100µL de cada inóculo (1:20) foi adicionado aos poços da placa, exceto no controle negativo. As placas foram incubadas de duas formas distintas: uma placa recebeu irradiação de luz branca por 120 minutos com posterior incubação de 24h/37 °C e a outra placa foi incubada no escuro por 24h/37 °C. O valor da CIM foi definido como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico.

Para determinar a CFM, alíquotas de 1µL de cada poço sem crescimento fúngico visível, além do controle positivo e controle negativo, foram semeadas em placas de ágar Sabouraud Dextrose (KASVI®) e incubadas por 24h/37 °C. A CFM foi definida como a menor concentração sem crescimento fúngico na placa.

#### 4.5. ENSAIO DE CURVA DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de curva de viabilidade celular foi realizado para determinar o tempo provável em que o tratamento é capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*. Para isso, foi

determinada previamente a CIM da porfirina frente aos isolados pela técnica de microdiluição em caldo, descrita no item anterior. Desse modo, duas placas de 96 poços foram preparadas utilizando as seguintes concentrações: 2X CIM, CIM e ½ CIM, além do controle positivo de crescimento e controle negativo. A seguir, uma placa foi exposta a irradiação com luz branca por 120 min a 37°C e a outra placa foi incubada a 37°C no escuro. Alíquotas de 10 µL foram removidas dos poços em diferentes tempos (0, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos) e semeadas em placas de ágar Sabouraud Dextrose com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 24h/37°C. Posteriormente, as colônias foram contadas manualmente e o valor de unidades formadoras de colônias (UFC) foi calculado e expresso em  $\text{Log}_{10}\text{UFC}/\text{mL}^{-1}$  (SCHWALBE; STEELE-MOORE; GOODWIN, 2007).

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Para determinar a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) atuando no processo de fotoinativação, foram utilizadas cinco substâncias descritas na literatura como “sequestradores” de EROs, sendo: Ácido ascórbico (AA) detecta presença de oxigênio singlete, N-acetilcisteína (NAC) detecta radical hidroperoxil, Ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) quelante de íons metálicos, Terc-butanol (*t*-BuOH) detecta radical hidroxila e Dimetilsulfóxido (DMSO) detecta espécies radicalares de superóxido. A CIM das substâncias isoladas foi determinada pelo ensaio de microdiluição em caldo que seguiu o protocolo descrito no item 4.4. Em seguida em uma placa de 96 poços foi realizada uma diluição seriada das porfirinas e após foi adicionado nos poços 10 µL das substâncias sequestradoras em concentrações fixas (10X ½ CIM). Para finalizar 100 µL de inóculo foi adicionado aos poços, exceto no controle negativo que recebeu apenas meio de cultura. As placas foram irradiadas com luz branca por 120 minutos e incubadas 24h/37°C. As EROs foram determinadas quando a CIM da porfirina testada foi aumentada na presença de alguma substância sequestradora. Esse método é bem estabelecido e de fácil reprodução para identificar o mecanismo fotoquímico, contudo, não determina a localização da substância na célula microbiana (GARCIA-DIAZ, HUANG, HAMBLIN, 2016).

#### 4.7. TÉCNICA DE *CHECKERBOARD*

A interação da porfirina com o antifúngico foi testada através da técnica de *Checkerboard* de acordo com Vitale e colaboradores (2005). Separadamente utilizando microtubos foram realizadas uma série de diluições de duas vezes cada tratamento

(antifúngico e porfirina) nos solventes correspondentes. Alíquotas de 50 µL de cada concentração da porfirina foram adicionadas às colunas 2 a 11 e, em seguida, alíquotas de 50 µL de cada concentração do antifúngico foram adicionadas às linhas B a H em uma placa de 96 poços. Nos poços da coluna 1 e nos poços da linha A foram adicionados 50 µL do meio de cultura. Assim, a coluna 1 e a linha A receberam apenas antifúngico e porfirina sozinhos, respectivamente, sendo usados como poços controle para determinar valores de CIM dos compostos isolados. A coluna 12 foi dividida para os controles positivo e negativo. Por fim, 100 µL do inóculo padronizado foi semeado em cada poço, exceto no controle negativo. A placa foi irradiada com luz branca por 120 minutos e posteriormente incubada por 24h/37°C. A análise de interação porfirina-antifúngico foi calculada pelo índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) usando a seguinte equação:  $ICIF = CIM_{AB} / CIM_A + CIM_{BA} / CIM_B$ , onde  $CIM_{AB}$  e  $CIM_{BA}$  são as respectivas concentrações inibitórias dos compostos em associação, dividido por  $CIM_A$  e  $CIM_B$  (concentrações inibitórias dos compostos isolados). A interação foi classificada como sinérgica ( $ICIF \leq 0,5$ ), indiferente ( $0,5 < ICIF < 4,0$ ) ou antagonista ( $ICIF \geq 4,0$ ).

#### 4.8. ENSAIO DE FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME *in vitro*

Os biofilmes de *C. albicans* foram formados de acordo com Krom e colaboradores (2009) e Vila e colaboradores (2015) com modificações. Basicamente os isolados de *C. albicans* foram previamente cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI®) por 24h/37°C. Em seguida, uma alçada de leveduras (2 a 3 colônias isoladas) foi transferida para 5mL de caldo Trypticase Soy Broth (TSB) (Laborclin®) e incubada por 24h/37°C sob agitação constante de 150rpm. Após esse período, foi realizada uma diluição (1:100) da cultura em caldo TSB suplementado com 2% de glicose (TSB 2%). O inóculo foi homogeneizado em vórtex e 200 µL foi adicionado aos poços de uma microplaca de 96 poços, exceto para os poços do controle negativo que receberam apenas caldo TSB 2%. A placa foi incubada por 90 minutos a 37°C sob agitação constante de 150rpm para que as leveduras se aderissem à superfície da placa (fase de adesão). As suspensões foram cuidadosamente aspiradas e 200 µL de TSB 2% fresco foram adicionados aos poços. A placa foi novamente incubada para maturação do biofilme por 48h/37°C sob agitação constante de 150rpm.

A quantificação de biomassa do biofilme formado foi realizada pela técnica de cristal violeta 1%. O sobrenadante foi aspirado, os poços contendo biofilme foram lavados com solução salina estéril 0,9% três vezes para remoção das células não aderidas e a placa foi

seca em estufa a 60°C por 60 minutos. Após fixação os biofilmes foram corados com 200 µL de cristal violeta 1% por 20 minutos, seguido de três lavagens com solução salina estéril 0,9% para remoção do excesso de corante. Ao final, foram adicionados 200 µL de etanol 95% por 10 minutos para eluir o cristal violeta e transferidos para uma nova placa onde a leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas (Bio-Rad 550) em 570 nm (CORDEIRO *et al.*, 2015). Após formação do biofilme, para avaliar a capacidade das porfirinas reduzirem o biofilme pré-formado foram utilizadas a CIM e duas concentrações acima, 2X CIM e 4X CIM. O controle positivo do biofilme e o controle negativo não receberam tratamento. A placa foi submetida à irradiação com luz branca e incubada por 24h/37°C. Após incubação, a biomassa do biofilme foi quantificada pela técnica do cristal violeta 1%.

#### 4.9. ENSAIO FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME *ex vivo*

Fragmentos de unhas foram coletados, cortados, pesados e autoclavados. A formação do biofilme seguiu técnica desenvolvida por Vila e colaboradores (2015) com modificações. Em resumo as amostras de unhas foram adicionadas nos poços de uma microplaca de 96 poços de fundo chato contendo 100µL da suspensão de leveduras padronizadas na escala 1 de McFarland descrita anteriormente (item 4.4). As placas foram incubadas por 90 minutos a 37°C para fase de adesão do biofilme sob agitação constante de 150 rpm. Em seguida as suspensões foram aspiradas delicadamente e 100 µL de caldo TSB 2% foram adicionados sobre as unhas finalizando com incubação de 24h/37°C. Para determinar a formação do biofilme, após incubação o meio de cultura foi aspirado e as unhas transferidas com o auxílio de uma pinça estéril para microtubos tipo Eppendorf® preenchidos com 1 mL de salina estéril 0,9%. Esses microtubos foram agitados por 10 minutos em sonicador seguidos por 1 minuto de homogeneização em vórtex para desprendimento do biofilme das unhas. Uma diluição 1:100 foi realizada e 10 µL da solução semeada em placas de ágar Sabouraud incubadas por 24h/37°C. A quantificação do biofilme foi mensurada pelo valor de unidades formadoras de colônias (UFC) e expressa em  $\text{Log}_{10}\text{UFC}/\text{mL}^{-1}$ . O controle positivo dos biofilmes *ex vivo* receberam somente suspensão de leveduras enquanto para o controle negativo as unhas receberam apenas meio de cultura.

Para avaliar a capacidade de o tratamento reduzir o biofilme, as unhas contendo biofilme previamente formado foram tratadas com a CIM e duas concentrações acima, 2X CIM e 4X CIM e submetidas à irradiação com luz branca por 60 minutos. As placas foram incubadas por 24h/37°C e posteriormente as etapas de desprendimento do biofilme e a

quantificação da destruição do biofilme foram realizadas conforme descrito acima nesse item.

#### 4.10. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica (MFA) foi realizada em parceria com o Departamento de Física da UFSM e Departamento de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP) para analisar morfologia, danos celulares e força de adesão do biofilme. Foi utilizado instrumento NX10 (Park Systems, Suwon, República da Coreia) equipado com o software SmartScan® (versão 1.0) RTM 11a. As imagens da morfologia, topografia e adesão foram obtidas simultaneamente usando o modo nanomecânico PinPoint. Os mapas da MFA foram obtidos utilizando uma sonda de silício monolítico girada de alta frequência (TAP300-G Budget Sensors, Bulgária) com uma frequência de ressonância nominal de 300 kHz e uma constante de força de 40 N/m. Todas as medições foram feitas em condições ambientais com temperatura ambiente de  $21 \pm 5^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $50 \pm 10\%$ . As imagens foram tratadas offline utilizando o software XEI (versão 4.3.4, build 22, RTM1) (GUTERRES *et. al.*, 2022; URQUHART *et. al.*, 2023).

#### 4.11. CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade foi realizado de acordo com o método de Mosmann e colaboradores (1983) pela técnica de redução do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). As células utilizadas foram queratinócitos humanos (HaCaT) e células fibroblásticas murinas (L929) adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco com baixo teor de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (100 U/L), e incubadas a 37 C em atmosfera umidificada contendo 5,0% de CO<sub>2</sub>. Logo depois, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com  $3,0 \times 10^4$  células/poço para L929 e  $4, \times 10^4$  células/poço para HaCaT. As placas foram pré-incubadas por 24h/37°C. Assim que o tratamento foi adicionado com diferentes concentrações de porfirinas (4X CIM, 2X CIM e CIM), as placas foram irradiadas por 120 min (irradiância de 50 mW/cm<sup>2</sup> e dosagem total de luz de 360 J/cm<sup>2</sup>) e incubado novamente por 24h/37°C. O reagente MTT foi adicionado e as placas foram incubadas por 4h/37°C. O sobrenadante foi aspirado e DMSO foi adicionado aos poços para dissolver os cristais de formazan formados. A absorbância foi lida em leitor de microplacas a 570 nm.



#### 4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de *Tukey*. Os dados foram representados como a média  $\pm$  desvio padrão. Foi utilizado o software *Graph Prism* 8.01. Foram considerados significativos os resultados quando  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As principais vantagens que tornam a TFDa uma alternativa promissora incluem efeitos colaterais reduzidos ao hospedeiro, método minimamente invasivo, amplo espectro microbiano, eficácia independente da resistência antimicrobiana e ao contrário dos antifúngicos utilizados, é improvável o desenvolvimento de mecanismo de resistência pois o processo fotodinâmico é um tratamento não seletivo com capacidade de danos em múltiplos alvos (MESQUITA *et al.*, 2018; WINCKLER, 2007). As porfirinas tetra-catiônicas com complexos periféricos de Pt(II) são compostos que geram diferentes espécies reativas de oxigênio quando são ativadas com irradiação de luz adequada, incluindo as espécies radicais do mecanismo Tipo 1 (transferência de elétrons) e principalmente  $^1\text{O}_2$  através do mecanismo Tipo 2 (transferência de energia) (TASSO *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2019; COUTO *et al.*, 2020). Além disso, são FS promissores de grande interesse na TFD, pois possuem propriedades fotofísicas, fotobiológicas e fotoquímicas adequadas na aplicação de processos fotodinâmicos, são consideradas estáveis em solução de DMSO (o efeito do solvente na viabilidade celular foi descartado) e tampão, fotoestáveis quando irradiadas com luz de LED branca e não formam agregados (COCCA *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2021; TISOCO *et al.*, 2022).

### 5.2. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Os valores de CIM e CFM das porfirinas **3PtTPyP**, **4PtTPyP**, **3H<sub>2</sub>TPyP** e **4H<sub>2</sub>TPyP** frente os isolados clínicos e cepas padrão de *C. albicans* no escuro e sob irradiação podem ser observados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 respectivamente. A porfirina **3PtTPyP** apresentou os melhores resultados para CIM e da mesma forma para CFM demonstrando excelente atividade antifúngica *in vitro* quando irradiada com luz branca, resultando na fotoinativação das leveduras testadas em baixas concentrações do composto. Embora o mecanismo de fotoinativação contra *C. albicans* não seja totalmente elucidado, estudos com diferentes FS porfirínicos catiônicos indicaram através de marcadores fluorescentes que a porfirina se liga à parede celular da levedura, e, somente após irradiação foi observada a presença do FS no citosol da célula, sugerindo que o processo fotodinâmico favorece o aumento da permeabilidade celular causando danos irreversíveis (LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005; VOIT *et al.*, 2021). A excelente atividade antimicrobiana da porfirina **3PtTPyP** foi atualmente relatada contra micobactérias, fungos dermatófitos e vírus,

(BASSO *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2021; ROSSI *et al.*, 2020). Pesquisas de TFDa contra *C. albicans* utilizando a porfirina 5,10,15,20-tetraquis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil] (TAPP) e seu derivado (TAPP<sup>4+</sup>), meso-tetra-(4-*N*-metilpiridil) porfirinas catiônicas (TMPyP) e meso-tetra-(4-sulfonadas) porfirinas aniônicas (TPPS4<sup>-</sup>) foram encontradas, contudo, este é o primeiro estudo que avalia a atividade de **3PtTPyP** contra essas leveduras (CORMICK *et al.* 2009; ORIEL; NITZAN, 2012; QUIROGA *et al.*, 2012; QUIROGA *et al.*, 2020). Considerando as melhores CIM e CFM obtidas, a porfirina **3PtTPyP** foi o FS de escolha para a realização dos demais ensaios de fotoinativação.

Tabela 1. Valores de CIM e CFM (em µg/mL) de **3PtTPyP** frente *C. albicans* expostas a condições de irradiação de luz branca e escuro a 50 mW/cm<sup>2</sup> e dosagem total de luz 360 J/cm<sup>2</sup> (120 minutos).

Micro-organismos	Porfirina <b>3PtTPyP</b>			
	CIM (µg/mL)		CFM (µg/mL)	
	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ
<i>C. albicans</i> IC 03	41,6	0,32	41,6	0,65
<i>C. albicans</i> IC 44	41,6	0,32	41,6	0,32
<i>C. albicans</i> IC 45	41,6	2,6	41,6	2,6
<i>C. albicans</i> IC 49	41,6	1,3	41,6	2,6
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	41,6	1,3	83,25	1,3
<i>C. albicans</i> ATCC SC5314	41,6	1,3	83,25	1,3
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	41,6	2,6	83,25	2,6

As porfirinas **4PtTPyP**, **3H<sub>2</sub>TPyP** e **4H<sub>2</sub>TPyP** foram menos eficientes no processo de fotoinativação apresentando baixo grau de citotoxicidade à célula fúngica (tabelas 2, 3 e 4) com pouca ou nenhuma diferença de fotoinativação nos ciclos irradiados e escuro. A CIM e CFM na luz não foram satisfatórias, pois a dose necessária de composto disponível para o processo de fotoinativação foi elevada.

Tabela 2. Valores de CIM e CFM (em  $\mu\text{g/mL}$ ) de **4PtTPyP** frente *C. albicans* expostas a condições de irradiação de luz branca e escuro a  $50 \text{ mW/cm}^2$  e dosagem total de luz  $360 \text{ J/cm}^2$  (120 minutos).

Micro-organismos	Porfirina <b>4PtTPyP</b>			
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ
<i>C. albicans</i> IC 03	41,6	20,8	41,6	41,6
<i>C. albicans</i> IC 44	41,6	41,6	41,6	41,6
<i>C. albicans</i> IC 45	41,6	41,6	83,25	41,6
<i>C. albicans</i> IC 49	41,6	20,8	41,6	20,8
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	41,6	41,6	41,6	41,6
<i>C. albicans</i> ATCC SC5314	41,6	20,8	41,6	20,8
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	20,8	20,8	41,6	41,6

Tabela 3. Valores de CIM e CFM (em  $\mu\text{g/mL}$ ) de **3H<sub>2</sub>TPyP** frente *C. albicans* expostas a condições de irradiação de luz branca e escuro a  $50 \text{ mW/cm}^2$  e dosagem total de luz  $360 \text{ J/cm}^2$  (120 minutos).

Micro-organismos	Porfirina <b>3H<sub>2</sub>TPyP</b>			
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ
<i>C. albicans</i> IC 03	83,25	20,8	83,25	41,6
<i>C. albicans</i> IC 44	41,6	41,6	83,25	83,25
<i>C. albicans</i> IC 45	41,6	41,6	41,6	41,6
<i>C. albicans</i> IC 49	41,6	41,6	41,6	41,6
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	41,6	41,6	83,25	41,6
<i>C. albicans</i> ATCC SC5314	41,6	41,6	41,6	41,6
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	83,25	83,25	83,25	83,25

Os valores encontrados para as porfirinas **3H<sub>2</sub>TPyP** e **4H<sub>2</sub>TPyP** podem estar relacionados com a solubilidade do composto, haja vista que tais porfirinas são diluídas com água o que dificultaria interação e permeabilidade na parede celular complexa dos fungos (LOPES *et al.*, 2019). Já a porfirina **4PtTPyP**, apesar de ser praticamente equivalente à porfirina **3PtTPyP** quanto a geração de EROS, a posição de ligação do complexo de Pt(II) na estrutura da molécula a torna menos solúvel em água, DMSO, solução tampão e outros,

podendo formar agregados, diminuindo sua biodisponibilidade para o processo de fotoinativação, corroborando com os resultados obtidos de CIM e CFM nesse estudo (TISOCO *et al.*, 2022).

O valor da CIM para o antifúngico ciclopirox olamina foi de 3,12 µg/mL para todas *C. albicans* testadas nesse estudo e se manteve igual nas condições de irradiação e escuro, comprovando que o agente antimicrobiano não é fotossensível. Estudos sobre a atividade antifúngica do Ciclopirox contra leveduras foram encontrados, e, os valores da CIM ficaram entre 0,002 µg/mL – 0,69 µg/mL. Acredita-se que o mecanismo de ação do ciclopirox em *C. albicans* ocorra através da quelação de íons metálicos e inibição do transporte ativo de substratos para dentro da célula, interferindo na síntese de proteínas e DNA da célula fúngica, resultando em extravasamento do material intracelular (GUPTA; KOHLI, 2003; KOKJOHN *et al.*, 2003). O antifúngico de uso oral Fluconazol também foi avaliado para determinar o perfil das *C. albicans* testadas nesse estudo e o valor da CIM foi de 64 µg/mL, revelando resistência dessas leveduras segundo pontos de corte estabelecidos na norma M27 A3 do CLSI (2008) que determina a sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica.

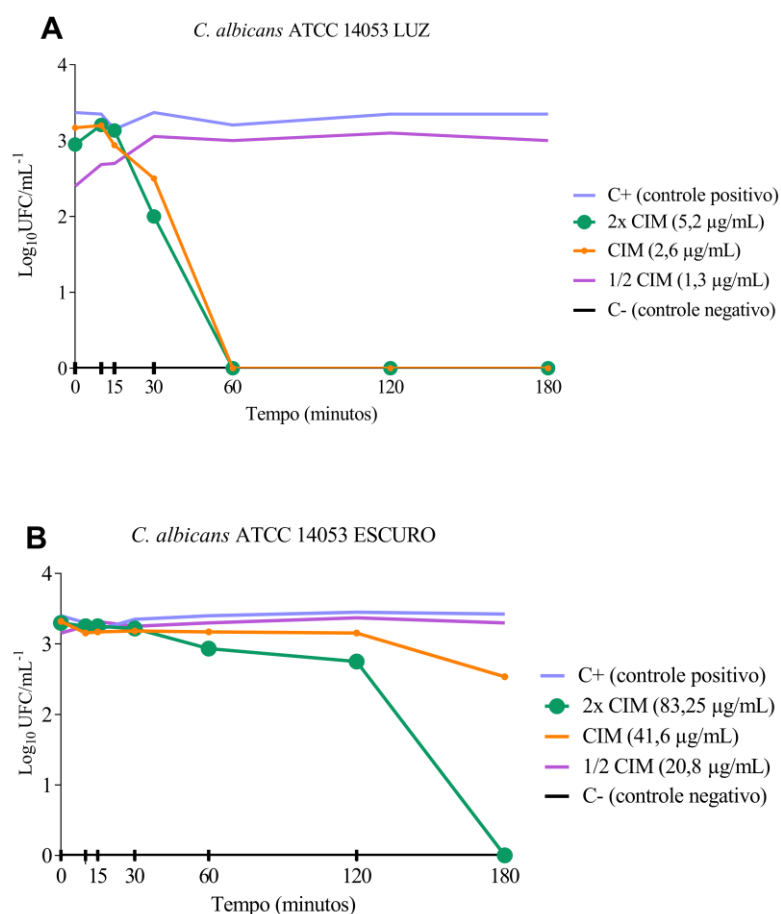
Tabela 4. Valores de CIM e CFM (em µg/mL) de **4H<sub>2</sub>TPyP** frente *C. albicans* expostas a condições de irradiação de luz branca e escuro a 50 mW/cm<sup>2</sup> e dosagem total de luz 360 J/cm<sup>2</sup> (120 minutos).

Micro-organismos	Porfirina <b>4H<sub>2</sub>TPyP</b>			
	CIM (µg/mL)		CFM (µg/mL)	
	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ
<i>C. albicans</i> IC 03	83,25	41,6	83,25	41,6
<i>C. albicans</i> IC 44	83,25	41,6	83,25	41,6
<i>C. albicans</i> IC 45	83,25	41,6	83,25	83,25
<i>C. albicans</i> IC 49	41,6	20,8	83,25	41,6
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	41,6	41,6	41,6	41,6
<i>C. albicans</i> ATCC SC5314	83,25	41,6	83,25	41,6
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	83,25	83,25	83,25	83,25

### 5.3. CURVA DE VIABILIDADE CELULAR

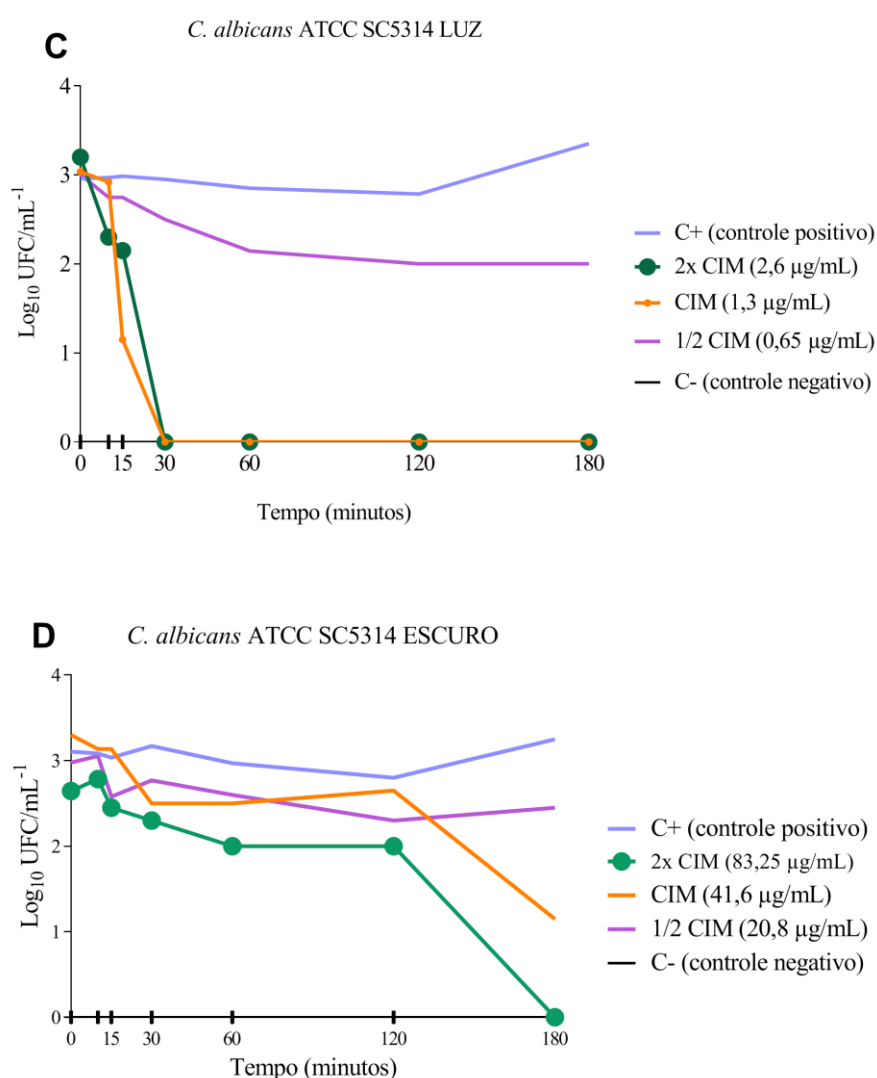
Foi realizado o ensaio de curva de viabilidade celular para determinar a cinética da atividade fungicida *in vitro* da porfirina **3PtTPyP** contra duas cepas padrão de *C. albicans*. Os resultados foram expressos pela contagem de células viáveis em escala logarítmica em comparação com o controle positivo de crescimento (sem contato com o tratamento) nas condições de irradiação e escuro (Figuras 4 e 5). Após tratamento com a porfirina nas concentrações previamente definidas, observamos que a fotoinativação da cepa *C. albicans* ATCC 14053 ocorreu nos primeiros 60 minutos de exposição à luz causando erradicação completa do micro-organismo testado (Figura 4A), e, conforme esperado, a concentração de ½ CIM não inibiu nem reduziu as UFC/mL<sup>-1</sup>, permanecendo com células viáveis até mesmo no tempo de 180 minutos. O ensaio também mostrou que a presença da porfirina no escuro levou a inibição completa do crescimento fúngico somente na maior concentração de **3PtTPyP** testada (83,25 µg/mL), e, no maior tempo testado (180 minutos). Ademais, não demonstrou atividade antifúngica na CIM e ½ CIM (Figura 4B).

Figura 4. Curva de viabilidade celular de **3PtTPyP** frente *C. albicans* ATCC 14053 nas condições de irradiação (A) e escuro (B) no tempo de 180 minutos.



A cepa padrão *C. albicans* ATCC SC5314 também foi testada para avaliar a viabilidade celular após tratamento com a porfirina (Figura 5). O processo de fotoativação para essa cepa deu-se logo nos primeiros 30 minutos de exposição à luz branca (Figura 5A), levando a erradicação fúngica em baixas concentrações do FS (1,3  $\mu\text{g/mL}$  e 0,65  $\mu\text{g/mL}$ ). Já na condição escura o resultado foi semelhante ao obtido para *C. albicans* ATCC 14053, onde apenas 2X CIM (83,25  $\mu\text{g/mL}$ ) foi capaz de interromper o crescimento do micro-organismo (Figura 5B).

Figura 5. Curva de viabilidade celular de **3PtTPyP** frente *C. albicans* ATCC SC5314 nas condições de irradiação (A) e escuro (B) no tempo de 180 minutos.



Os resultados mostram claramente que a inativação foi dependente de irradiação, e, a associação de um FS, luz e oxigênio molecular podem inibir o crescimento fúngico em um curto período de tempo. Basso e colaboradores ao testarem a ação da **3PtTPyP** contra vírus

envelopado relataram a inativação completa do micro-organismo em baixas concentrações do FS no tempo de 30 e 60 minutos quando irradiado (BASSO *et al.*, 2019). Ainda, descrito por Rossi e colaboradores (2020), a ação bactericida da porfirina **3PtTPyP** contra micobactérias ocorreu nas primeiras 24h após irradiação.

#### 5.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Foi realizado ensaio de determinação de EROs para avaliar quais substâncias sequestradoras fizeram parte do processo de foto-oxidação. Dessa maneira, cada substância esta diretamente relacionada com uma EROs. Essas espécies reativas danificam proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, entre outros, induzindo alterações estruturais que levam à perda da função celular, apoptose celular ou inibição da virulência fúngica (KATO *et al.*, 2013).

Diante dos resultados mostrados (Tabela 5) das CIM obtidas na ausência e na presença das EROs, podemos concluir que o mecanismo envolvido na foto-oxidação das *C. albicans* testadas com a porfirina 3PtTPyP foi misto, ou seja, mecanismo Tipo 1 com a CIM aumentada na presença de NAC, evidenciando a produção de radicais hidroperoxil, e, mecanismo Tipo 2 com a CIM aumentada na presença de AA revelando a produção de oxigênio singlete, produto fototóxico para célula fúngica.

Tabela 5- Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos micro-organismos testados para a porfirina **3PtTPyP** na ausência e na presença de sequestradores das EROs, em condições de irradiação com luz branca.

Micro-organismos	Porfirina <b>3PtTPyP</b>					
	CIM	AA	NAC	EDTA	<i>t</i> -BuOH	DMSO
<i>C. albicans</i> IC 03	0,32	20,8	20,8	0,16	0,32	0,32
<i>C. albicans</i> IC 44	0,32	20,8	20,8	0,32	0,32	0,32
<i>C. albicans</i> IC 45	2,6	20,8	20,8	1,3	1,3	2,6
<i>C. albicans</i> IC 49	1,3	20,8	20,8	0,32	1,3	1,3
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	1,3	20,8	20,8	0,65	0,65	1,3
<i>C. albicans</i> ATCC SC5314	1,3	20,8	20,8	0,65	1,3	1,3
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	2,6	20,8	20,8	1,3	1,3	2,6

CIM – concentração inibitória mínima; AA – ácido ascórbico; NAC - N-acetilcisteína; EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético; *t*-BuOH - Terc-butanol; DMSO – Dimetilsufóxido.



As porfirinas tetra-catiônicas contendo complexos periféricos de platina(II) testadas são FS que absorvem consideravelmente luz do espectro visível, e, na presença de oxigênio molecular, tornam-se mais biodisponíveis produzindo EROs garantindo assim propriedades fotofísicas. Ademais, não formam agregados e são estáveis em solução, o que as torna alvo de interesse fotoquímico como possível alternativa no tratamento de infecções cutâneas e subcutâneas. Suas aplicações em processos foto-oxidativos já foi relatada (COUTO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2017; TASSO *et al.*, 2017). Outros estudos mostraram mecanismo de ação envolvendo a produção de oxigênio singleto para a **3PtTPyP** e outras porfirinas catiônicas contra bactérias, micobactérias e dermatófitos (BASSO *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2020). O oxigênio singleto é o principal produto da fotoativação gerados pelas porfirinas tetra-catiônicas, em especial as de Pt(II). É uma espécie altamente reativa e oxidante atuando em diferentes alvos celulares como parede celular, membrana externa e componentes intracelulares como DNA (ROSSI *et al.*, 2020; XONG; TIAN; AI, 2019).

### 5.5. CHECKERBOARD

Os valores da CIM obtidos para a porfirina **3PtTPyP** na presença de ciclopirox olamina estão representados na Tabela 6. Para a cepa *C. albicans* ATCC SC5314, a associação dos compostos reduziu em 2X os valores da CIM obtidas isoladamente para cada composto. Contudo, essa redução não foi suficiente para gerar um efeito sinérgico de interação, mantendo-se o efeito indiferente um na presença do outro. Já a cepa *C. albicans* ATCC 14053 apresentou comportamento diferente na associação dos compostos, onde somente a CIM do antifúngico na presença da **3PtTPyP** foi reduzida 2X enquanto a CIM da **3PtTPyP** na presença do ciclopirox se manteve a mesma do composto isolado. Ainda assim a interação foi indiferente.

Tabela 6- Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) no ensaio de interação da porfirina **3PtTPyP** com antifúngico contra cepas padrão de *C. albicans* em condições de irradiação com luz branca.

Micro-organismos	Porfirina <b>3PtTPyP</b>					
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	<b>3PtTPyP</b> (A)	ciclopirox (B)	CIM A/B	CIM B/A	ICIF	Interação
<i>C. albicans</i> ATCC SC5314	1,3	3,12	0,65	1,56	1	IND.
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	2,6	3,12	2,6	1,56	1,5	IND.

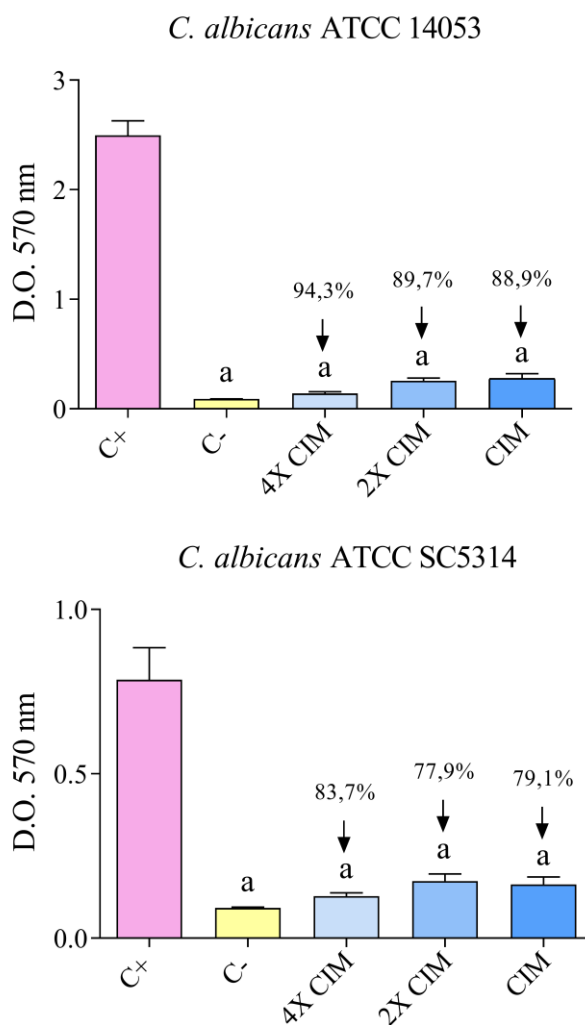
ICIF - índice de concentração inibitória fracionada; IND – indiferente.

Os achados na literatura da associação antifúngico X porfirina usando TFDa contra leveduras não são suficientes para estabelecer a melhor combinação de agentes. O número de estudos é limitado e as técnicas utilizadas são diversas, além das especificidades de cada micro-organismo, dificultando a comparação direta. Contudo, o efeito sinérgico de fluconazol e a meso-tetraquis (*N*-metil-4-piridil) porfirina tetra-tosilato (TMP) e o efeito indiferente do miconazol com TMP contra leveduras foram descritos (KOKJOHN *et al.*, 2003; SNELL; FOSTER; HAIDARIS, 2012). O efeito indiferente relatado em alguns estudos corrobora com nossos achados, e, embora não tenha sido comprovado um efeito sinérgico de terapia combinada *in vitro*, o efeito aditivo já nos sugere que o uso associado do antifúngico x terapia fotodinâmica não gera um efeito antagônico, que seria indesejado.

#### 5.6. FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME *in vitro*

A formação do biofilme de *C. albicans* ocorre de forma complexa e orquestrada, exigindo etapas controladas para se desenvolver. A principal etapa da formação do biofilme de *C. albicans* é a fase de adesão à superfície onde ocorrem interações físico-químicas e formação inicial de microcolônias devido a agitação provocada. Tão logo as células passam a produzir matriz polimérica extracelular (maturação) resultando na formação do biofilme, processo que leva de 48h a 72h. Para desenvolver a formação do biofilme foram testados diferentes meios de cultura (caldo Sabouraud, caldo TSB, caldo Mueller Hinton) suplementados com diferentes concentrações de glicose (0, 1 e 2%) em três tempos de incubação (24h, 48h, 72h) na forma estática e sob agitação de 150rpm, dados não mostrados. Após análises, o melhor meio de cultura, suplementação, tempo e condição foram TSB 2% de glicose no tempo de 48h sob agitação. Para avaliar a capacidade da porfirina **3PtTPyP** de destruir o biofilme pré-formado utilizamos 4X CIM, 2X CIM e CIM. Os resultados podem ser observados na Figura 6.

Figura 6. Formação e destruição do biofilme *in vitro* de *C. albicans* ATCC 14053 (A) e *C. albicans* ATCC SC5314 (B) após tratamento com **3PtTPyP** sob irradiação por 120 minutos.



C+ controle positivo; C- controle negativo; CIM - concentração inibitória mínima; a -  $p < 0,05$

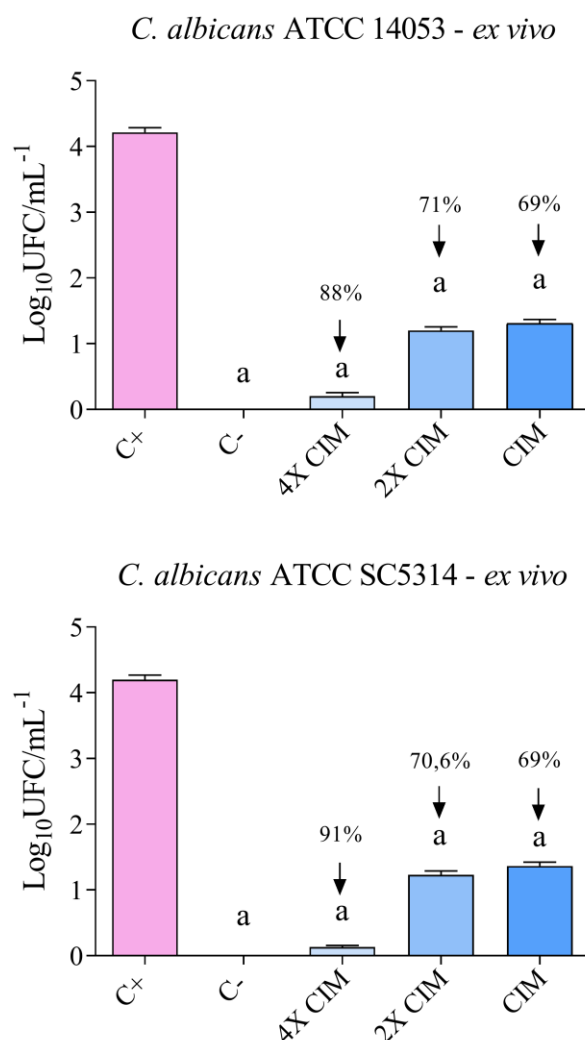
Diante dos resultados obtidos após quantificação de biomassa pela técnica de cristal violeta, fica evidente que a porfirina **3PtTPyP** foi capaz de destruir significativamente o biofilme pré-formado quando comparado ao controle positivo. Para a cepa *C. albicans* ATCC 14053 (Figura A) o biofilme formado foi reduzido em 94,3% usando 4X CIM, 89,7% quando exposto a 2X CIM e reduzido em 88,9% na CIM. Já para a *C. albicans* ATCC SC5314 (Figura 6B) o tratamento reduziu o biofilme em 83,7% quando utilizamos 4X CIM, 77,9% quando exposto a 2X CIM e reduziu o biofilme em 79,1% na CIM. Embora o mecanismo de destruição do biofilme da TFDa com porfirinas não seja completamente

descrito, estudos usando fotoinativação com outros FS não porfirínicos sugerem que a ação contra o biofilme pode acontecer de diferentes formas, pela ligação do FS ativado pela luz à matriz do biofilme e assim gerar EROs causando danos oxidativos bem como pela desestabilização dessa matriz aumentando a permeabilidade do FS para o meio intracelular causando danos aos componentes citoplasmáticos (HU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2015). Estudo recente realizado por Rodrigues e colaboradores (2023) avaliou a capacidade de um corante associado a TFD contra biofilme de *C. albicans* e a viabilidade celular não foi significativamente eficaz, evidenciando o relevante potencial das porfirinas como PS em nossos testes. Ainda de acordo com nossos resultados um ensaio realizado com porfirinas catiônicas foi capaz de afetar o biofilme pré-formado de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* (VIEIRA *et al.*, 2019). Embora os ensaios *in vitro* não possam ser diretamente correlacionados com a destruição biofilme *in vivo*, consideramos uma ferramenta relevante para testes iniciais.

#### 5.7. FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DO BIOFILME *ex vivo*

A placa das unhas é composta por células queratinizadas e o tecido ungueal é classificado em três camadas, dorsal, intermediário e ventral. As camadas possuem suas características singulares e por esse motivo apresentam distinta resistência à penetração de agentes externos (tratamentos tópicos). A camada dorsal é a mais externa da unha, fica exposta, é rígida e com finalidade de proteção forma uma barreira impedindo absorção de agentes tópicos, já a camada intermediária se apresenta um pouco mais flexível que a dorsal. A camada mais interna da unha e também a mais fina é a camada ventral, e, embora tenha maior capacidade de absorção, um tratamento precisa atravessar as duas primeiras camadas até alcançá-la. Além disso, é a camada mais suscetível à proliferação fúngica (BASWAN *et al.*, 2017). O tratamento da onicomicose é um grande desafio, pois além das dificuldades encontradas nos tratamentos convencionais, os fungos possuem rápida capacidade de colonização e em até 96h esses micro-organismos podem formar biofilme altamente aderido exercendo papel importante na evolução da onicomicose (GUPTA *et al.*, 2016). Diante da importante função estrutural das unhas e a aderência de uma população de micro-organismos através dos biofilmes, testamos um modelo *ex vivo* de formação e destruição de biofilme (Figura 7).

Figura 7. Formação e destruição do biofilme *ex vivo* de *C. albicans* ATCC 14053 (A) e *C. albicans* ATCC SC5314 (B) após tratamento com **3PtTPyP** sob irradiação por 120 minutos.



C+ controle positivo; C- controle negativo; CIM - concentração inibitória mínima; a -  $p < 0,05$ .

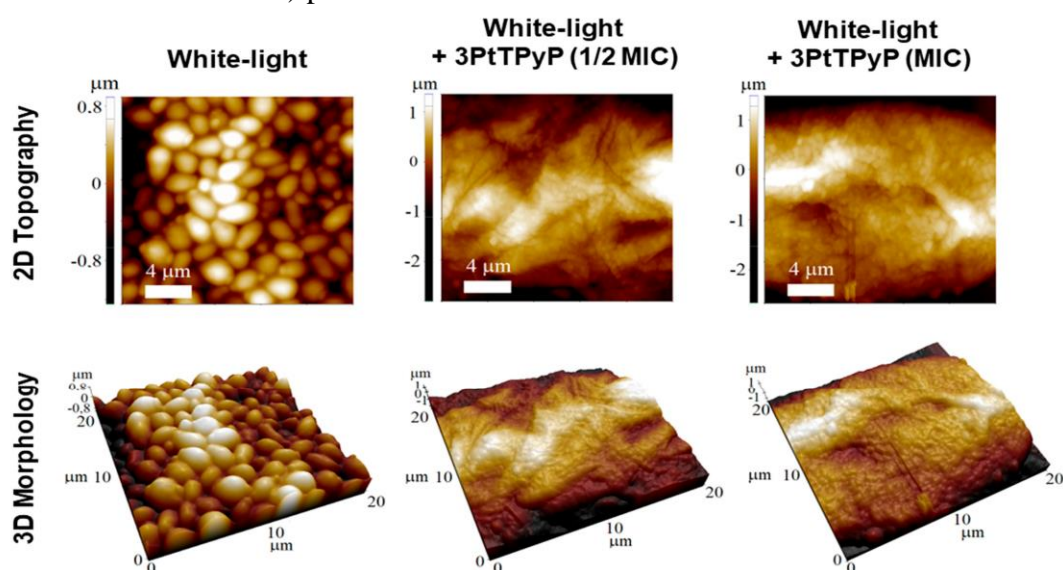
Uma das causas referente às infecções crônicas da onicomicose é a formação de biofilmes. A presença desses biofilmes protege os micro-organismos retardando e/ou neutralizando a ação dos antifúngicos, alterando características fenotípicas, aumentando fatores de virulência e expressão gênica, resultando em resistência antimicrobiana (AGUIAR *et al.*,2020; GUPTA; CARVIEL; SHEAR, 2018). Como esperado, a maior concentração de PS testada (4X CIM) diminuiu a viabilidade celular da maior parte do biofilme formado, enquanto, com resultados semelhantes, a redução do biofilme nas cepas testadas foi de  $\pm 70\%$  para 2X CIM e 69% para CIM. Vila e colaboradores (2015)

desenvolveram biofilme de *C. albicans* e *Fusarium oxysporum* em modelo de unhas, utilizando terapia a laser de alumínio e ítrio e luz pulsada, e, assim como em nossos ensaios, obtiveram redução do biofilme formado para *C. albicans* (aproximadamente 60%). Os estudos abordando destruição de biofilme utilizando a TFD e porfirinas são escassos para que seja realizada uma correlação fiel entre resultados. Alsaif e colaboradores em 2021 trataram biofilmes *in vivo* de placas dentárias com a técnica de TFD e eritrosina como PS e obtiveram redução na viabilidade celular de bactérias. O modelo descrito em nosso estudo é relevante para triagens preliminares e bom candidato no tratamento antifúngico de infecções crônicas quando terapias convencionais não apresentarem eficácia.

### 5.8. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

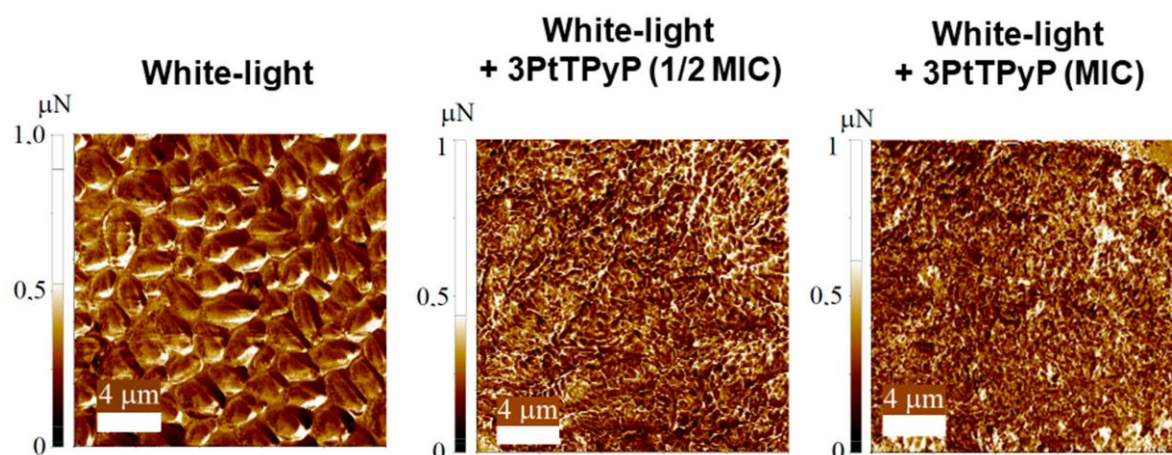
Os mapas da MFA 2D e 3D representativos para *C. albicans* ATCC 14053 sob diferentes tratamentos (sob irradiação) são mostrados na Figura 8. Mesmo sob exposição à luz branca, os mapas de MFA para o controle positivo exibiram a morfologia comum da cepa de levedura *C. albicans*, com a superfície composta por células compactadas relativamente uniformes com algumas saliências (Figura 8a) (SUDBERY, 2011). Nesse caso, a levedura unicelular com brotamento tinha formato esférico com diâmetro na faixa de 2,0 a 3,0  $\mu\text{m}$ , o que também foi observado em resultados anteriores de MFA (TYAGI; MALIK, 2011).

Figura 8. Imagens topográficas de MFA de *C. albicans* ATCC 14053 expostas a terapia fotodinâmica utilizando porfirina **3PtTPyP** com irradiação ( $50 \text{ mW/cm}^2$  e dosagem total de luz de  $360 \text{ J/cm}^2$ ) por 120 min.



O tratamento com porfirina **3PtTPyP** (tanto para  $\frac{1}{2}$ CIM quanto para CIM) inibiu completamente o crescimento de *C. albicans* (Figuras 7b e 7c), e nenhuma célula foi encontrada após muitas execuções de MFA. Embora a levedura unicelular pudesse ser vista sob microscópios ópticos a uma concentração de  $\frac{1}{2}$ CIM, a preparação da amostra para a aquisição do mapa MFA foi um ambiente muito mais inóspito para o crescimento da estirpe de levedura *C. albicans*. Além disso, os resultados dos mapas de força de adesão (Figura 9) mostraram que o tratamento com porfirina aumentou as forças adesivas entre a ponta e a superfície da amostra.

Figura 9. Mapas de força de adesão de *C. albicans* ATCC 14053 expostos a diferentes protocolos de terapia fotodinâmica com porfirina **3PtTPyP** com irradiação ( $50 \text{ mW/cm}^2$  e dosagem total de luz de  $360 \text{ J/cm}^2$ ) por 120 min.



As forças de adesão para todos os tratamentos são mostrados na Tabela 7. Sob condições de luz branca, o valor médio da adesão superficial aumenta com o tratamento com porfirina **3PtTPyP** para 0,381 e 0,510N para as concentrações  $\frac{1}{2}$ CIM e CIM, respectivamente. Como visto nas imagens MFA, as amostras da cepa de levedura *C. albicans* sofreram mudanças notáveis após o tratamento com porfirina **3PtTPyP**, com seu crescimento sendo completamente inibido e/ou células sendo destruídas. Lembramos que os tratamentos com porfirinas são altamente eficazes contra muitos micro-organismos, como cepas de bactérias, embora a maioria das imagens de MFA revelasse apenas deformação de bactérias e/ou redução do crescimento de células (VILA *et al.*, 2015). Além disso, a imagem nanomecânica é uma ferramenta poderosa para elucidar as propriedades adesivas de *C. albicans* (FORMOSA *et al.*, 2015; TOKARSKA-RODAK *et al.*, 2019). Curvas força-distância têm sido utilizadas para obter as forças de adesão entre pares bactéria-fungo e até

visualizar as principais etapas da interação *C. albicans*-macrófago (EL-KIRAT-CHATE; DUFRENE, 2012; OVCHINNIKOV *et al.*, 2012). Aqui, mostramos que, embora a cepa de levedura *C. albicans* estivesse ausente da superfície da amostra após o tratamento, as forças adesivas foram aumentadas para que a massa residual ficasse aderida à superfície, o que poderia ajudar a prevenir o crescimento celular futuro nesta área (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de força de adesão de *C. albicans* ATCC 14053 expostos a diferentes protocolos de terapia fotodinâmica utilizando porfirina **3PtPyP** com irradiância (50 mW/cm<sup>2</sup> e dosagem total de luz de 360 J/cm<sup>2</sup>) por 120 min.

Condições	Força de adesão
Irradiação	0,358 ± 0,018
Irradiação + <b>3PtPyP</b> (1/2CIM)	0,381 ± 0,050
Irradiação + <b>3PtPyP</b> (CIM)	0,510 ± 0,069

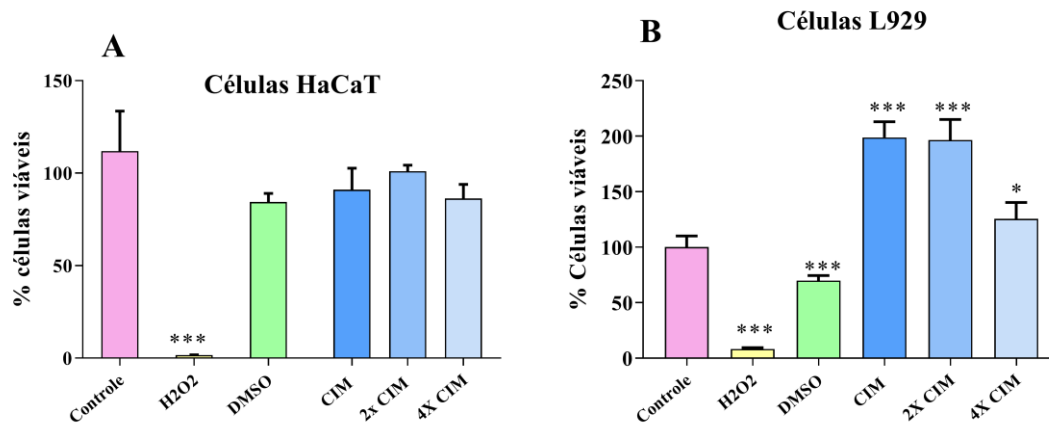
## 5.9. CITOTOXICIDADE

A porfirina **3PtPyP** foi diluída em DMSO e testada em três concentrações diferentes definidas a partir da maior CIM obtida entre as leveduras testadas, ou seja, as concentrações inibitórias obtidas para a cepa de *C. albicans* ATCC 14053 (4XCIM – 10,4 µg/mL, 2XCIM – 5,2 µg/mL e CIM – 2,6 µg/mL). O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi utilizado como controle positivo da morte celular contra células HaCaT e L929. Após irradiação com luz branca por 120 min (50 mW/cm<sup>2</sup> e dosagem total de luz de 180 J/cm<sup>2</sup>), observamos que o composto DMSO e o controle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziram significativamente a viabilidade celular das células HaCaT em comparação ao controle de crescimento positivo; no entanto, as diferentes concentrações de porfirina testadas aumentaram a viabilidade celular das células não apresentando citotoxicidade (Figura 10a). Nas células L929, apenas o controle de morte celular (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reduziu efetivamente a viabilidade celular. Embora o DMSO tenha reduzido a viabilidade, não causou danos significativos em comparação com o controle de crescimento positivo (Figura 10b). Além disso, as concentrações de porfirina testadas estimularam a proliferação celular.

Figura 10. Viabilidade celular de células (a) HaCaT e (b) L929 sob irradiação (50 mW/cm<sup>2</sup> e dosagem total de luz de 360 J/cm<sup>2</sup>) por 120 min. Os valores são expressos como média, desvio padrão considerando diferença estatística quando  $p < 0,001$  comparado ao



controle de células viáveis (100%). Controle (células viáveis); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controle negativo/células não viáveis); DMSO (controle diluente) \*\*\*p< 0,001; \*p< 0,05.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo trata pela primeira vez a avaliação da atividade antifúngica e antibiofilme de porfirinas tetra-catiônicas contendo complexos de Pt(II) contra *C. albicans* voltadas para o tratamento de onicomicose e os resultados

- A porfirina **3PtTPyP** sob irradiação com luz branca mostrou-se mais eficiente contra os isolados clínicos e cepas padrão de *C. albicans* testados *in vitro* em baixa concentração;
- No ensaio de curva de viabilidade celular sobre o tempo, a CIM testada foi capaz de erradicar o crescimento de *C. albicans* ATCC 14053 em 60 minutos e de *C. albicans* SC5314 em apenas 30 minutos de irradiação;
- O possível mecanismo de fototoxicidade celular foi misto, ou seja, Tipo I pela produção de espécies radicais hidroxil e Tipo II pela produção de oxigênio singlete;
- A associação da **3PtTPyP** e o antifúngico ciclopirox demonstrou atividade indiferente sob irradiação;
- Os biofilmes pré-formados *in vivo* e em modelo *ex vivo* de unhas foram reduzidos quando tratados com três diferentes concentrações de **3PtTPyP** e apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle positivo de crescimento;
- A MFA mostrou os danos causados na morfologia, estrutura e adesão celular após tratamento com PS evidenciando a fototoxicidade do tratamento nas leveduras.
- Os ensaios de citotoxicidade não evidenciaram potencial tóxico às células de queratinócitos e fibroblastos sendo as concentrações testadas seguras para uso na TFD.
- Este estudo revelou que a TFD utilizando porfirinas contendo complexos periféricos de Pt(II) pode ser um promissor candidato como tratamento alternativo contra infecções fúngicas de onicomicose, auxiliando na redução do uso de medicamentos antifúngicos orais, principalmente para pacientes comórbidos onde os efeitos adversos são maiores.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Francisca Lidiane Linhares de et al. Antibiofilm activity on *Candida albicans* and mechanism of action on biomembrane models of the antimicrobial peptide Ctn [15–34]. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8339, 2020.
- ALIM, Darakshan; SIRCAIK, Shabnam; PANWAR, Sneha Lata. The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: an emerging perspective. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 140, 2018.
- ALSAIF, A.; TAHMASSEBI, J. F.; WOOD, S. R. Treatment of dental plaque biofilms using photodynamic therapy: a randomised controlled study. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 22, n. 5, p. 791-800, 2021.
- ALVES, Eliana et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 70, 2009.
- ATRIWAL, Tanu et al. Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 638609, 2021
- BALTAZAR, Ludmila M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 202, 2015.
- BANFI, Stefano et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an *in vitro* study on Gram negative and Gram positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 28-38, 2006.
- BASSO, Giovana et al. Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-platinated porphyrins. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 23, n. 09, p. 1041-1046, 2019.
- BASWAN, Sudhir et al. Understanding the formidable nail barrier: A review of the nail microstructure, composition and diseases. **Mycoses**, v. 60, n. 5, p. 284-295, 2017.
- BHATTA, Anil Kumar; KEYAL, Uma; WANG, Xiu Li. Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 228-235, 2016.
- BONEZ, Pauline Cordenonsi et al. Chlorhexidine activity against bacteria biofilms. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 12, p. e119-e122, 2013.
- BONNETT, Raymond. Chemical aspects of photodynamic therapy. **CRC Press**, 2014.
- BORGHI, E. et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. **Future Microbiology**. v.9, n.2, p.163-173,2014. ISSN 1746-0913.
- BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira *et al.* Quantitative and structural analyses of the *in vitro* and *ex vivo* biofilm-forming ability of dermatophytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 1045-1052, 2017.

- CAMINOS Daniel A, et al. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4- N,N,N-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 7(9):1071-1078, 2008.
- CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. et al. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 600-606, 2016.
- CAVALCANTE, Alzimary Alzira et al. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *mentha spicata* sobre cepas de *candida* não albicans. 2017.
- CHEN, Borui et al. In vitro Evaluation of Photodynamic Effects Against Biofilms of Dermatophytes Involved in Onychomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- CIEPLIK, Fabian et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.
- CLSI M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of 304 Yeasts. Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
- COCCA, Leandro HZ et al. Investigation of excited singlet state absorption and intersystem crossing mechanism of isomeric meso-tetra (pyridyl) porphyrins containing peripheral polypyridyl platinum (II) complexes. **Chemical Physics Letters**, v. 708, p. 1-10, 2018.
- CORDEIRO, Rossana de Aguiar et al. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Sabouraudia**, v. 53, n. 2, p. 145-152, 2014.
- CORMICK, M. Paula et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1592-1599, 2009.
- COUTO, Gabriela Klein et al. Tetra-cationic platinum (II) porphyrins like a candidate photosensitizers to bind, selective and drug delivery for metastatic melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 202, p. 111725, 2020.
- DOLMANS, Dennis E.; FUKUMURA, Dai; JAIN, Rakesh K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380, 2003.
- EFFENDY, I. et al. Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, p. 8-12, 2005.
- EL-KIRAT-CHATEL, Sofiane; DUFRÊNE, Yves F. Nanoscale imaging of the *Candida*–macrophage interaction using correlated fluorescence-atomic force microscopy. **Acs Nano**, v. 6, n. 12, p. 10792-10799, 2012.
- FATAHINIA, Mahnaz et al. Mycological aspects of onychomycosis in Khuzestan Province, Iran: A shift from dermatophytes towards yeasts. **Current Medical Mycology**, v. 3, n. 4, p. 26, 2017.
- FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 953 p, v.1.

- FIGGE, Frank HJ.; The relationship of pyrrol compounds to carcinogenesis. In: AAAS Research Conference on Cancer. **American Academy Advertising Science**. Washington, DC, 1945. p. 117-128.
- FORMOSA, Cécile et al. Multiparametric imaging of adhesive nanodomains at the surface of *Candida albicans* by atomic force microscopy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 57-65, 2015.
- GARCIA-DIAZ, Maria; HUANG, Ying-Ying; HAMBLIN, Michael 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.
- GODOY-MARTINEZ, Patricio et al. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 168, n. 3, p. 111-116, 2009.
- GU, W.; XU, D.; SUN, S. *In vitro* models to study *Candida albicans* biofilms. **Journal of Pharmaceutics & Drug Development**. v.3, 2015. ISSN: 2348-9782
- GUPTA, A. K. et al. Onychomycosis: a review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 9, p. 1972-1990, 2020.
- GUPTA, Aditya K.; et al. Onychomycosis in the 21st century: an update on diagnosis, epidemiology, and treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525-539, 2017.
- GUPTA, Aditya K.; DAIGLE, Deanne; CARVIEL, Jessie L. The role of biofilms in onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, p. 1241-1246, 2016.
- GUPTA, Aditya K.; KOHLI, Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 2, p. 296-305, 2003.
- GUPTA, Aditya K.; CARVIEL, Jessie; SHEAR, Neil H. Antibiofilm treatment for onychomycosis and chronic fungal infections. **Skin Appendage Disorders**, v. 4, n. 3, p. 136-140, 2018.
- 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.
- GUTERRES, Kevim Bordignon et al. Nanomolar effective report of tetra-cationic silver (II) porphyrins against non-tuberculous mycobacteria in antimicrobial photodynamic approaches. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, p. 102770, 2022.
- HAMBLIN, Michael R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67-73, 2016.
- HONGCHARU, Wichai et al. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 183-192, 2000.

HU, Xiaoqing et al. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1299, 2018.

JORI, Giulio. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1-2, 2006.

KATO, Ilka Tiemy et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 445-451, 2013.

KOKJOHN, Katrina et al. Evaluation of in vitro activity of ciclopirox olamine, butenafine HCl and econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. **International Journal of Dermatology**, v. 42, n. S1, p. 11-17, 2003.

KONOPKA, Krystyna; GOSLINSKI, Tomas Z. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

KOU, Jiayuan; DOU, Dou; YANG, Liming. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81591, 2017.

KROM Bastiaan P., et al. Conditions for optimal *Candida* biofilm development in microtiter plates. *Methods in Molecular Biology*. 2009;499:55-62. doi: 10.1007/978-1-60327-151-6\_7. PMID: 19152039.

KUSHWAHA, Avadhesh et al. Emerging therapies for the treatment of ungual onychomycosis. **Drug development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 10, p. 1575-1581, 2015.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005.

LIPSON R. L, GRAY M. J, BALDES E. J. (1966). Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer, **Ninth International Cancer Congress.**, Tokyo, Japan, pp. 393

LOPES, Leonardo Quintana Soares et al. Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra (4-pyridyl) platinum (II) porphyrin. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 47-54, 2019.

LOVELL, Jonathan F. et al. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2839-2857, 2010.

MACDONALD, Ian J.; DOUGHERTY, Thomas J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 02, p. 105-129, 2001.

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

MARTINEZ-ROSSI, Nilce M., et al., Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369, 2008.

- MERCHAT, Michèle et al. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 3, p. 153-157, 1996.
- MESQUITA, Mariana et al. Revisiting current photoactive materials for antimicrobial photodynamic therapy. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2424, 2018.
- MOAN, Johan; PENG, Qian. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Research**, v. 23, n. 5A, p. 3591-3600, 2003.
- MOORE, J. V. Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications. **British Journal of Cancer**, v. 68, n. 6, p. 1257, 1993.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". **Journal of Immunological Methods**. v. 65, v. 1-2, p. 55-63. 1983.
- MÜGGE, Claudia; HAUSTEIN, Uwe-Frithjof; NENOFF, Pietro. Causative agents of onychomycosis—a retrospective study. JDDG: **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 4, n. 3, p. 218-228, 2006.
- MUKHERJEE, Pranab K. et al. Clinical Trichophyton rubrum strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 82-86, 2003.
- NAUE, Jeferson A. et al. Probing the binding of tetraplatinum (pyridyl) porphyrin complexes to DNA by means of surface plasmon resonance. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 182-189, 2009.
- OLIVEIRA, Vanessa A. et al. Photoactive meso-tetra (4-pyridyl) porphyrin-tetrakis-[chloro (2, 2' bipyridine) platinum (ii) derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 5, p. 1660-1669, 2017.
- ORIEL, Sarit; NITZAN, Yeshayahu. Mechanistic aspects of photoinactivation of *Candida albicans* by exogenous porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 604-612, 2012.
- OVCHINNIKOVA, Ekaterina S. et al. Force microscopic and thermodynamic analysis of the adhesion between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. **Soft Matter**, v. 8, n. 24, p. 6454-6461, 2012.
- PANDEY, Ravindra K.; SMITH, Kevin M.; DOUGHERTY, Thomas J. Porphyrin dimers as photosensitizers in photodynamic therapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 33, n. 7, p. 2032-2038, 1990.
- PERCIVALSL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW: Microbiologia da pele e o papel dos biofilmes na infecção. *Ferida Internacional J* 2012;9:14-32.
- PINTO, Stefania C. et al. Investigation of powerful fungicidal activity of tetra-cationic platinum (II) and palladium (II) porphyrins by antimicrobial photodynamic therapy assays. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 36, p. 102550, 2021.

POLICARD A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinee a la lumiere de Woods. **Compt. Rend. Soc. Biol.** 1924; 91: 1423–1424.

PREVAIZ, S.; Olivo, M. Art and science of photodynamic therapy. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 2006, 33, 551–556.

QUIROGA, Ezequiel D. et al. Mechanistic aspects in the photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by a dimethylaminopropoxy porphyrin and its equivalent with cationic intrinsic charges. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101877, 2020.

QUIROGA, Ezequiel D. et al. Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* induced by cationic porphyrin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 332-339, 2012.

RASSMUSSEN-TAXDAL, D. S; et al., Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. **Cancer**, v. 8, n. 1, p. 78-81, 1955.

RODRIGUES, Ana Beatriz Furtado; DA SILVA PASSOS, Juliene Cristina; COSTA, Maricilia Silva. Effect of antimicrobial photodynamic therapy using toluidine blue on dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103600, 2023.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistencia bacteriana. Interpretando o antibiograma.** 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.118.

ROSSI, Grazielle Guidolin et al. Peripheral tetra-cationic Pt (II) porphyrins photo-inactivating rapidly growing mycobacteria: First application in mycobacteriology. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104455, 2020.

SARDI, J. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micologia.** v.31, n.1, p. 22-29, 2014.

SCHWALBE, Richard; STEELE-MOORE, Lynn; GOODWIN, Avery C. **Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols.** Crc Press, 2007.

SEEGER, M. G. et al. In vitro antimicrobial photodynamic therapy using tetra-cationic porphyrins against multidrug-resistant bacteria isolated from canine otitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, p. 101982, 2020.

SIGURGEIRSSON, B.; BARAN, R. The prevalence of onychomycosis in the global population—a literature study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 11, p. 1480-1491, 2014.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, p.288-305. 2012.

SILVA, Sónia et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Sabouraudia**, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2009.



- SILVEIRA, Carolina Hahn et al. Investigation of isomeric tetra-cationic porphyrin activity with peripheral [Pd (bpy) Cl]<sup>+</sup> units by antimicrobial photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101920, 2020.
- SIMÕES, Carlos et al. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins–The charge number and charge distribution effects. **Catalysis Today**, v. 266, p. 197-204, 2016.
- SNELL, Sara B.; FOSTER, Thomas H.; HAIDARIS, Constantine G. Miconazole induces fungistasis and increases killing of *Candida albicans* subjected to photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 596-603, 2012.
- SO, A.D.; et al., An Integrated Systems Approach is Needed to Ensure the Sustainability of Antibiotic Effectiveness for Both Humans and Animals. **Journal Law Medicine Ethics** 2015, 43, 38–45.
- SOUZA, L. K. H. et al. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 68-71, 2010.
- STYLLI, Stanley S. et al. Photodynamic therapy of brain tumours: evaluation of porphyrin uptake versus clinical outcome. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 584-596, 2004.
- SUDBERY, Peter E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737-748, 2011.
- SYLLA, Khadime et al. Epidemiological and mycological aspects of onychomycosis in Dakar (Senegal). **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 35, 2019.
- TASSO, Thiago T. et al. Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 33, p. 11037-11045, 2017.
- TEGOS, George et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 120, 2012.
- TISOCO, Isadora et al. Photophysical, photooxidation, and biomolecule-interaction of meso-tetra (thienyl) porphyrins containing peripheral Pt (ii) and Pd (ii) complexes. Insights for photodynamic therapy applications. **Dalton Transactions**, v. 51, n. 4, p. 1646-1657, 2022.
- TOKARSKA-RODAK, Małgorzata et al. The analysis of nanomechanical properties of *Candida* spp. by atomic force microscopy (AFM) method. **Advances in Hygiene and Experimental Medicine**, v. 73, p. 353-358, 2019.
- TOSTI, Antonella; PIRACCINI, Bianca Maria. Nail disorders. **Harper's Textbook of Pediatric Dermatology**, p. 2147-2158, 2019.
- TRANNOY, Laurence et al. Impact of Photodynamic Treatment with Meso-substituted Porphyrin on the Immunomodulatory Capacity of White Blood Cell-containing Red Blood Cell Products. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 1, p. 223-230, 2010.

TYAGI, Amit Kumar; MALIK, Anushree. In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against *Candida albicans*. **Micron**, v. 41, n. 7, p. 797-805, 2010.

URQUHART, Carolina Gonzalez *et al.* Antimicrobial activity of water-soluble tetra-cationic porphyrins on *Pseudomonas aeruginosa*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103266, 2023.

VIEIRA, Catia *et al.* Advances in aPDT based on the combination of a porphyrinic formulation with potassium iodide: Effectiveness on bacteria and fungi planktonic/biofilm forms and viruses. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 23, n. 04n05, p. 534-545, 2019.

VILA, Taissa Vieira Machado; ROZENTAL, Sonia; DE SÁ GUIMARÃES, Claudia Maria Duarte. A new model of in vitro fungal biofilms formed on human nail fragments allows reliable testing of laser and light therapies against onychomycosis. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 3, p. 1031-1039, 2015.

VITALE, Roxana G.; AFELTRA, Javier; DANNAOUI, Eric. Antifungal combinations. In: Ernst, E.J., Rogers, P.D. (eds) Antifungal Agents. Methods in Molecular Medicine™, vol 118. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-943-5:143>

VOIT, Thomas *et al.* Spatial distribution of a porphyrin-based photosensitizer reveals mechanism of photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **Frontiers in Medicine**, p. 991, 2021.

WAINWRIGHT, Mark. The emerging chemistry of blood product disinfection. **Chemical Society Reviews**, v. 31, n. 2, p. 128-136, 2002.

WANG, Yucheng *et al.* In Vitro Photodynamic Inactivation Effects of Ru (II) Complexes on Clinical Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Planktonic and Biofilm Cultures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 1, p. 124-133, 2015.

WEISHAUP; K. R; GOMER; C.J; DOUGHERT ;T.J. (1976). Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photoinactivation of a Murine Tumor, **Cancer Res.**, 36, pp. 2326-2329.

WILSON, B. C.; Patterson, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys. Med. Biol.** 2008, 53, R61- R109.

WINCKLER, Klaus D. Focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT). **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 86, n. 1, p. 43-44, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**; WHO: Geneva, Switzerland, 2015. Disponível em: [http://www.wpro.who.int/entity/drug\\_resistance/resources/global\\_action\\_plan\\_eng.pdf](http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf) . Acesso em 10 de outubro de 2022.

XIONG, Ying; TIAN, Xiaodong; AI, Hui-wang. Molecular tools to generate reactive oxygen species in biological systems. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 1297-1303, 2019.

ZINSSTAG, J.; Meisser, A.; Schelling, E.; Bonfoh, B.; Tanner, M. From 'Two Medicines' to 'One Health' and Beyond. Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**. 2012, 79, a492.