

Artigo

“Foto-antibióticos” - a luz na fotoinativação de micro-organismos

Ló, S. M. S.; Barreira, S. M. W.; Gonçalves, A. G.; Tomé, J. P. C.*

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (1), 390-402. Data de publicação na Web: 1 de novembro de 2014

<http://www.uff.br/rvq>**“Photo-antibiotics” - the light in the photoinactivation of microorganisms**

Abstract: The interest in photodynamic inactivation (PDI) has been motivated by the increasing appearance of microorganisms resistant to antibiotics, due to the excessive or inappropriate use of these drugs. PDI involves the combination of a photosensitizer, light and molecular oxygen in order to cause selective destruction of microorganisms. This technique has been proven to be effective against viruses, bacteria, fungi and parasites. This paper aims to highlight some of the results already obtained from the PDI studies.

Keywords: Microorganisms; Photodynamic Inactivation; Antimicrobial PDT; Photosensitizers; Bacteria; Fungi; Virus.

Resumo

O interesse pela inativação fotodinâmica (PDI) tem sido motivado pelo crescente aparecimento de micro-organismos resistentes aos antibióticos, decorrente do uso excessivo ou inadequado destes medicamentos. A PDI envolve a combinação de um fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular com o objetivo de causar destruição seletiva de micro-organismos. Esta vem se mostrando bastante eficiente contra vírus, bactérias, fungos e parasitas. Este trabalho visa apresentar alguns dos resultados já obtidos nos estudos de PDI de micro-organismos.

Palavras-chave: Micro-organismos; Inativação Fotodinâmica; Fotossensibilizadores; Bactéria; Fungos; Vírus.

* Universidade de Aveiro, Departamento de Química & QOPNA, 3810-193 Aveiro, Portugal. Fax: +351234370084; Tel: +351234370342.

✉ jtome@ua.pt

DOI: [10.5935/1984-6835.20150019](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150019)

“Foto-antibióticos” - a luz na fotoinativação de micro-organismos

Stephanie M. S. Ló,^{a,b} Sandra M. W. Barreira,^b Alan G. Gonçalves,^b João P. C. Tomé^{a,c,*}

^a Universidade de Aveiro, Departamento de Química & QOPNA, 3810-193 Aveiro, Portugal.

^b Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Av. Lothario Meissner, 3400 Jardim botânico, Curitiba-PR, Brasil.

^c Ghent University, Department of Organic and Macromolecular Chemistry, B-9000 Gent, Belgium.

* jtome@ua.pt

Recebido em 1 de novembro de 2014. Aceito para publicação em 1 de novembro de 2014

1. Introdução
2. Processos Fotodinâmicos
3. Fotossensibilizadores
4. Luz
5. PDI em micro-organismos
 - 5.1. Bactérias
 - 5.2. Fungos
 - 5.3. Vírus
6. Perspectivas

1. Introdução

A descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming foi uma das maiores revoluções do século XX na área médica, uma vez que foi possível controlar infecções bacterianas até então fatais. Desde então, os antibióticos têm sido indispensáveis no tratamento de infecções microbianas. Este fato contribuiu para o aumento da expectativa de vida humana. Entretanto, tais avanços científicos têm sido acompanhados

por uma redução da eficácia dos antibióticos disponíveis no mercado, o que é resultado do uso inapropriado ou excessivo destas substâncias, tanto em nível médico como veterinário. Com o crescente número de estirpes de micro-organismos resistentes aos antibióticos, é extremamente importante encontrar tratamentos alternativos para as infecções microbianas. A possibilidade da utilização da terapia fotodinâmica como uma abordagem não antibiótica para inativar micro-organismos patogênicos apresenta-se bastante promissora. O processo

fotodinâmico envolve a combinação de um fotossensibilizador (composto fotoativo), luz e oxigênio molecular com objetivo de gerar espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio singlete e radicais livres, os quais são extremamente citotóxicos para as células microbianas. Esta abordagem é designada de inativação fotodinâmica (PDI) de microorganismos.^{1,2}

2. Processos Fotodinâmicos

O diagrama de Jablonski modificado (Figura 1) apresenta as diversas transições que uma molécula fotoativa sofre após passar ao estado excitado, por absorção de luz, e a volta ao seu estado fundamental.

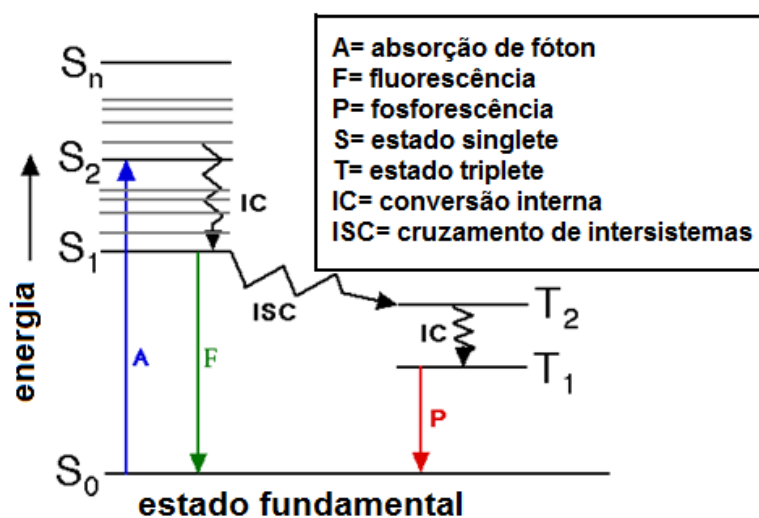


Figura 1. Diagrama de Jablonski modificado³

Este processo pode ser explicado pela capacidade que o macrociclo porfirínico possui em absorver energia no espectro de visível, passando do seu estado fundamental de singlete (S_0) para um estado excitado de singlete (S_1) cujo tempo de vida é da ordem dos nanossegundos. Em princípio, o elétron poderia passar a outros estados excitados de singlete, com tempo de vida na ordem de picossegundos, no entanto, processos de conversão interna conduzem a porfirina ao estado excitado de singlete menos energético (S_1). Existem vias diferentes de retorno ao estado fundamental:

- 1) Decaimento não radiativo, onde a energia é libertada sob a forma de calor.
- 2) Decaimento radiativo por emissão de luz (fluorescência) de comprimento de onda superior à luz absorvida.
- 3) Conversão num estado excitado de triplete

(T_2) através de um fenômeno designado como cruzamento de intersistemas (ISC). Depois, o decaimento para o estado S_0 pode ocorrer por via radiativa, com emissão de fosforescência e implicando em uma inversão de spin, ou por via não radiativa podendo causar modificações químicas em substratos biológicos.

Quando o fotossensibilizador está no estado de triplete, podem ocorrer danos celulares através de dois mecanismos:

a) Mecanismo do tipo I – O fotossensibilizador que se encontra no estado excitado de triplete reage diretamente com moléculas que estão próximas por processos de transferência de elétrons formando radicais livres. No caso em que o oxigênio é o substrato, forma-se o ânion superóxido (O_2^-).

b) Mecanismo do tipo II – O

fotossensibilizador no estado excitado triplete transfere a sua energia para o oxigênio molecular no estado fundamental de triplete ($^3\text{O}_2$), convertendo-o em oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Supõe-se que o oxigênio singlete seja a espécie mais importante no processo de destruição das células alvo.⁴

O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa e oxidante, reagindo indiscriminadamente com uma série de biomoléculas que maioritariamente constituem as membranas celulares como, por exemplo: lipídios insaturados, colesterol e aminoácidos. Dado que as membranas celulares desempenham importantes funções biológicas, tais como delinear e organizar os sistemas biológicos, danos em suas estruturas podem levar à morte/inativação das células-alvo correspondentes.³

3. Fotossensibilizadores

Embora vários fotossensibilizadores já tenham sido aprovados clinicamente para o tratamento do câncer, no que se refere à fotoinativação de micro-organismos apenas alguns fotossensibilizadores têm sido utilizados em tratamentos de infecções microbianas. Os derivados do ALA encontram-se já aprovados para o tratamento da acne. O azul-de-metileno tem sido estudado para o tratamento de infecções orais.^{5,6} Outros fotossensibilizadores bastante estudados na PDI são baseados nos macrociclos tetrapirrólicos, com ênfase principalmente nas porfirinas e clorinas. A Figura 2 mostra as estruturas químicas dessas famílias de fotossensibilizadores mais utilizados em estudos de PDI.⁷

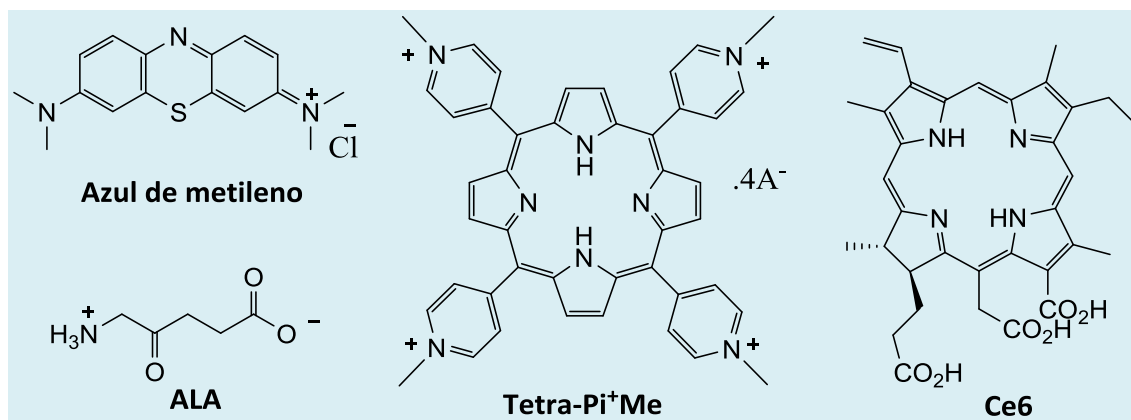


Figura 2. Estrutura química de alguns dos fotossensibilizadores mais estudados na PDI⁷

As principais características de um fotossensibilizador ideal para PDI são: i) ser quimicamente puro; ii) gerar oxigênio singlete ou outras espécies reativas de oxigênio com rendimento apreciável; iii) ser relativamente fotoestável; iv) ter caráter anfifílico; v) ser seletivo para as células-alvo; vi) não ter toxicidade no escuro; vii) Não ser mutagênico; viii) inativar bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários; ix) apresentar uma rápida excreção; x) apresentar um mecanismo de inativação que

torne mínimo o risco de desenvolvimento de estirpes resistentes ao processo/protocolo.⁷⁻⁹

Com relação à anfifilicidade, o caráter anfifílico do fotossensibilizador evita sua agregação e a precipitação. A formação de agregados pode reduzir a absorção da luz, diminuir o tempo de meia vida e rendimento quântico do estado triplete do fotossensibilizador. Dessa forma, assegura-se uma maior probabilidade de adsorção/penetração do fotossensibilizador na/atraves da camada lipídica da membrana

celular. O caráter anfífilico do composto pode ser obtido através da introdução de grupos funcionais adequados na periferia do macrociclo (número diferente de cargas positivas, distribuição assimétrica de carga, cargas catiônicas combinadas com carboidratos).⁷

Alguns estudos compararam a eficiência da fotoinativação bacteriana com o uso de porfirinas com diferente distribuição de cargas (tetra-, tri-, di- ou mono-catiônica). Alves e colaboradores¹⁰ alcançaram melhores resultados na fotoinativação de bactérias (*Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*) utilizando porfirinas tricatiônicas e tetracatiônicas, quando comparadas com porfirinas dicatiônica e monocatiônica.¹⁰ Costa et al.¹¹ testaram os efeitos de seis porfirinas catiônicas com dois a quatro cargas na fotoinativação de bacteriófago de esgoto durante 270 min com 3 concentrações diferente (0,5, 1,0 e 5,0 µM). Os melhores resultados alcançados foram utilizando porfirinas tetra- e tri-catiônicas.¹¹

A conjugação de porfirinas com carboidratos normalmente resulta num conjugado com solubilidade em água melhorada. Estudos anteriores mostraram que a combinação de grupos carregados positivamente com carboidrato podem melhorar ainda mais a fotoinativação do vírus *Herpes simplex* tipo 1.¹² Gomes et al.¹³ obtiveram bons resultados na inativação de *Micrococcus sp* e *Pseudomonas sp* utilizando galactoporfirinas catiônicas.¹³

4. Luz

Os parâmetros de luz, tais como a fonte luminosa, a taxa de fluxo e a dose total de luz desempenham um papel preponderante na eficácia da PDI e deve ser considerada para estabelecer um protocolo antimicrobiano eficaz.¹⁴

São descritas uma variedade de fontes de luz para a ativação dos fotossensibilizadores como, por exemplo: lâmpada simples de filamento de tungstênio e diodos emissor de

luz (350-1100 nm), bem como a luz solar, neste caso mais para fins ambientais.¹⁴

O comprimento de onda da luz necessário para a fotoinativação do micro-organismo dependerá da estrutura e do espectro de absorção eletrônico do fotossensibilizador.^{14,15} As porfirinas apresentam no UV-Vis uma forte absorção na região entre 400-430 nm (Banda Soret) e bandas de menor absorção entre 500-700 nm (Bandas Q). Já as clorinas apresentam banda na região dos 390-430 nm e 650-800 nm (absorção na região do vermelho no espectro). Esta característica faz com que as clorinas possam ser utilizadas em tratamentos de infecções de pele profundas, uma vez que os tecidos são mais transparentes a luz vermelha.²

Estudos revelam que o aumento do comprimento de onda da fonte luminosa induz o decréscimo da eficácia do processo fotodinâmico, para derivados do tipo porfirina, uma vez que as bandas Q destas apresentam baixa absorção.¹⁴

O estudo de Nitzan e Ashkenasi¹⁴ mostrou os efeitos de diferentes luzes em diferentes comprimentos de onda (luz azul, luz verde e luz vermelha) em *D. radiodurans*, usando 2 derivados porfirínicos diferentes. Os resultados indicaram que a luz azul (400-450 nm) é mais eficiente que a luz verde (480-550 nm) e vermelha (600-700 nm) nas condições estabelecidas. Apesar da luz azul se mostrar mais eficiente quando se usam derivados porfirínicos, a luz vermelha acaba a ser a mais indicada para tratamento de lesões profundas, visto ser uma radiação mais penetrante, bastando para isso usar fotossensibilizadores de segunda geração, como por exemplo: clorinas ou ftalocianinas.¹⁴

5. PDI em micro-organismos

5.1. Bactérias

Em geral, bactérias Gram-positivas [Gram (+)] são eficientemente fotoinativadas por

uma variedade de porfirinas, porém as bactérias Gram-negativas [Gram (-)] são usualmente resistentes à ação de fotossensibilizadores neutros.^{16,17} Entretanto, porfirinas catiônicas têm-se mostrado bastante eficientes na fotoinativação tanto de bactérias Gram (-) quanto de Gram (+).¹⁷ Estas diferenças de susceptibilidade entre os dois tipos de bactérias são explicadas pela diferente composição estrutural de suas paredes celulares (Figura 3).^{7,18} As bactérias Gram (+) apresentam uma parede espessa predominantemente constituída de peptideoglicanos, intimamente associada com ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos que permite a passagem dos fotossensibilizadores. Já as bactérias Gram (-) possuem uma parede fina de peptideoglicanos e uma membrana externa, a qual impede a passagem dos fotossensibilizadores e de outros agentes antimicrobianos.^{1,7,18}

Os lipopolissacarídeos (LPS) são moléculas anfifílicas, ou seja, apresentam uma região

hidrofílica (polissacarídeo) e uma região hidrofóbica (lipídeo A). Os LPS localizam-se apenas na parte externa, com a região hidrofílica projetada para a parte externa da célula, contribuindo para a elevada eletronegatividade da superfície bacteriana. Cátions divalentes estabelecem interações não covalentes entre os LPS adjacentes, contribuindo para a estabilização da membrana externa. Esta estabilidade da membrana externa impede a penetração de detergentes, antibióticos e corantes hidrofóbicos. A remoção dos íons divalentes por agentes quelantes origina a libertação de LPS da membrana externa, tornando-a permeável a compostos hidrofóbicos.¹⁹ Neste sentido, alguns trabalhos mostraram que porfirinas neutras conseguem inativar bactérias Gram (-) através do aumento artificial da permeabilidade da membrana externa, e.g. por um pré-tratamento químico com CaCl_2 , Tris-EDTA, polimixinanonapeptídeo, ou por agentes biológicos.^{17,20}

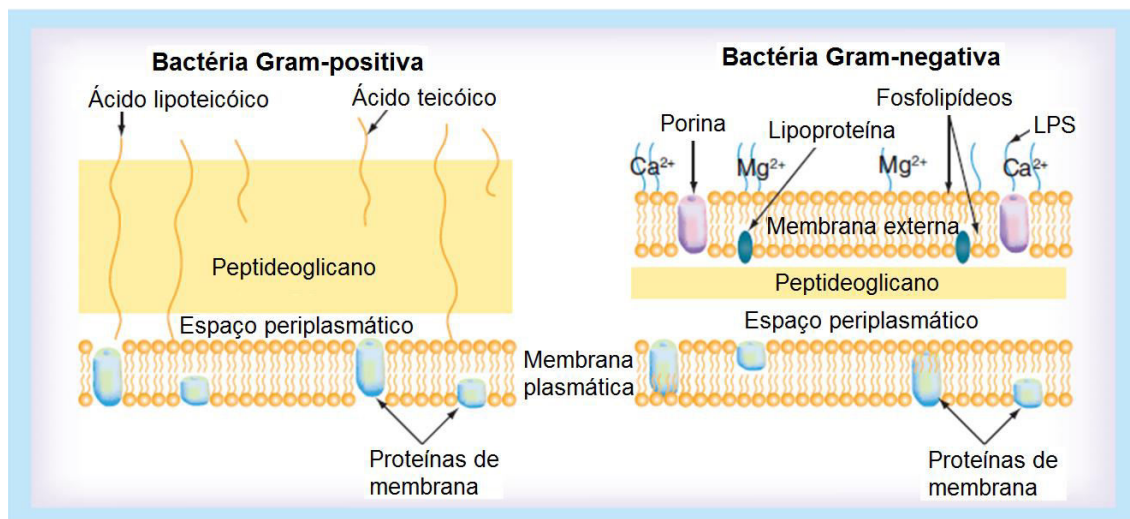


Figura 3: Estrutura da parede celular das bactérias Gram (+) e Gram (-)⁷

Os estudos com porfirinas catiônicas mostraram que há uma interação eletrostática entre a carga positiva do fotossensibilizador e as cargas negativas do fosfato presente nos LPS da membrana externa promovendo a desestabilização da

organização estrutural da parede celular. Assim, quanto maior a desorganização da barreira de permeabilidade, maior a adsorção/uptake do fotossensibilizador pelas células.²⁰ É por esta razão que porfirinas catiônicas apresentam um espectro de ação

maior em comparação que porfirinas neutras e aniônicas.

Outra observação importante que foi feita sobre os fotossensibilizadores catiônicos diz respeito à sua seletividade para células microbianas em comparação às células de mamíferos. As moléculas catiônicas são absorvidas lentamente pelas células do hospedeiro por endocitose, enquanto que a sua ligação às células bacterianas é muito mais rápida. Desta forma, se a iluminação é realizada em intervalos curtos após a aplicação do fotossensibilizador, os danos da PDT para os tecidos infectados serão minimizado.²¹

A porfirina 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il) (Tetra-Pi⁺Me) tem sido testada em vários estudos de fotoinativação de micro-organismos e tem apresentado bons resultados na PDI, sendo mesmo um dos fotossensibilizadores de referência na área.^{2,10,22}

Costa *et al.* comparou a inativação fotodinâmica da porfirina Tetra-Pi⁺Me, porfirina S-piridil tetra-catiônica e clorina S-piridil pentacatiônica contra duas estirpes de bactérias resistentes aos antibióticos (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os resultados mostram que ambas as estirpes, foram eficientemente inativadas pelos três fotossensibilizadores, sendo a clorina pentacatiônica a mais eficaz, principalmente sob luz vermelha. Para a bactéria Gram (+) *S. aureus*, uma redução de log 7,0 foi observada após 5-10 min de irradiação, a uma concentração de 0,5 µM. Já para a bactéria Gram (-) *P. aeruginosa*, a fotoinativação similar ocorreu a uma concentração mais elevada do fotossensibilizador (10 µM), depois do período de tempo de irradiação (30 min).²

Outros fotossensibilizadores de segunda geração, como bacterioclorinas e ftalocianinas, têm sido usados com sucesso na inativação de micro-organismos. Em 2010, Schastak e colaboradores²³ avaliaram a inativação fotodinâmica contra cepas de *S. aureus* (MSSA e MRSA), *E. coli* e *P. aeruginosa* utilizando uma bacterioclorina nas

concentrações de 1, 10 e 100 µM, em diferentes tempos de incubação (30, 90 e 180 min). Neste estudo, obteve-se uma redução ≥99.999% no número de bactérias viáveis de todas as estirpes testadas.²³ Huang *et al.*²⁴ reportou a inativação de *S. aureus* (redução de 5 log) com uma bacterioclorina bis-catiônica numa concentração de 100 nM. Um efeito comparável foi alcançado com a utilização de bacterioclorinas tetra- e hexa-catiônicas (1 µM).²⁴ Pereira *et al.*²⁵ apresentaram bons resultados na fotoinativação de *Escherichia coli* sob luz branca e vermelha, utilizando derivados de ftalocianinas catiônicas de tio-piridínio.²⁵

A clorina e6 (Ce6) é o fotossensibilizador mais utilizado nos estudos experimentais na inativação de micro-organismos dentre os derivados do tipo clorina. Foram obtidos bons resultados com Ce6 usando diodo laser (λ=664 nm) como fonte de luz, na inativação de *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA), *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.²⁶ Numa concentração de 100 µM de Ce6 foi alcançada a inativação de *H. pylori* (redução de 6 log) em até 60 s.²⁷ A conjugação da Ce6 com polilisina causou uma redução de 99% da bactéria *Porphyromonas gingivalis* com luz vermelha.² A Ce6 conjugada a polietilenamina (PEI) inativou a bactéria *Acinetobacter baumannii*.²⁸

Em 2004, Tomé *et al.*²⁹ relataram a síntese, caracterização e a fotoatividade antibacteriana de porfirinas neutras e catiônicas conjugadas a polilisinas. Estes novos compostos foram usados na fotoinativação de bactérias Gram (+) resistentes a antibióticos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e MRSA 110) e uma bactéria Gram (-) (*Escherichia coli* cepa O4). Os resultados mostraram que os conjugados catiônicos foram capazes de inativar ambos os tipos de bactérias.²⁹

É descrito na literatura a fotoinativação de bactérias como *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus hirae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermis*, *Streptococcus faecalis* utilizando ALA como

fotossensibilizador.¹⁴

Além de inativar bactérias, a PDI também tem sido eficiente na inativação de vírus, fungos e parasitas utilizando fotossensibilizadores em concentrações micromolares.³⁰⁻³²

5.2. Fungos

A parede celular fúngica é constituída por uma camada espessa de beta-glucano e quitina, que proporciona uma barreira de permeabilidade intermediária entre bactérias Gram (+) e Gram (-).³³ Assim como nas bactérias, várias abordagens têm sido aplicadas para superar esta barreira de permeabilidade, como a combinação do fotossensibilizador com nonapéptido polimixina³⁴ ou EDTA.³⁵

Espécies de fungos não patogênicos, como *Saccharomyces cerevisiae*,³⁶ têm sido utilizadas para avaliar o dano da destruição celular induzido por PDI em células eucarióticas. Há relatos na literatura da inativação de *Aspergillus fumigatus* através da PDI.³⁷ Em estudos recentes foi observado que *C. albicans* e *Trichophyton rubrum* podem ser fotoinativadas com sucesso utilizando a porfirina catiônica sintética 5-fenil-10,15,20-tris-(1-metilpiridínio-4-il) na forma de sal de cloreto.^{38,39}

ALA (ácido 5-aminolevulínico) também provou ser eficaz *in vivo* contra *Trichophyton rubrum*, confirmando a PDI como uma abordagem alternativa não invasiva para o tratamento da onicomicose.⁴⁰

A PDI tem sido estudada em dermatófitos como: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum cookei*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Nannizia cajetani*.⁴¹ A PDI também se mostrou eficiente em esporos de fungos. Gomes e colaboradores mostraram a inativação de conídios de *Penicillium chrysogenum* utilizando porfirinas catiônicas. Os esporos,

resistentes à dessecação e favoráveis à dispersão, permitem que os fungos sobrevivam em condições ambientais extremas, por longos períodos de tempo. Os experimentos de PDI foram conduzidos com 50 µM de porfirinas sob luz branca (200 mW cm⁻²) por 20 min. A porfirina Tetra-Pi⁺Me foi a mais eficiente nas condições estabelecidas, causando a redução de 4,1 log na concentração de conídios viáveis.⁴² Gonzales *et al.* descreveu a inativação de *Metarhizium anisopliae* e *Aspergillus nidulans* utilizando azul-de-metileno e azul-de-toluidina.⁴³

5.3. Vírus

A maior parte dos trabalhos realizados com vírus tem sido na esterilização de sangue e hemoderivados.^{1,31,44} A PDI é ideal para auxiliar na preparação e preservação de proteína de plasma ou de plasma fresco congelado seguros. Os fotossensibilizadores podem ser adicionados diretamente às unidades de plasma em seus sacos plástico. Corantes de fenotiazina, tais como a azul-de-metileno (MB), azul-de-toluidina, vermelho neutro são fotossensibilizadores adequados uma vez que eles absorvem luz com comprimentos de onda acima de 500 nm, onde as proteínas plasmáticas não absorvem. Além disso, eles formam complexos fortes com as proteínas de superfície e os ácidos nucleicos do vírus.⁴⁵ Lambrecht *et al.*⁴⁵ mostraram que a adição de 1 µM de MB e irradiação de 30 minutos com lâmpada de halogênio de 150 W numa distância de 20 cm foi suficiente para erradicar vírus com envelope como VSH, HSV e H1V1 de 0,5 mL de amostra de plasma.⁴⁵

Huang *et al.*⁴⁶ mostraram que o vírus da dengue pode ser fotoinativado em 5 minutos utilizando-se MB ≥ 1,0 µg/mL com 2,5 m de distância de iluminação da fonte de luz. Entretanto, numa distância de 3 m, o vírus foi inativado em concentrações maiores de MB (2,0 µg/mL) usando tempos mais longos (25 minutos).⁴⁶

Os trabalhos descritos na literatura indicam que os vírus com envelope lipídico são mais susceptíveis à PDI em comparação com as estirpes sem envelope.¹

A comparação da susceptibilidade da inativação fotodinâmica de vírus do tipo DNA e RNA não foram claramente abordadas. Estudos realizados com bacteriófagos T7 (DNA fago), PM2 (DNA fago) e MS2 (RNA fago) indicaram que tanto os fagos de DNA quanto os de RNA podem ser fotoativados utilizando fotossensibilizadores fenotiazínicos. Foi observado um aumento da fotoativação de fago T7 com o aumento na concentração de azul de metileno de 1,0 para 10 μM , enquanto que a taxa de fotoativação de MS2 não variou sob as mesmas condições experimentais.⁴⁷ Costa et al.⁴⁸ apresentou o efeito da porfirina 5,10,15-tris(1-metilpiridínio-4-il)-20-pentafluorofenil (Tri-Pi⁺-Me-PF) sobre a inativação de bacteriófagos sem envelope do tipo DNA e RNA. Os resultados obtidos mostraram que a eficiência fotodinâmica variou de acordo com o tipo de bacteriófago. Além disso, os bacteriófagos do tipo RNA apresentaram ser mais facilmente fotoativados que os do tipo de DNA.⁴⁸

Estudos relataram a fotoativação do vírus *Herpes simplex* tipo 1 e 2 ao utilizar porfirinas catiônicas conjugadas com carboidratos^{12,49} e ALA.⁵⁰

6. Perspectivas

Os estudos mostram a PDI como uma abordagem não antibiótica, para inativar micro-organismos patogênicos, bastante promissora. Até ao momento não há relatos de resistência microbiana para esta modalidade de terapia.⁵¹⁻⁵³ No entanto, a PDI apresenta uma desvantagem, uma vez que é um processo localizado, e assim, é limitada a áreas superficiais do corpo, tais como a pele ou a cavidade oral. Dessa forma, são necessários mais estudos em relação ao sistema de irradiação, a fim de estender a aplicação da PDI em infecções

generalizadas.⁵⁴ Também, vários grupos de pesquisa têm tentado sintetizar fotossensibilizadores com as características ideais para a PDI (modificações estruturais) e entender mecanismos moleculares envolvidos no processo de inativação dos micro-organismos.

Agradecimentos

Os autores agradecem às Universidades de Aveiro, Federal do Paraná e Federal Fluminense, à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), UE, QREN, FEDER, COMPETE pelos fincamentos concedidos à unidade de pesquisa QOPNA (PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296). Stephanie M. S. Ló agradece à CAPES a bolsa de doutorado sanduíche (processo número BEX 14067/13-7). João P. C. Tomé agradece ao CNPq os apoios obtidos ao abrigo do Programa Ciência sem Fronteiras com a ref. 4802069445108663/2012.

Referências Bibliográficas

- ¹ Hamblin, M. R.; Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ² Costa, D. C. S.; Gomes, M. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, A.; Cavaleiro, J. A. S.; Almeida, A.; Tomé, J. P. C. Comparative photodynamic inactivation of antibiotic resistant bacteria by first and second generation cationic photosensitizers. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, *11*, 1905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Bonnet, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews* **1995**, *24*, 19. [[CrossRef](#)]
- ⁴ DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its

- applications. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, 233-234, 351. [CrossRef]
- ⁵ Kharkwal, G. B.; Sharma, S. K.; Huang, Y. Y.; Dai, T.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical applications. *Lasers in Surgery and Medicine* **2011**, 43, 755. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Harris, F.; Pierpoint, L. Photodynamic Therapy Based on 5-Aminolevulinic acid and Its Use as an Antimicrobial Agent. *Medicinal Research Reviews* **2012**, 32, 1292. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Alves, E.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, A.; Tomé, J. P. C.; Almeida, A. Na insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Medicinal Chemistry* **2014**, 6, 141. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in Medical Science* **2009**, 24, 259. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Jori, G.; Fabris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppellotti, O.; Dei, D.; Fantetti, L.; Chiti, G.; Roncucci, G. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. *Lasers in Surgery and Medicine* **2006**, 38, 468. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C.; Tomé, P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, M. A. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiology* **2009**, 15, 70. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Costa, L.; Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A. Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2008**, 7, 415. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Tomé, J. P. C.; Silva, E. M. P., Pereira, A. M. V. M. Alonso, C. M. A., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Tavares, S. A. P., Duarte, R. R., Caeiro, M. F., Valdeirab, M. L. Synthesis of neutral and cationic tripyridylporphyrin-D-galactose conjugates and photoinactivation of HSV-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15, 4705. [CrossRef] [PubMed]
- ¹³ Gomes, M. C.; Silva, S.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Almeida, A.; Cavaleiro, J. A. S.; Tomé, J. P. C.; Cunha, A. Cationic galactoporphyrinphotosensitisers against UV-B resistant bacteria: oxidation of lipids and proteins by $^1\text{O}_2$. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2013**, 12, 262. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Almeida, A.; Cunha, A.; Faustino, M. A. F.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and environmental Application, editado por Hamblin, M. R., Jori, G., Royal Society of Chemistry, Padova, 2011, cap 5.
- ¹⁵ Donnelly, R. F.; McCarron, P. A.; Tunney, M. M. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiological Research* **2008**, 163, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Bonnet, R.; Buckley, D. G.; Burrow, T.; Galia, A. B. B.; Saville, B.; Songca, S. P. Photobactericidal materials based on porphyrins and phthalocyanines. *Journal of Materials Chemistry* **1993**, 3, 323. [CrossRef]
- ¹⁷ Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A.; Jori, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, 32, 153. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Fu, X. J.; Fang, Y.; Yao, M. Antimicrobial Photodynamic Therapy for methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *BioMed Research International* **2013**, 2013, 159157. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Ferreira, W. F. C.; Sousa, J. C. F.; *Microbiologia*, Vol. 1, Lidel: Lisboa, 1998.
- ²⁰ Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology*

- B: *Biology* **1992**, *14*, 262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy target to pathogens. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **2004**, *17*, 245. [[PubMed](#)]
- ²² Pereira, M. A.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A. Influence on external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2014**, *13*, 680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Schastak, S.; Ziganshyna, S.; Gitter, B.; Wiedemann, P.; Claudepierre, T. Efficient Photodynamic Therapy against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using THPTS, a Cationic Photosensitizer Excited by Infrared Wavelength. *Plos One* **2010**, *5*, e11674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Huang, L.; Huang, Y. Y.; Mroz, P.; Tegós, G. P.; Zhiyentayev, T.; Sharma, S. K.; Lu, Z.; Balasubramanian, T.; Krayner, M.; Ruzié, C.; Yang, E.; Kee, H. L.; Kirmaier, C.; Dieris, J. R.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Linsdey, J. S.; Hamblin, M. R. Stable Synthetic Cationic Bacteriochlorins as Selective Antimicrobial Photosensitizers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54*, 3834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Pereira, J. B.; Carvalho, E. F. A.; Faustino, M. A. F.; Fernandes, R.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Gomes, N. C. M.; Cunha, A.; Almeida, A.; Tomé, J. P. C. Phthalocyanine Thio-Pyridinium Derivatives as Antibacterial Photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology* **2012**, *88*, 537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Park, J. H.; Moon, Y. H.; Bnag, I. S.; Kim, Y. C.; Kim, S. A.; Ahn, S. G.; Yoon, J. H. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using highly pure chlorine e6. *Lasers in Medical Science* **2010**, *25*, 705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Simon, C.; Mohrbacher, C.; Huttenberger, D.; Bauer-Marschall, I.; Krickhahn, C.; Stachon, A.; Foth, H. J. In vitro studies of different irradiation conditions for Photodynamic inactivation of Helicobacter pylori. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2014**, *141*, 113. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Dai, T.; Tegós, G. P.; Lu, Z.; Huang, L.; Zhiyentayev, T.; Franklin, M. J.; Baer, D. G.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for *Acinetobacter baumannii* Burn Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53*, 3929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Soncin, M.; Magaraggia, M.; Ferro, S.; Jori, G. Synthesis and Antibacterial Activity of New Poli-S-lysine-Porphyrin Conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 6649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1998**, *42*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Wainwright, M. The emerging chemistry of blood product disinfection. *Chemical Society Reviews*, **2002**, *31*, 128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Costa, L.; Alves, E.; Oliveira, A.; Cunha, A.; Almeida, A. Antimicrobial photodynamic activity of porphyrin derivatives: potential application on medical and water disinfection. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2009**, *13*, 574. [[CrossRef](#)]
- ³³ Dai, T.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2009**, *6*, 170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Nitzan, Y.; Gutterman, M.; Malik, Z.; Ehrenberg, B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochemistry and Photobiology* **1992**, *55*, 89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Valduga, G.; Bertoloni, G.; Reddi, E.; Jori, G. Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and*

- Photobiology B: Biology* **1993**, *21*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Carré, V.; Gaud, O.; Sylvain, I.; Bourdon, O.; Spiro, M.; Blais, J.; Granet, R.; Krausz, P.; Guilloton, M. Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1999**, *48*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Friedberg, J. S.; Skema, C.; Baum, E. D.; Burdick, J.; Vinogradov, S. A.; Wilson, D. F.; Horan, A. D.; Nachamkin, I. In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2001**, *48*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Lambrechts, S. A. G.; Aalders, M. C. G.; Verbraak, F. D.; Lagerberg, J. W. M.; Dankert, J. B.; Schuitmaker, J. J. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2005**, *79*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Smijs, T. G. M.; Van Der Haas, R. N. S.; Lugtenburg, J.; Liu, Y.; Jong, R. L. P.; Schuitmaker, H. J. Photodynamic Treatment of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum* and Microconidia with Porphyrin Photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology* **2004**, *80*, 197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Piraccini, B. M.; Rech, G.; Tosti, A. Photodynamic therapy of onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2008**, *59*: S75-6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Calzavara-Pinton, P. G.; Venturini, M.; Sala. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2005**, *78*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Gomes, M. C.; Barreira, S. M. W.; Faustino, M. A. F.; Fernandes, R.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Tomé, J. P. C. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10*, 1735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Gonzales, F. P.; Silva, S. H.; Roberts, D. W.; Braga, G. U. L. Photodynamic Inactivation of Conidia of the Fungi *Metarhiziumanisopliae* and *Aspergillus nidulans* with Methylene Blue and Toluidine Blue. *Photochemistry and Photobiology* **2010**, *86*, 653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Wainwright, M.; Mohr, H.; Walker, W. H. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2007**, *86*, 45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Santus, R.; Grellier, P.; Schrével, J.; Mazière, J. C.; Stoltz, J. F. Photodecontamination of blood components: advantages and drawbacks. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **1998**, *18*, 299. [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Huang, Q., Fu, W. L., Chen, B., Huang, J. F., Zhang, X., Xue, Q. Inactivation of dengue virus by methylene blue/ narrow bandwidth light system. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2004**, *77*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Specht, K. G. The role of DNA damage in PM2 viral inactivation by methylene blue photosensitization. *Photochemistry and Photobiology* **1994**, *59*, 506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Costa, L.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Faustino, M. A. F.; Almeida, A. Susceptibility of non-enveloped DNA-and RNA-type viruses to photodynamic inactivation. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, *11*, 1520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Mendonça, A. F.; Pegado, I. N.; Duarte, R.; Valdeirab, M. L. Synthesis of glycoporphyrin derivatives and their antiviral activity against herpes simplex virus types 1 and 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 3878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ⁵⁰ Kvacheva, Z. B.; Lobanok, E. S.; Votiakov, V. I.; Shukanova, N. A.; Vorobei, A. V.; Nikolaeva, S. N.; Titov, L. P. Photodynamic inhibition of infection caused by herpes simplex virus type 1 in the cultured cells, by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins. *Voprosy Virusologii* **2005**, *50*, 44. [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Costa, L.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Faustino, M. A. F.; Cunha, A.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A. Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. *Antiviral Research* **2011**, *91*, 278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Tavares, A.; Carvalho, C. M. B.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Gomes, N. C. M.; Alves, E.; Almeida, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Marine Drugs* **2010**, *8*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Giuliani, F.; Martinelli, M.; Cocchi, A.; Arbia, D.; Fantetti, L.; Roncucci, G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54*, 637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Kharkwal, G. B.; Sharma, S. K.; Huang, Y. Y.; Dai, T.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for infections: Clinical applications. *Lasers in Surgery and Medicine* **2011**, *43*, 755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]