



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Anita da Silva Amorim

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

APLICAÇÕES DE TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA A BACTÉRIAS E VÍRUS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pelo
Professor Doutor Luís Arnaut e apresentada ao Departamento de Química da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Anita da Silva Amorim

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pelo Professor Doutor Luís Arnaut e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Terminando mais uma etapa do meu percurso académico não posso deixar de agradecer às pessoas que tornaram tudo possível. Ao longo destes dois anos, muitas foram as pessoas que fizeram com que este caminho fosse mais “fácil” e ao mesmo tempo desafiante. Foram dois anos muito importantes para o meu desenvolvimento académico e pessoal. A todas elas, deixo o meu profundo agradecimento.

Ao Professor Dr. Luís Arnaut agradeço por toda a disponibilidade para comigo e acima de tudo pelo desenvolvimento académico que me proporcionou. Quero agradecer por todo o conhecimento que me transmitiu e por me permitir desenvolver o meu espírito crítico.

À Professora Dra. Mariette Pereira e ao seu grupo de investigação Catálise & Química Fina quero agradecer por me terem fornecido o fotossensibilizador para a realização das experiências.

Ao Dr. Rafael Aroso agradeço por todas as técnicas que me ensinou na microbiologia e por estar disponível sempre que precisava de ajuda. Sem ele tudo seria mais complicado.

À professora Dra. Gabriela gostaria de agradecer por me acolher no seu laboratório de microbiologia e por demonstrar sempre preocupação e auxílio no trabalho que estava a desenvolver. Senti-me muito bem acolhida no seu grupo de investigação. À Sandra, ao Tiago, à Diana, ao Afonso, à Ana e à Inês obrigada por tornarem os dias no laboratório mais animados e doces.

À Dra. Catarina Lobo, que me acompanhou desde o início do meu percurso académico, agradeço por todos os ensinamentos e pelos dados que me forneceu para esta dissertação de mestrado. Agradeço à Dra. Lígia, ao Fábio e aos restantes colegas de grupo por estarem sempre disponíveis para qualquer dúvida ou ajuda.

À Dra. Dina e à Gizete do CNC agradeço pela orientação e pela disponibilidade na realização das experiências com os vírus.

Às amizades feitas em Coimbra, à Marlinha, à Bruna, à Ana e à Daniela obrigada pelos bons momentos que passamos. Apesar de a vida nos ter levado a seguir rumos diferentes ficarão sempre no meu coração.

À Beatriz quero agradecer não só por estes dois anos, mas pelos cinco anos que vivemos e estudamos juntas. Hoje não és mais minha colega de casa, mas sim uma irmã. Obrigada por toda a paciência que tiveste comigo e por ouvires as minhas frustrações pelos desafios que encontrei na realização das experiências da tese.

Aos meus pais, devo um profundo agradecimento pela ajuda e pelo amor que me deram. A minha força de vontade é grande, mas vocês tornaram este percurso muito mais facilitado. Obrigada por porem em primeiro lugar a minha vontade de prosseguir os estudos e estarem sempre disponíveis para me ajudar. Tenho muita sorte em ter-vos comigo. Aos restantes membros da minha família, avós, tios, madrinha, padrinho, primos, obrigada pela preocupação desde o primeiro dia que fui para longe de casa e obrigada por estarem presentes em todas as etapas do meu percurso académico e por acreditarem que era capaz.

Ao Dário, não posso deixar de agradecer por todo o carinho, dedicação e paciência. Obrigada por me fazeres acreditar que sou capaz e que não posso desanimar ao primeiro obstáculo. Desculpa, por não te dar a atenção que muitas vezes precisavas e merecias. Obrigada por seres o meu porto seguro.

Coimbra...

Lembra a canção
Que um dia te cantei
Com as minhas fitas
Em Maio voltarei

Lembra a canção
Que um dia te cantei
És a saudade
Que nunca esquecerei

Balada da despedida 2021/2022

Grupo de Fado Maio

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii

Capítulo 1

INTRODUÇÃO.....	1
1. Infecções por microrganismos multirresistentes	1
2. Bactérias.....	4
2.1 Bactérias na forma planctónica	4
2.2 Biofilmes	5
2.3 Formação do biofilmes	6
2.4 Efeito bacteriostático vs. Efeito bactericida	8
3. Vírus	9
3.1 Estrutura do vírus SARS-CoV-2.....	9
3.2 Antivirais para COVID-19	10
3.2.1 Uso do azul de metileno para COVID-19.....	11
3.2.2 Azul de Metileno na desinfecção fotodinâmica	12
4. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	13
4.1 Mecanismo da terapia fotodinâmica.....	13
4.2 Características de um bom PS	15
4.3 Vantagem da aPDT em relação ao uso de antibióticos	16
4.4 Fontes de Luz na PDT	16
4.5 Fator de Correção	18
4.6 Vias de entrega na PDT em comparação com a aPDT	18
4.7 Estruturas alvo principais da aPDT	19
5. Proposta de trabalho	20

Capítulo 2

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIVIRAL.....	21
1. Métodos.....	21
1.1 Reagentes.....	21
1.2 Fator de Correção	22
1.3 Linhas Celulares Humanas	23
1.4 Citotoxicidade e Fototoxicidade em Células Humanas.	23
1.5 Inativação do vírus em células HEK-293T humanas que expressam ACE2.....	24
1.6 Ativação do fotossensibilizador fora da célula	25
1.7 Análise estatística	26
2. Resultados.....	27
3. Discussão.....	34
4. Conclusão.....	37

Capítulo 3

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIBACTERIANA.....	39
1. Métodos.....	39
1.1 Linhas de Células Humanas.....	39
1.2 Citotoxicidade e Fototoxicidade em Células Humanas.	39
1.3 Bactérias.....	40
1.4 Fotoinativação de Bactérias Planctónicas	40
1.5 Crescimento do Biofilme.....	41
1.6 Inativação Fotodinâmica de Biofilmes.....	42
1.7 Concentração Mínima Inibitória	42
1.8 Análise estatística	43
2. Resultados.....	44
3. Discussão.....	55
4. Conclusão.....	59

Capítulo 4

CONCLUSÃO FINAL.....	61
REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação escalar dos casos de covid no mundo. Adaptado de: World Health Organization, disponível em < <https://covid19.who.int/>>, acessado em 3 de Agosto de 2022).3
- Figura 2.** Representação esquemática das membranas biológicas das bactérias Gram-positivas (Figura 1.a) e Gram-negativas (Figura 1.b). No esquema representativo podemos observar os ácidos teicóicos e lipoteicóicos característicos da bactéria Gram-positiva. No esquema representativo da bactéria Gram-negativa podemos observar as duas membranas de fosfolípidos, externa e interna, e os canais de porina típicos desta classe de bactérias.5
- Figura 3.** Representação esquemática da estrutura de um biofilme. Na figura podemos observar fungos, bactérias, células persistentes, células de sensoras de quórum e EPS responsáveis pela formação do biofilme. (Adaptado de: Martins Antunes de Melo, W. de C; et al., 2021).6
- Figura 4.** Fases de formação de um biofilme. 1) Adesão: células planctónicas aderem a uma área superficial. 2) Maturação: quantidade de matriz extracelular aumenta ao redor das micro colónias devido à secreção contínua de EPS e do início do sistema de comunicação intracelular através das moléculas sensoras de quórum. 3) Dispersão: desprendimento do biofilme devido à restrição de nutrientes para as células. 4) Propagação: Início de um novo ciclo.7
- Figura 5.** Diagrama e estrutura cristalográfica da proteína Spike. (Adaptado de Grobbelaar, L. M.; et al., 2021).10
- Figura 6.** Redução de metemoglobina pelo azul de metileno. NADP^+ = oxidado a partir de fosfato de dinucleotídeo de niconamida-adenina. NADPH = Reduzido a partir de fosfato de dinucleotídeo de niconamida-adenina.11
- Figura 7.** Diagrama simplificado do mecanismo de ação da PDT. Demonstração das formas mais relevantes que podem originar a excitação do fotossensibilizador com um comprimento adequado.14
- Figura 8.** Espectro eletromagnético da luz visível. Adaptado de: Karalak G., dreamstime, disponível em < <https://pt.dreamstime.com/infographic-da-cor-do-espectro-vis%C3%ADvel-luz-solar-image123033953> >, acessado em 08 de agosto de 2022.17

Figura 9. Demonstração de exemplos de espectros de absorção de uma porfirina (vermelho), uma clorina (verde), uma bacteroclorina (roxo) e ftalocianina (azul). No espectro estão rodeados os diferentes picos de absorção de cada composto.	17
Figura 10. Esquema da proposta de trabalho a realizar nesta dissertação de mestrado.	20
Figura 11. Espectro de absorção do fotossensibilizador clorina catiónica com uma concentração de 1,86 mM.	21
Figura 12. Sobreposição, azul, do espectro de absorção do PS, vermelho, com a emissão da fonte de luz do LED, preto, correspondente.	22
Figura 13. Esquema da metodologia usada para determinação da viabilidade celular após realização da terapia fotodinâmica.	24
Figura 14. Esquema da metodologia usada no procedimento de terapia fotodinâmica antiviral.	25
Figura 15. Esquema do ensaio de foto-inativação de vírus antes da sua adição a uma cultura de células realizado pela Dra. Catarina Lobo.	26
Figura 16. Viabilidade celular da clorina catiónica no escuro usando as células HaCaT com um período de incubação de 24 horas.	27
Figura 17. Terapia fotodinâmica de células HaCaT com diferentes concentrações da clorina catiónica, com 24 horas de incubação e 5 J/cm ² de irradiação. As marcas * (p < 0.05), ** (p < 0.01) e *** (p < 0.001) representam a diferença estatística.	28
Figura 18. Terapia fotodinâmica de células HEK, com 12 horas de incubação, 2 concentrações de PS, 227 nM e 450 nM, e diferentes doses de luz, de 0,5 a 4 J/cm ² , usando uma placa branca	29
Figura 19. Terapia fotodinâmica de células HEK, com 12 horas de incubação, 2 concentrações de PS, 227 nm e 450 nm, e diferentes doses de luz, de 0,5 a 4 J/cm ² , usando uma placa transparente	29
Figura 20. Estudo de toxicidade no escuro em células HEK infetadas com partículas lentivirais pseudotipadas, com 227 nM e 450 nM de concentração de fotossensibilizador por um período de incubação de 12 horas.	30
Figura 21. Terapia fotodinâmica em células HEK e vírus em diferentes condições com duas concentrações diferentes de PS e com uma dose de luz de 4J/cm ² .	

PS 1: 450 nM; PS 2: 227 nM. As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.	31
Figura 22. Terapia fotodinâmica com diferentes concentrações de PS, com 12 horas de incubação e 5 J/cm ² de irradiação. a) Viabilidade medida com Alamar blue 24 h após irradiação; b) Viabilidade medida com Alamar blue 60 h após irradiação. As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.	32
Figura 23. Foto-inativação de vírus com duas concentrações diferentes de PS e com uma dose de luz de 4 J/cm ² , antes da sua adição a uma cultura de células HEK. CL 1: 450 nM; CL 2: 227 nM. As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.	33
Figura 24. Esquema da metodologia usada para determinação da viabilidade celular após realização da terapia fotodinâmica.	40
Figura 25. Esquema da metodologia usada para determinação dos CFUs após a realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana em bactérias planctónicas.	41
Figura 26. Esquema da metodologia usada para determinação dos CFUs após a realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana em biofilmes.	42
Figura 27. Terapia fotodinâmica usando diferentes concentrações de clorina catiónica, com 1 hora de incubação e uma dose de luz de 5 J/cm ² . As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.	44
Figura 28. Terapia fotodinâmica usando diferentes concentrações de clorina catiónica, com 30 minutos de incubação e uma dose de luz de 5 J/cm ² . As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.	45
Figura 29. Terapia fotodinâmica usando diferentes concentrações de fotossensibilizador, com 30 minutos de incubação e uma dose de luz de 5 J/cm ² . A irradiação é feita sem ocorrer lavagem das células. As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.	45
Figura 30. Estudo da toxicidade da clorina catiónica no escuro com 1 µM e 1 hora de incubação. A cultura das células bacterianas foi feita em água estéril.	46
Figura 31. Estudo da toxicidade da clorina catiónica no escuro com 1 µM e 1 hora de incubação. A cultura das células bacterianas foi feita em meio Mueller Hinton (MH).	46

Figura 32. Terapia fotodinâmica nas bactérias planctónicas E. coli e S. aureus com duas concentrações diferentes PSs, usando uma dose de luz de 5 J/cm ² e um tempo de incubação de 1 hora. A cultura das células bacterianas foi feita em água estéril.	47
Figura 33. Terapia fotodinâmica nas bactérias planctónicas E. coli e S. aureus com duas concentrações diferentes de clorina, usando uma dose de luz de 5 J/cm ² e um tempo de incubação de 1 hora. A cultura das células bacterianas foi feita em meio Mueller Hinton.	47
Figura 34. Terapia fotodinâmica na bactéria planctónica S. aureus com diferentes concentrações de PS, usando uma dose de luz de 5J/cm ² e um tempo de incubação de 1 hora. A cultura das células bacterianas foi feita em água estéril. As marcas * (p < 0.05), ** (p < 0.01) e *** (p < 0.001) representam a diferença estatística.	48
Figura 35. Terapia fotodinâmica na bactéria planctónica E.coli com diferentes concentrações de PS, usando uma dose de luz de 5 J/cm ² e um tempo de incubação de 1 hora. A cultura das células bacterianas foi feita em água estéril.	49
Figura 36. Concentração mínima inibitória de PS para terapia fotodinâmica eficaz em bactérias S. aureus na forma planctónica, usando uma dose de luz de 5J/cm ² e 1 hora de incubação.	49
Figura 37. Concentração mínima inibitória de PS para terapia fotodinâmica eficaz em bactérias E. coli na forma planctónica. Com uma dose de luz de 5 J/cm ² e 1 hora de incubação.	50
Figura 38. Biofilme formado a partir de bactérias S. aureus sujeito a terapia fotodinâmica com uma irradiação de 5 J/cm ² e um tempo de incubação de 1 hora com duas concentrações de PS.	50
Figura 39. Biofilme formado a partir de bactérias E. coli sujeito a terapia fotodinâmica com uma irradiação de 5 J/cm ² e um tempo de incubação de 1 hora com duas concentrações de clorina.	51
Figura 40. Biofilme formado a partir de bactérias S. aureus sujeito a terapia fotodinâmica com uma irradiação de 5 J/cm ² e um tempo de incubação de 1 hora com duas concentrações de PS.	52
Figura 41. Biofilme formado a partir de bactérias E. coli sujeito a terapia fotodinâmica com uma irradiação de 5 J/cm ² e um tempo de incubação de 1 hora com duas concentrações de clorina.	52

Figura 42. Biofilme formado a partir de bactérias *S. aureus* sujeito a terapia fotodinâmica com uma concentração de clorina de 10 μM , uma dose de luz de 5 J/cm^2 com diferentes tempos de incubação.53

Figura 43. Avaliação qualitativa da terapia fotodinâmica em biofilmes formados a partir de bactérias *S. aureus* com diferentes tempos de incubação e 10 μM de fotossensibilizador e uma dose de luz 5 J/cm^254

ABREVIATURAS

MDR	Microrganismos multirresistentes
OMS	Organização Mundial da Saúde
DDD	do inglês <i>defined daily doses</i>
MW	Peso molecular
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
PDT	Terapia Fotodinâmica
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
QS	Sensoras de quórum
MBC	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
S	Glicoproteína Spike
hACE2	Enzima de conversão da angiotensina humana 2
IgG1	Imunoglobulina G1
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
MB	Azul de metileno
LeucoMB	Azul de leucometileno
ROS	Espécies reativas de oxigênio
PS	Fotossensibilizador
S₀	Estado fundamental singleto
ISC	Cruzamento intersistemas
RV	Relaxamento vibracional
IC	Conversão interna
	Estado excitado tripleto

T₁	
LED	Díodos emissores de luz
NIR	Infravermelho próximo
UVA	Ultravioleta A
DMEM	do inglês Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
LDC	Fator de correção da dose de luz
LD	Luz real absorvida
P	Fonte de luz
HEK293	Células embrionárias de rim humano
HaCaT	Queratinócitos humanos imortalizados
ATCC	do inglês American Type Culture Collection
MH	do inglês Mueller Hinton
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
CFU	do inglês <i>colony-forming unit</i>
BHI	do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>

RESUMO

As infecções por microrganismos multirresistentes (MDR) são um dos grandes desafios para os sistemas de saúde e para as empresas farmacêuticas e prevê-se que este problema aumente, consideravelmente, ao longo das próximas décadas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que podemos retornar à época onde infecções comuns e ferimentos leves podem matar, causando consequências desastrosas ao longo da vida. Existe, assim, uma necessidade urgente de uma nova classe de antibióticos ou de um novo tratamento que seja eficaz contra as espécies multirresistentes. As infecções podem ser causadas por diferentes tipos de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos ou parasitas.

Do ponto de vista biológico, as bactérias podem ser divididas em dois grupos, as gram-positivas ou as gram-negativas. Estes dois grupos possuem diferenças nas suas paredes celulares. Uma grande parte dos estudos de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) são realizados com bactérias na forma planctônica, contudo as bactérias persistem em ecossistemas de biofilmes e raramente em culturas de uma única espécie. Nos biofilmes, os microrganismos são notavelmente menos suscetíveis aos antimicrobianos em comparação com os seus homólogos planctônicos.

Para além das infecções causadas por células bacterianas, os vírus são muito abundantes e podem ser encontrados em uma ampla variedade de formas. Eles têm a capacidade de infectar células eucarióticas ou procarióticas para forçá-las a produzir milhares de cópias do vírus infetante.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana surgiu, deste modo, como uma proposta promissora para o tratamento de infecções localizadas, especialmente infecções cutâneas ou mucosas. A terapia fotodinâmica (PDT) consiste na administração de um medicamento ou de um corante não tóxico, designado como fotossensibilizador (PS, do inglês *photosensitizer*). Após um determinado intervalo de tempo, a lesão é iluminada com luz visível, com um comprimento de onda específico absorvido pelo PS administrado. O PS após absorver a luz fica num estado eletrónico excitado e reage com moléculas de oxigénio levando à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS).

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o potencial de uma clorina catiónica como possível fotossensibilizador em terapia fotodinâmica antimicrobiana. Primeiramente, foi avaliada a capacidade deste composto em reduzir a carga viral, em células HEK que expressam o recetor ACE2 e que se encontram infetadas com partículas lentivirais pseudotipadas, garantindo a viabilidade celular destas células. Numa das experiências, o fotossensibilizador foi ativado juntamente com o vírus e só depois foi adicionado às células. Nesta experiência, verificou-se que ocorria uma redução de cerca de 50 % da carga viral em condições que eram mantidas a viabilidade celular. Numa segunda condição, as células foram incubadas com o vírus e com o PS e só depois ocorreu a irradiação diretamente nas células. Nas condições de realização deste ensaio, a viabilidade celular após tratamento foi muito baixa e é necessário a realização de um novo ensaio de forma a garantir condições em que haja viabilidade celular elevada.

Numa segunda parte do trabalho, o objetivo consistiu em avaliar a atividade do fotossensibilizador para iluminação de bactérias gram-positivas e gram-negativas na forma planctónica e na forma de biofilmes, garantindo sempre, condições de viabilidade celular para as células hospedeiras. Os resultados obtidos mostram que com apenas 0,3 μM de fotossensibilizador, incubado por 1 hora e com apenas 5 J/cm^2 já é possível obter uma redução de 3 log de CFU/ml nas bactérias *S. aureus*, enquanto que com as *E. coli* são precisos 0,4 μM de fotossensibilizador para se verifica esta redução.

Nos biofilmes, a redução de pelo menos 3 log de CFU/ml só foi atingida usando uma concentração de 50 μM com 1h de incubação e 4 J/cm^2 . Por fim, com 10 μM de PS foi realizado um estudo para verificar se o tempo de incubação tinha influência e verificamos que ao aumentar o tempo de incubação do fotossensibilizador em contacto com o biofilme antes da irradiação, a inativação era maior.

Palavras-Chave: Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT); Fotossensibilizador; Clorina catiónica; Vírus; Bactérias Gram-positivas; Bactérias Gram-negativas; Biofilmes.

ABSTRACT

Infections by multidrug-resistant microorganisms (MDR) are a major challenge for health systems and pharmaceutical companies, and this problem can be expected to increase considerably over the coming decades. The World Health Organization (WHO) has reported that we can return to a time when common infections and infectious diseases can kill. There is thus an urgent need for a new class of antibiotics or a new treatment that is effective against multidrug-resistant species. Infections can be sensitive to different types of microorganisms such as bacteria, viruses, fungi, or parasites.

From a biological point of view, bacteria can be divided into two groups: gram-positive or gram-negative. These two cell groups have differences in their walls. A large part of the studies done on antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is carried out with bacteria in planktonic form, but persistent bacteria form biofilm ecosystems and rarely of a single species. In biofilms, bacteria are notably less accessible to antimicrobials compared to their planktonic counterparts.

In addition to very flexible bacterial cell infections, viruses are plentiful and can be found in a variety of forms. They all have the common ability to infect eukaryotic or prokaryotic cells and force them to produce copies of infective viruses.

Antimicrobial photodynamic therapy has emerged as a promising proposal for the treatment of localized infections, especially skin infections or infections of mucous membranes. Photodynamic therapy (PDT) consists of the administration of a drug, which is a non-toxic dye called a photosensitizer (PS). After a certain time, the lesion is illuminated with visible light, with a specific wavelength absorbed by the administered PS. The PS after absorbing light is in an excited oxygen state and reacts with oxygen molecules, forming reactive oxygen species (ROS).

The objective of this work is to evaluate the potential of a cationic chlorin as a possible photosensitizer in antimicrobial photodynamic therapy. First, the ability of this compound to reduce viral load was evaluated in HEK cells that express the ACE2 receptor and that are infected with pseudo typed lentiviral particles, guaranteeing the

cell viability of these cells. In one of the experiments, the photosensitizer was activated together with the virus and only then was it added to the cells. In this experiment, a reduction of about 50% in viral load was found to occur under conditions that maintained cell viability. In a second condition, the cells were incubated with the virus and with the PS, and the irradiation occurred directly in the cells. Cell viability was low in this assay, and it is necessary to carry out new experiments to guarantee conditions in which cell viability is high.

In a second part of the work, the objective was to evaluate the activity of the photosensitizer towards gram-positive and gram-negative bacteria in planktonic and biofilm form, always ensuring cell viability conditions for the human cells. The results show that it is possible to obtain a reduction of 3 log CFU/ml in *S. aureus* bacteria with only 0.3 μM of photosensitizer, incubated for 1 hour, and with only 5 J/cm², whereas in *E. coli*, 0.4 μM of photosensitizer is required to verify this reduction.

In biofilms, a reduction of at least 3 log CFU/ml was only achieved using a concentration of 50 μM with 1 h of incubation and 4 J/cm². Finally, with 10 μM of PS, a study was carried out to verify if the incubation time had an influence, and we found that by increasing the incubation time of the photosensitizer in contact with the biofilm before irradiation, the inactivation was greater.

Key words: Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT); photosensitizer; Cationic chlorin; Virus; Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria; Biofilms.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Infecções por microrganismos multirresistentes

As infecções por microrganismos multirresistentes (MDR) são um dos grandes desafios para os sistemas de saúde e para empresas farmacêuticas. Prevê-se que este problema aumente, consideravelmente, aos longo das próximas décadas. Estima-se que em 2050, 10 milhões de pessoas morram por infecções resistentes a antibióticos, ultrapassando o número de mortes por cancro e por diabetes.¹ Dados divulgados em 2019, revelam que apenas nos Estados Unidos, mais de 2,8 milhões de pessoas adquirem infecções resistentes a antibióticos, resultando em mais de 35000 mortes.²

As infecções podem ser causadas por diferentes tipos de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos ou parasitas.³ A elevada capacidade dos microrganismos se tornarem resistentes deve-se à sua alta taxa de reprodução e plasticidade genética, possibilitando que estas espécies se adaptem a ambientes desfavoráveis e consigam sobreviver. Para além disso, o mecanismo de ação dos antibióticos envolve uma interação muito específica com um determinado alvo e as bactérias têm a capacidade de evoluir alterando essa interação específica.³ Apesar das pandemias mais recentes, como a pandemia de SARS-CoV-2, ser de origem viral, a resistência de espécies bacterianas a antibióticos poderá se tornar numa das doenças mais mortais do mundo nas próximas décadas.⁴

A Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que podemos retornar à época onde infecções comuns e ferimentos leves podem matar, causando consequências desastrosas ao longo da vida e ao longo das gerações.⁵ Em muitas partes do mundo, os tratamentos são cada vez menos eficazes devido à resistência aos tratamentos existentes.⁶

A resistências antimicrobiana já se verifica há muito tempo como o caso da penicilina, que foi sintetizada por um mofo como defesa natural contra a bactérias.⁷ Conhece-se que estirpes da bactéria *Staphylococcus aureus* têm resistência aos antibióticos derivados de penicilina desde a introdução da penicilina no uso clínico.

Apesar da descoberta dos antibióticos ter sido um grande avanço na ciência e de terem salvo milhões de vidas, tratando e impedindo infecções bacterianas, o uso excessivo e inadequado de antibióticos impulsionaram o aumento de espécies multirresistentes.⁸ O consumo global de antibióticos atingiu em 2015, 42 bilhões de doses diárias definidas (DDD, do inglês *defined daily doses*) para uso humano, e prevê-se que aumente para 128 bilhões de DDD em 2023.⁹ Este número é agravado pelo uso de antibióticos em animais. Segundo um relatório de vigilância de 2014 do Centro Europeu de Controle de Doenças, da Agência Europeia de Segurança Alimentar e da Agência Europeia de Medicamentos estimou que em 28 estados-membros da União Europeia, 8927 toneladas de princípios ativos antimicrobianos foram usados para animais, em comparação com às 3821 toneladas usadas para fins médicos.¹⁰ Mais de 70% dos antibióticos aprovados pela FDA são usados na pecuária.¹¹

A resistência microbiana aos antibióticos, tanto em ambientes comunitários como em ambientes hospitalares, prevê-se que continue a aumentar, deste modo, existe uma necessidade urgente de uma nova classe de antibióticos ou de um novo tratamento que seja eficaz contra as espécies multirresistentes.^{4,12} A OMS publicou uma lista das cepas bacterianas para as quais há uma necessidade urgente de novas soluções terapêuticas.¹³

Para além da resistência a infecções antibacterianas, as infecções virais também apresentam resistência ao tratamento. Os tratamentos envolvem, sobretudo, mecanismo de replicação viral e se este tratamento não for 100% eficaz, leva a que alguns genomas possam replicar-se e levar a uma adaptação à resistência. Isto deve-se às grandes populações e mutações dos vírus. Deste modo, é necessário um constante desenvolvimento e inovação de medicamentos antivirais.¹⁴ Vírus encapsulados como a hepatite C, influenza A, HIV e SARS-CoV-2 são particularmente propensos a mutações e podem desenvolver mais rapidamente resistências às terapias atuais.¹⁵

A 3 de Agosto de 2022, foram confirmados 575.887.049 casos de COVID-19 e 6.398.412 mortes, Figura 1.¹⁶ Em Portugal houve 5.338.926 de casos confirmados e 24.595 mortes.¹⁷ Estes número mostram a urgência de uma nova abordagem terapêutica.

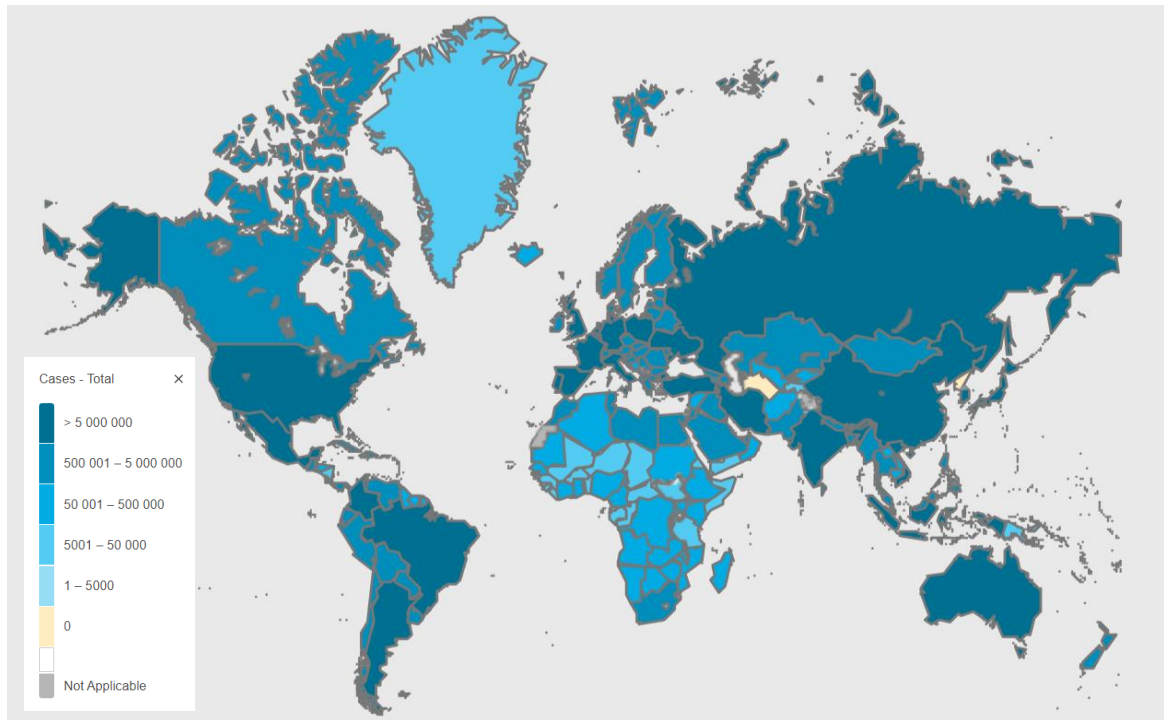


Figura 1. Representação escalar dos casos de covid no mundo. Adaptado de: World Health Organization, disponível em < <https://covid19.who.int/>>, acedido em 3 de Agosto de 2022)

2. Bactérias

2.1 Bactérias na forma planctónica

Do ponto de vista biológico, as bactérias podem ser divididas em dois grupos, as gram-positivas ou gram-negativas. Estes dois grupos possuem diferenças nas suas paredes celulares. Podemos observar as diferenças estruturais destas paredes celulares através da Figura 2.

As bactérias gram-positivas são formadas por uma única bicamada lipídica composta por, aproximadamente, 80% de fosfatidilglicerol e 20% cardiolipina.¹⁸ Esta membrana é composta por camadas de peptidoglicanos conectados que conferem à parede celular uma alta porosidade e espessura. Dentro da camada de peptidoglicanos existem copolímeros de fosfato de glicerol ou fosfato de ribitol e carboidratos, ligados através de ligações fosfodiéster, chamados de ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos.¹⁹ O facto de estas camadas serem altamente porosas, permitem que macromoléculas se difundam facilmente na membrana citoplasmática.²⁰

As bactérias gram-negativas apresentam um citoplasma rodeado por uma bicamada interna de fosfolípidos contendo proteínas membranares. A bicamada interna de fosfolípidos é composta por, aproximadamente, 80% de fosfatidiletanolamina zwitteriônica, 15% de fosfatidilglicerol aniónico e 5% de cardiolipina aniónica.²¹ Esta membrana é seguida por uma pequena camada de peptidoglicano ligada à bicamada externa de fosfolípidos através de lipoproteínas. A membrana externa é composta por lipossacarídeos ricos em grupos fosfatos, compostos por uma porção lipídica ligados a polissacarídeos.²² Os canais de porina na membrana externa permitem a absorção de moléculas polares como água e nutrientes. Deste modo, a membrana das bactérias gram-negativas é considerada uma membrana carregada negativamente capaz de limitar a absorção por difusão passiva de moléculas e também aquelas com peso molecular (MW) superior a 600 Da.²¹ No caso de antibióticos ou moléculas catiónicas, estas podem penetrar mais facilmente as membranas das bactérias gram-negativas, em comparação a outros antibióticos, através de interações electroestáticas com os lipossacarídeos.²³

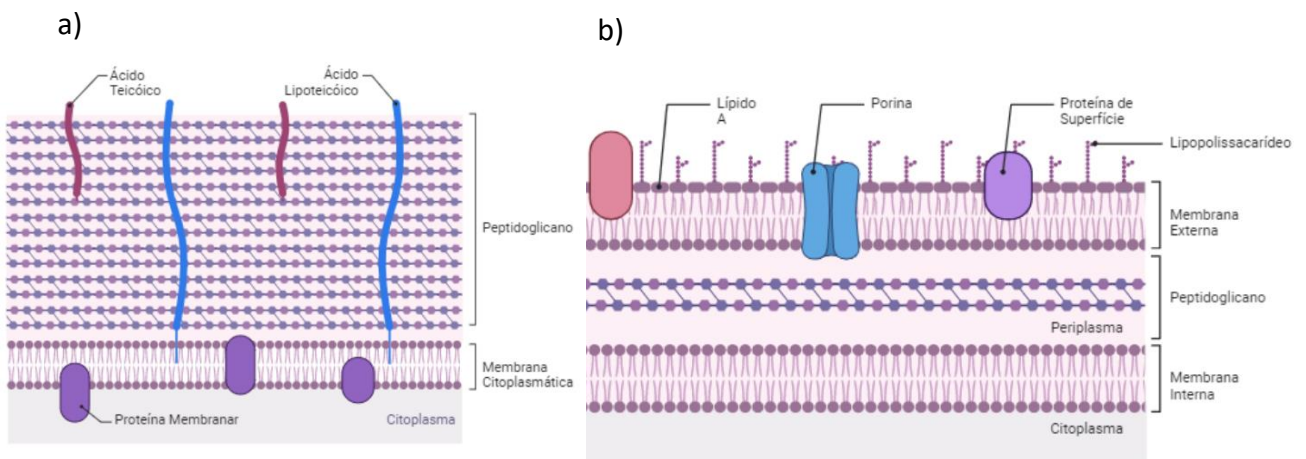


Figura 2. Representação esquemática das membranas biológicas das bactérias Gram-positivas (Figura 1.a) e Gram-negativas (Figura 1.b). No esquema representativo podemos observar os ácidos teicóicos e lipoteicóicos característicos da bactéria Gram-positiva. No esquema representativo da bactéria Gram-negativa podemos observar as duas membranas de fosfolípidos, externa e interna, e os canais de porina típicos desta classe de bactérias.

2.2 Biofilmes

Uma grande parte dos estudos feitos de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) são realizados com bactérias na forma planctônica, contudo as bactérias persistem em ecossistemas de biofilmes e raramente em culturas de uma única espécie.²⁴

Os biofilmes são uma comunidade bem organizada de microrganismos envolvidos em uma matriz derivada do hospedeiro de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) enraizadas em uma superfície biótica (superfícies de tecidos) ou abiótica (dispositivos médicos).²⁵ As EPS conferem proteção ao biofilme uma vez que têm a capacidade de se ligar ao antimicrobiano e contribuir para a sua inativação, restringindo e dificultando a penetração através do biofilme.²⁶ Na Figura 3, temos representado um esquema da estrutura do biofilmes, para além das EPS os biofilmes também apresentam na sua composição células sensoras de quórum. Estas células permitem que haja um sistema de comunicação intracelular, um fator importante também para a resistência.²⁶

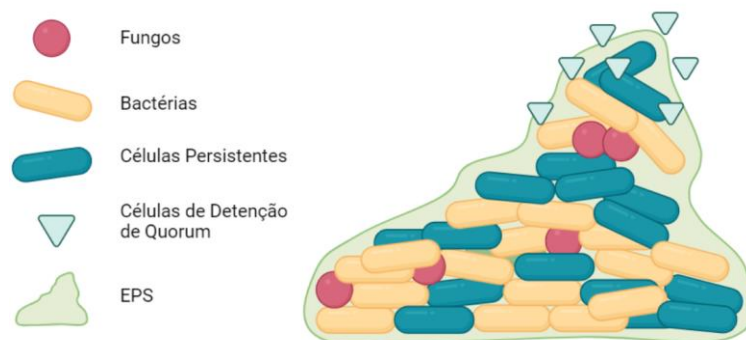


Figura 3. Representação esquemática da estrutura de um biofilme. Na figura podemos observar fungos, bactérias, células persistentes, células de sensoras de quórum e EPS responsáveis pela formação do biofilme. (Adaptado de: Martins Antunes de Melo, W. de C; et al., 2021)

2.3 Formação do Biofilmes

A formação do biofilme é dividida na fase reversível e na fase irreversível, onde se dá a maturação do biofilme, a dispersão e propagação, Figura 4. A adesão reversível ocorre quando as células planctónicas aderem a uma área superficial (biótica ou não biótica) na presença de fatores de virulência como adesinas, pili, flagelo, fímbrias e glicocálice e na presença de reações químicas como forças de van der Waals, forças eletrostáticas e efeito hidrofóbico, iniciando a formação do biofilme.^{27,28} Nesta fase, as células microbianas são suscetíveis aos antimicrobianos. De seguida, passamos para a fase irreversível. Nesta etapa os microrganismos começam a crescer e a se replicar, formando colónias que sofrem modificações transcricionais para adesão, promovendo troca de substrato, distribuição de importantes produtos metabólicos e excreção de produtos metabólicos finais. Nesta fase também é secretado EPS, tornando as células do biofilme menos suscetíveis à defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos. Na fase de maturação do biofilme, a quantidade de matriz extracelular aumenta ao redor das micro colónias devido à secreção contínua de EPS e dá-se o início do sistema de comunicação intracelular através das moléculas sensoras de quórum (quorum-sensing, QS). Ambos os acontecimentos são importantes fatores de resistência. Quando o biofilme já se

encontra maduro, contém uma alta concentração de EPS e contém cavidades entre eles que funcionam como canais de transporte de água, nutrientes e células planctónicas por toda a comunidade do biofilme. A dispersão do biofilme envolve o desprendimento do biofilme devido à restrição de nutrientes para as células e as células procuram outra área de superfície para continuarem a sobreviver. No final do ciclo dá-se a propagação. Nesta fase o biofilme começa um novo ciclo.^{26,29,30}

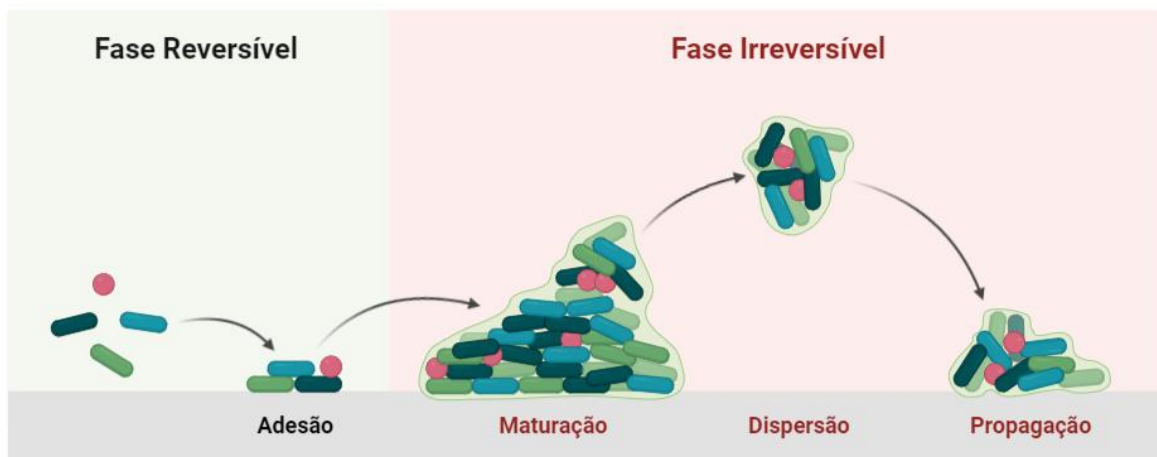


Figura 4. Fases de formação de um biofilme. 1) Adesão: células planctónicas aderem a uma área superficial. 2) Maturação: quantidade de matriz extracelular aumenta ao redor das micro colónias devido à secreção contínua de EPS e do início do sistema de comunicação intracelular através das moléculas sensoras de quórum. 3) Dispersão: desprendimento do biofilme devido à restrição de nutrientes para as células. 4) Propagação: Início de um novo ciclo.

Nos biofilmes, os microrganismos são notavelmente menos suscetíveis aos antimicrobianos em comparação com os seus homólogos planctónicos.³¹ Quando se trata de um biofilme, os mecanismos de tolerância e de resistência incluem uma penetração lenta do antimicrobiano através da matriz do biofilmes, há um microambiente alterado dentro do biofilmes, ocorre uma resposta diferente ao estresse das células bacterianas e há uma formação de uma subpopulação de células persistentes.²⁴

O biofilme possui um microambiente alterado uma vez que, há uma penetração limitada de oxigénio e nutrientes através do biofilme. Isto promove uma baixa atividade

metabólica dos microrganismos e conseqüentemente, diminui os efeitos antimicrobianos, pois maior parte dos antimicrobianos atuam em processos de crescimento como por exemplo, a replicação e síntese da parede celular.³²

Os biofilmes são prejudiciais à saúde, pois estão associados a infecções crônicas. Quando o tratamento antibiótico é retirado estes têm tendência a voltar a crescer contribuindo para a tenacidade dos biofilmes.³³ Estes têm sido um dos problemas mais significativos enfrentados pela saúde pública, estimando-se serem responsáveis por cerca de 80% de todas as infecções, causando muitas mortes e altos custos de saúde em todo o mundo.²⁷

2.4 Efeito bacteriostático vs. Efeito bactericida

Quando estamos a lidar com infecções bacterianas é importante distinguir o efeito bacteriostático do efeito bactericida. O efeito bacteriostático consiste em manter as bactérias numa fase estacionaria do seu crescimento enquanto, o efeito bactericida consiste em extinguir as bactérias e estas morrem.¹

Primeiramente, é importante apresentar duas definições. A concentração inibitória mínima (CIM) que é definida como a concentração que inibe o crescimento bacteriano visível em 24 horas de crescimento em um meio específico, a uma temperatura específica e a uma concentração específica de dióxido de carbono. Em segundo lugar, a concentração bactericida mínima (MBC) é a concentração de um fármaco que resulta em uma redução de 1000 vezes da densidade bacteriana em 24 horas de crescimento nas mesmas condições específicas. A definição de um antibiótico bactericida é aquela para a qual há uma inativação bacteriana acima dos 99,9% enquanto os agentes bacteriostáticos matam cerca de 90%-99% de bactérias do inóculo.³⁴

No entanto, esta medida não é totalmente adequada para fotossensibilizadores uma vez que, concentrações mais baixas de fotossensibilizador podem ser parcialmente compensadas por doses mais altas de luz. Para além disso, os tempos de incubação relevantes para fotossensibilizadores, cerca de 1 h, e para antibióticos, entre 18–24 h, são bastante diferentes.

3. Vírus

A crise pandémica de COVID-19 levou a vários esforços na ciência e na medicina para encontrar soluções para milhares de pacientes todos os dias.

Os vírus são muito abundantes e podem ser encontrados em uma ampla variedade de formas. Eles têm em comum a capacidade de infectar células eucarióticas ou procarióticas para forçá-las a produzir milhares de cópias do vírus infectante.¹⁵

3.1 Estrutura do vírus SARS-CoV-2

A entrada do coronavírus na célula depende da ligação da glicoproteína Spike (S) a um recetor específico e subsequente ativação da proteína S. A glicoproteína S é composta por uma subunidade S1, Figura 5, que medeia a ligação ao recetor hospedeiro e uma subunidade S2 que induz a fusão do envelope viral com as membranas celulares. A entrada na célula é promovida pela forte ligação entre o SARS-CoV-2 e a enzima de conversão da angiotensina humana 2 (hACE2), o que também explica a transmissão eficiente do SARS-CoV-2 em humanos.^{35,36,37} O recetor de entrada hACE2 e a protéase TMPRSS2 associada à entrada viral são altamente expressos nas células epiteliais nasais, o que destaca seu papel na infeção inicial e também como possíveis reservatórios para disseminação dentro ou entre indivíduos.³⁸ Essas descobertas abriram o caminho para o design de diagnósticos, vacinas e terapêuticas para o COVID-19.¹⁵

Após a entrada do vírus dentro da célula, o próximo passo é a entrega do material genético viral, e a sua tradução para produzir proteínas de replicação viral. Estas proteínas vão-se ligar seletivamente ao RNA viral, envolvendo proteínas do hospedeiro e levam ao recrutamento do RNA viral da tradução à replicação em complexo de replicação viral. Os RNAs são libertados iniciando, assim, um novo ciclo de tradução e replicação, tornam-se vírus encapsulados e saem da célula.³⁹

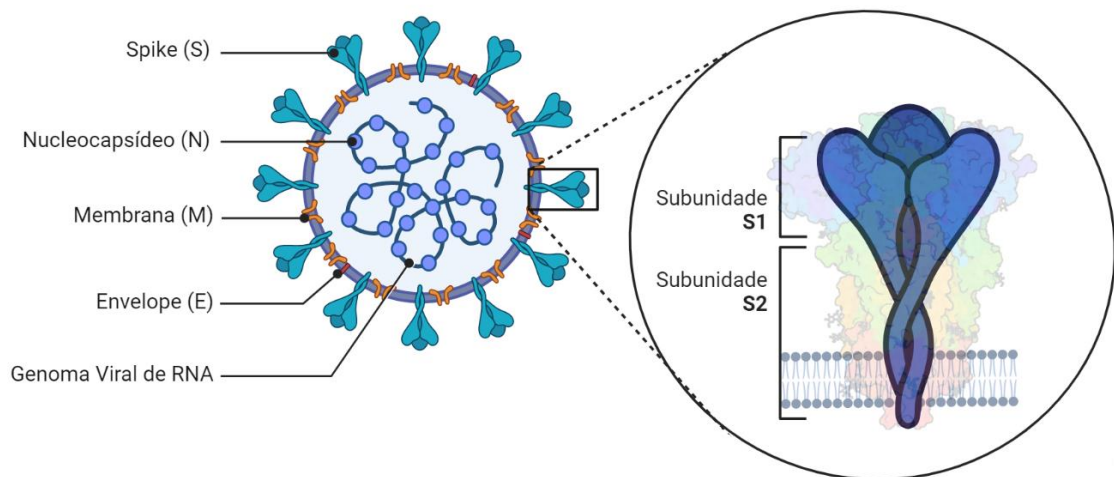


Figura 5. Diagrama e estrutura cristalográfica da proteína Spike. (Adaptada Grobbelaar, L. M.; et al., 2021)

3.2 Antivirais para COVID-19

Bamlanivimab foi o primeiro anticorpo monoclonal desenvolvido e autorizado para tratar a COVID-19 e de seguida surgiu o Etesevimab. Estes fármacos são anticorpos monoclonais de imunoglobulina G1 (IgG1) neutralizantes que se ligam ao recetor da proteína spike.⁴⁰ Porém, estes fármacos só devem ser usados após uma avaliação de cada caso específico uma vez que, o vírus após sofrer mutações deixa de ser sensível a estes princípios ativos e cria assim resistência.⁴¹ O Bamlanivimab e Etesevimab são seletivos para determinadas variantes.⁴¹

Em outubro de 2022, o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) aprovou o remdesivir, um antiviral de amplo espectro, como o primeiro tratamento para a COVID-19, com base em ensaios onde foi demonstrado que pacientes hospitalizados podiam recuperar mais rapidamente e terem maior alívio dos sintomas.⁴² Porém, a mortalidade continuou a ser bastante elevada.

Anteriormente, em junho de 2020, um comunicado à imprensa divulgou que a dexametasona, um potente corticosteroide anti-inflamatório com amplos efeitos na imunidade inata e adaptativa, poderia reduzir em 8 a 26% a mortalidade em 28 dias de pacientes com COVID-19 grave.⁴³

Atualmente, a dexametasona é recomendada para uso isolado ou em combinação com remdesivir para pacientes que necessitam de oxigênio suplementar.⁴⁴ Uma variedade de outras pequenas moléculas mostraram eficácia in vitro contra SARS-CoV-2 e foram propostas para o tratamento com COVID-19, mas ainda não se traduziram em benefícios clínicos significativos como o azul de metileno (MB).⁴⁵

3.2.1 Uso do azul de metileno para COVID-19

Recentemente, alguns investigadores relataram o uso de azul de metileno (MB) para o tratamento de COVID-19. O azul de metileno quimicamente, cloreto de 3,7-bis (dimetil amino) fenotiazina-5-íon é um corante tricíclico de fenotiazina de cor azul.⁴⁶ O MB é usado há muito tempo como agente terapêutico e foi aprovado pelo FDA dos EUA para o tratamento de outras doenças, como a metemoglobinemia. A vantagem adicional do MB é o seu baixo custo.⁴⁷ O MB sofre redução por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para produzir azul de leucometileno (leucoMB), que é um composto incolor, Figura 6.⁴⁸

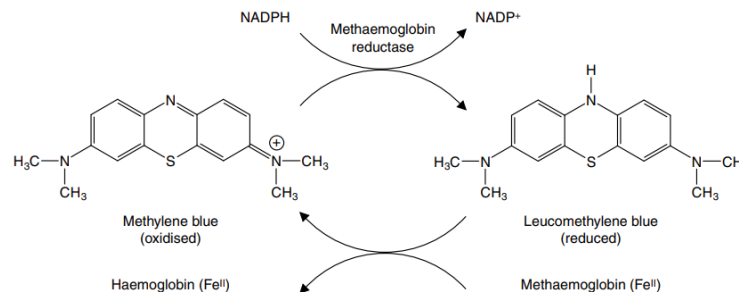


Figura 6. Redução de metemoglobina pelo azul de metileno. NADP⁺= oxidado a partir de fosfato de dinucleotídeo de niconamida-adenina. NADPH= Reduzido a partir de fosfato de dinucleotídeo de niconamida-adenina.

O MB permite a inibição da formação de ião superóxido (precursor de ROS) bloqueando a via da xantina oxidase, e da formação de óxido nítrico (precursor de RNS) inibindo diretamente a síntese de óxido nítrico e a produção de citocinas atenuando a via NF-κB e finalmente inibe também a produção de radicais livres e citocinas.⁴⁹

3.2.2 Azul de Metileno na desinfecção fotodinâmica

Um ensaio de desinfecção fotodinâmica, envolvendo 48 h de exposição, mostrou que o MB inibiu a entrada de um pseudovírus com a proteína SARS-CoV-2 S nas células HEK293T que expressam hACE2.⁴⁵ O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA envelopado e esses vírus são mais sensíveis à aPDT.⁵⁰

O uso de luz para tratar infecções relacionadas às vias aéreas é relativamente comum.¹⁵ Um estudo confirmou que as cargas virais são mais elevadas em zaragatoas nasais em comparação com zaragatoas da garganta nos primeiros dias após o início de sintomas.⁵¹

Ainda não é claro se a proteção contra a infecção só pode ser alcançada antes de o vírus infectar as células, ou se a desinfecção fotodinâmica também é eficaz quando as moléculas do fotossensibilizador e os vírus estão dentro das células. No primeiro caso uma dose de luz curta pode favorecer a desinfecção fotodinâmica do vírus sem fototoxicidade para as células. Um estudo mostrou que era possível atingir uma redução da carga viral nasal favorecendo a recuperação e reduzindo a disseminação da doença através de desinfecção fotodinâmica usando como fotossensibilizador o azul de metileno e com baixas doses de luz. Este estudo propõe a oportunidade de realizar desinfecção fotodinâmica da cavidade nasal e a nasofaringe de pacientes com COVID-19 com fototoxicidade local aceitável e sem toxicidade sistêmica.¹⁵

No entanto, uma vez que o vírus infecta a célula, o grande desafio é encontrar seletividade e foto-inativar o vírus sem a célula sofrer consequências.

4. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana surgiu como uma proposta promissora para o tratamento de infecções localizadas, especialmente infecções cutâneas ou de mucosas.⁵²

O efeito fotodinâmico oncológico é denominado de terapia fotodinâmica. Já quando se trata da inativação de agentes como bactérias, fungos e vírus o efeito fotodinâmico é denominado de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT).¹²

A terapia fotodinâmica surgiu à cerca de 100 anos quando Oscar Raab, no laboratório de Hermann von Tappeiner, descobriu que a iluminação de culturas microbianas na presença de acridina levava à morte celular.⁵³ Com o avançar dos anos a terapia fotodinâmica foi tendo mais aplicações terapêuticas e atualmente, é direcionada para o tratamento de várias doenças neoplásicas, tendo sido aprovados vários fotossensibilizadores para o tratamento de tumores sólidos.⁵⁴

4.1 Mecanismo da terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) consiste na administração de um medicamento que é um corante não tóxico, designado como fotossensibilizador (PS, do inglês *photosensitizer*). Após um determinado intervalo de tempo, a lesão é iluminada com luz visível, com um comprimento de onda específico absorvido pelo PS administrado.⁵⁵ O PS após absorver a luz fica num estado eletrónico excitado e reage com moléculas de oxigénio levando à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS).⁵⁶ A molécula fotossensibilizadora fica no estado singleto quando é eletronicamente excitada, mas rapidamente passa para um estado tripleto ou decai para o estado fundamental. O tempo de vida relativamente longo do estado tripleto permite a transferência de energia para o oxigénio molecular e a geração de oxigénio singleto, ou a transferência de um eletrão para dar origem ao ião superóxido.⁵⁷

O processo fotodinâmico é iniciado quando uma molécula de fotossensibilizador (PS) absorve luz num comprimento de onda específico que corresponda às suas bandas de absorção. Isso causa uma transição do estado fundamental singleto (S_0) para um estado

excitado singleto ($S_1, S_2, \dots S_n$). Normalmente, se a transição ocorre para estados excitados singleto de ordem superior (S_2 para S_n), uma transição rápida não radiativa para S_1 ocorre através do relaxamento vibracional (RV) e conversão interna (IC). Sendo o estado S_1 de curta duração, o PS voltará ao estado fundamental (S_0) por emissão de fótons (fluorescência) ou conversão interna. Alternativamente, ele pode sofrer um cruzamento intersistemas (ISC) para um estado excitado tripleto (T_1), que tem um tempo de vida mais longo.⁵⁷ Posteriormente, o relaxamento para o estado fundamental pode ser novamente radiativo (fosforescência), por conversão interna ou por reação com moléculas oxigênio, que é a mecanismo chave para a foto-inativação de microrganismos.⁵⁸ Aqui há dois mecanismos fotoquímicos possíveis: o tipo I envolve uma transferência de elétrons do PS diretamente ou indiretamente para o oxigênio, levando à formação de O_2^{\bullet} , H_2O_2 e HO^{\bullet} . O tipo II envolve uma transferência de energia para o oxigênio, formando oxigênio singleto (1O_2). Cada uma dessas espécies reativas de oxigênio possuem reatividade química diferente, sabe-se que, em geral, eles podem danificar quase todos os tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos. No caso de microrganismos como bactérias, fungos e vírus, o dano oxidativo acabará por levar à sua inativação, Figura 7.^{50,59}

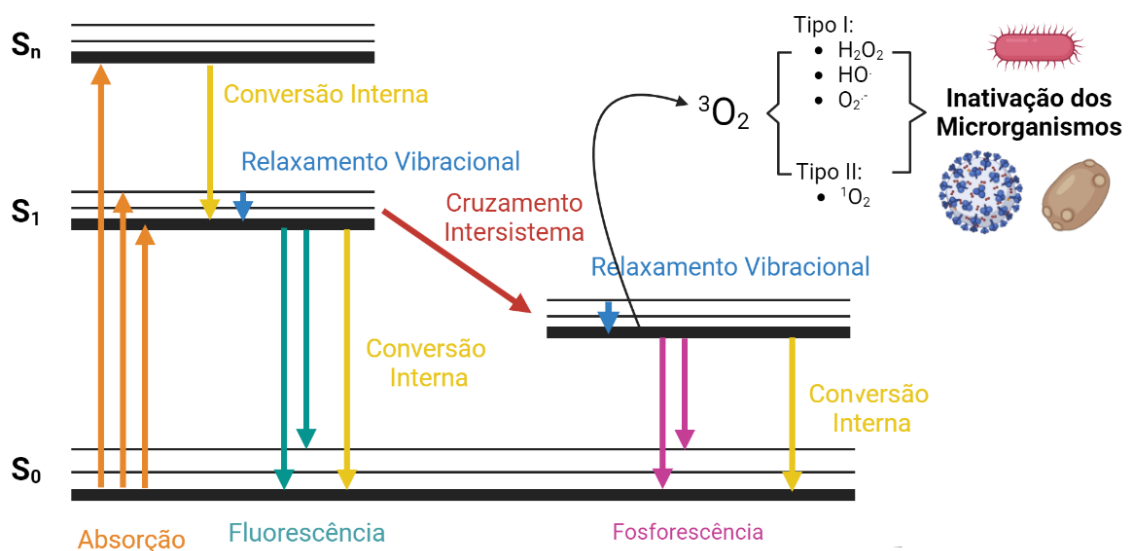


Figura 7. Diagrama simplificado do mecanismo de ação da PDT. Demonstração das formas mais relevantes que podem originar a excitação do fotossensibilizador com um comprimento adequado.

4.2 Características de um bom PS

Os PS usados na terapia fotodinâmica (PDT) devem satisfazer determinadas características, tais como: o baixo nível de toxicidade no escuro, absorver comprimentos de onda na zona do vermelho ou infravermelho próximo para que a luz penetre nos tecidos, as bandas de absorção devem ser relativamente intensas (coeficiente de absorção molar $> 10.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e devem ser eficientes na formação de ROS.⁵⁵

Para além das características acima enunciadas, os PS para aPDT também devem ser capazes de matar várias classes de células microbianas em concentrações relativamente baixas e baixas doses de luz. Na aPDT é muito importante que o PS seja seletivo para o tecido ou células alvo, seguro e não tóxico para células hospedeiras.⁶⁰

No início da aPDT, foram muitas as tentativas de matar microrganismos com fotossensibilizadores que eram usados para tratar cancro, mas mais tarde percebeu-se que essas estruturas não eram as mais ideais.⁶¹ Embora PS neutros e aniônicos possam matar bactérias gram-positivas o mesmo não se verifica nas gram-negativas. As bactérias gram-negativas necessitam de um PS com cargas positivas para se ligar ao exterior da bactéria e penetrar a barreira de externa das bactérias composta por polissacarídeos carregados negativamente.⁶²

PS com substituintes catiónicos, como grupos de amónio quaternário, permitem que haja uma absorção mais rápida quando comparado à absorção do PS pelas células hospedeiras, que ocorre lentamente ao longo do tempo.⁶³ Portanto, se a luz for entregue logo após a aplicação do PS na área infetada, as células microbianas podem ser mortas sem causar danos no tecido hospedeiro.⁶⁴

Deste modo, a morte por PDT de bactérias Gram-positivas é definitivamente mais fácil de realizar do que a de bactérias Gram-negativas.²⁰ Assim, é mais difícil obter PS para uso na aPDT de bactérias Gram-negativas, uma vez que sua barreira membrana impede a captação de PS aniônicos e neutros.⁶⁵

Alguns estudos mostraram que um elevado número de cargas catiónicas faz com que seja um PS muito eficiente contra bactérias Gram-negativas, mas um número mais

reduzido de cargas catiónicas é melhor para matar bactérias Gram-positivas e fungos.⁶⁶ Deste modo, a estrutura ideal de um PS antimicrobiano de amplo espectro deve envolver um equilíbrio cuidadoso entre as cargas catiónicas e o seu carácter hidrofóbico da molécula.⁶⁷

4.3 Vantagem da aPDT em relação ao uso de antibióticos

A aPDT apresenta vantagens em relação às terapias antibióticas uma vez que tem a possibilidade de eliminar microrganismos independentemente do seu padrão de resistência. A aPDT permite um amplo espectro de atividade, tempo de resposta rápido, baixa probabilidade de efeitos colaterais adversos e custo moderado de tratamento. Duas limitações da aPDT são a possibilidade de recrescimento de microrganismos que não foram inativados durante a irradiação, e o facto de só ser adequada para tratamentos localizados.¹²

Nos biofilmes, a aPDT também sugere ser uma boa abordagem, pois acredita-se ser capaz de iluminar os agentes produtores de biofilme, agindo simultaneamente em múltiplos alvos locais e variáveis. Esta técnica inespecífica supera os mecanismos tradicionais de resistência, diminuindo assim a incidência de desenvolvimento de resistência aos medicamentos.³³

4.4 Fontes de Luz na PDT

Na PDT podem ser usadas diferentes fontes de luz de acordo com o fotossensibilizador a ser usado. As fontes de luz podem ser lâmpadas de xenônio, díodos emissores de luz (LEDs), feixes de laser e dispositivos de fibra ótica. Na aPDT pode ser usada uma ampla gama de luz: infravermelho próximo (NIR) (700–810 nm), vermelho (600–700 nm), amarelo (550–600 nm), verde (490–550 nm), azul (400–490 nm) e ultravioleta A (UVA) (330-400 nm), Figura 8.³⁰ Apesar das diferentes gamas de comprimentos de onda, são preferíveis comprimentos de onda mais elevados uma vez que a sua penetração nos tecidos é mais profunda.⁵⁶

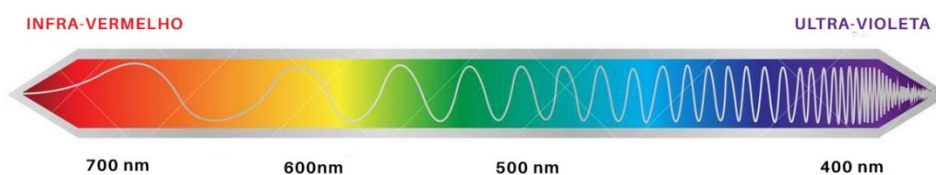


Figura 8. Espectro eletromagnético da luz visível. Adaptado de: Karalak G., dreamstime, disponível em < <https://pt.dreamstime.com/infographic-da-cor-do-espectro-vis%C3%ADvel-luz-solar-image123033953> >, acesso em 08 de agosto de 2022.

Se estivermos a usar um fotossensibilizador que é uma porfirina, a banda de Soret é em torno do 400 nm e daí a fonte de luz a ser usada deve ser dentro desse comprimento de onda. Quando estamos perante um fotossensibilizador como uma clorina ou uma ftalocianina onde o seu pico de absorção é a 650 e 700 nm, respetivamente, a irradiação deve ser feita usando uma lâmpada da zona do vermelho. Na Figura 9, temos uma demonstração dos diferentes espectros de absorção de diferentes compostos. O uso de fotossensibilizadores com comprimentos de onda mais longos é um facto muito importante a ter em conta uma vez que, a penetração de luz vermelha de NIR nos tecidos humanos é muito melhor.³⁰

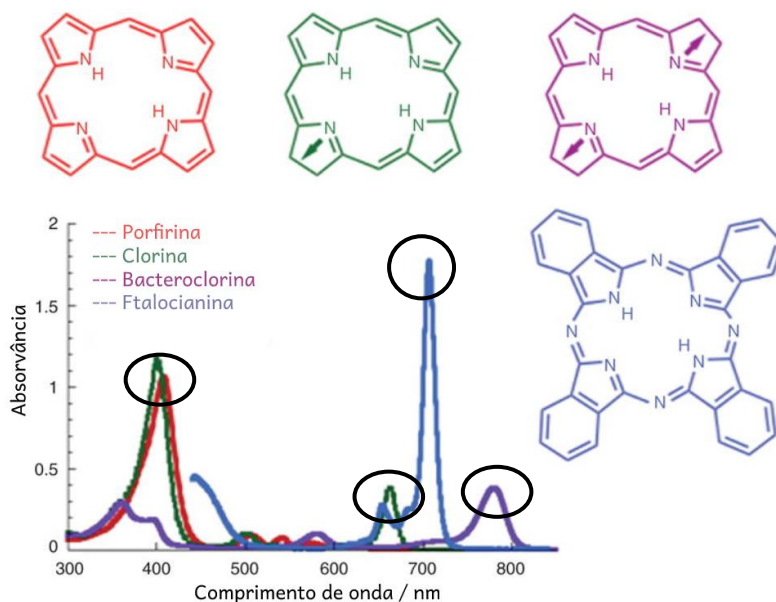


Figura 9. Demonstração de exemplos de espectros de absorção de uma porfirina (vermelho), uma clorina (verde), uma bacteroclorina (roxo) e ftalocianina (azul). No espectro estão rodeados os diferentes picos de absorção de cada composto.

Nos dias de hoje, os LEDs tornaram-se as fontes de luz mais usadas devido às suas vantagens. Os LEDs são mais seguros, mais baratos e são mais fáceis de utilizar.³⁰

4.5 Fator de Correção

Uma definição adequada de dose de luz em PDT deve considerar o número de fótons absorvidos. Isto pode ser conseguido sobrepondo o espectro de absorção do fotossensibilizador com o espectro de emissão da fonte de luz.

Conhecendo a taxa de fluência total em mW/cm^2 emitida pela lâmpada, é possível calcular o fator de correção para o número de fótons emitidos pela lâmpada efetivamente absorvidos pelo fotossensibilizador, por comparação com os fótons absorvidos quando uma fonte de luz monocromática ideal emite no pico de energia mais baixo do espectro de absorção do fotossensibilizador. A sobreposição de ambos os espectros, fornece o fator de correção da dose de luz que reflete o número real de fótons absorvidos. Isso significa que a taxa de fluência da luz emitida por esta lâmpada fluorescente deve ser multiplicada pelo fator de correção para fornecer a dose de luz de uma fonte de luz monocromática equivalente. Essa correção minimiza as discrepâncias entre as doses de luz fornecidas por diferentes fontes de luz (por exemplo, banda larga, LEDs, laser).⁶⁸

4.6 Vias de entrega na PDT em comparação com a aPDT

Há uma grande diferença entre PDT para tratar doenças cancerígenas e para tratar infecções quando se trata da via de entrega do PS.⁶⁷ A melhor maneira de entregar o PS em pacientes com cancro é injetar o composto por via intravenosa. No caso de compostos insolúveis em água, esta via provavelmente requer um veículo de entrega, como lipossomas ou micelas. No entanto, quando estamos perante infecções, a melhor maneira de administrar o PS é localmente, seja por aplicação tópica ou por instilação. A razão para esta diferença é que a ligação do PS às células microbianas é rápida e mediada principalmente por interações carga-carga, enquanto a absorção do PS pelas

células cancerígenas é mais lenta e é mais provável que seja mediada por interações hidrofóbicas.⁶⁹ Deste modo, um bom método para aumentar a seletividade da aPDT para células microbianas sobre células de mamíferos hospedeiros circundantes é a entrega local do PS e um intervalo de luz curto de irradiação.

4.7 Estruturas alvo principais da aPDT

Uma das principais vantagens da aPDT é não depender de apenas um alvo terapêutico. A aPDT pode ter ação em múltiplos alvos como proteínas, ácidos nucleicos e lípidos.⁷⁰

Uns dos alvos celulares cruciais na aPDT são as membranas citoplasmáticas e o DNA. Os danos causados nestes alvos permitem que haja morte de espécies bacterianas.⁵⁹

Os danos oxidativos causados pela aPDT nestes alvos dependem principalmente na localização do PS assim como, do comprimento máximo de difusão das espécies reativas de oxigênio.⁷¹ De uma forma geral, os danos oxidativos ocorrem nas proximidades da molécula fotossensibilizadora. Se o fotossensibilizador se encontrar próximo da célula bacteriana ou se encontra ligado à célula bacteriana através de atração eletrostática, ligações de hidrogênio ou interações de van-der-Waals, este pode limitar o dano oxidativo apenas nas estruturas mais externas como a parede celular ou a membrana citoplasmática. Por outro lado, se o PS for capaz de entrar dentro da célula bacteriana, os danos resultantes podem ser intracelulares tendo como alvo determinadas proteínas ou DNA.

A localização de um PS pode depender da sua estrutura química, da concentração em que é administrado, do solvente, da estrutura da parede celular da bactéria alvo e do tempo entre a administração do PS e a sua iluminação.⁷²

5. Proposta de trabalho

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de uma clorina catiónica como possível fotossensibilizador em terapia fotodinâmica antimicrobiana, Figura 10.

Primeiramente, irá ser avaliada a capacidade deste composto em reduzir a carga viral, em células HEK que expressam o recetor ACE2 e que se encontram infetadas com partículas lentivirais pseudotipadas, garantindo a viabilidade celular destas células. Numa primeira fase, quando o vírus ainda não infetou a célula e o fotossensibilizador será ativado juntamente com o vírus e só depois será adicionado às células. Numa segunda condição, as células serão incubadas com o vírus e com o PS e só depois irá ocorrer a irradiação diretamente nas células.

Numa segunda parte do trabalho, o objetivo consiste em avaliar a atividade do fotossensibilizador para iluminação de bactérias gram-positivas e gram-negativas na forma planctónica e na forma de biofilmes, garantindo sempre, condições de viabilidade celular para as células hospedeiras.

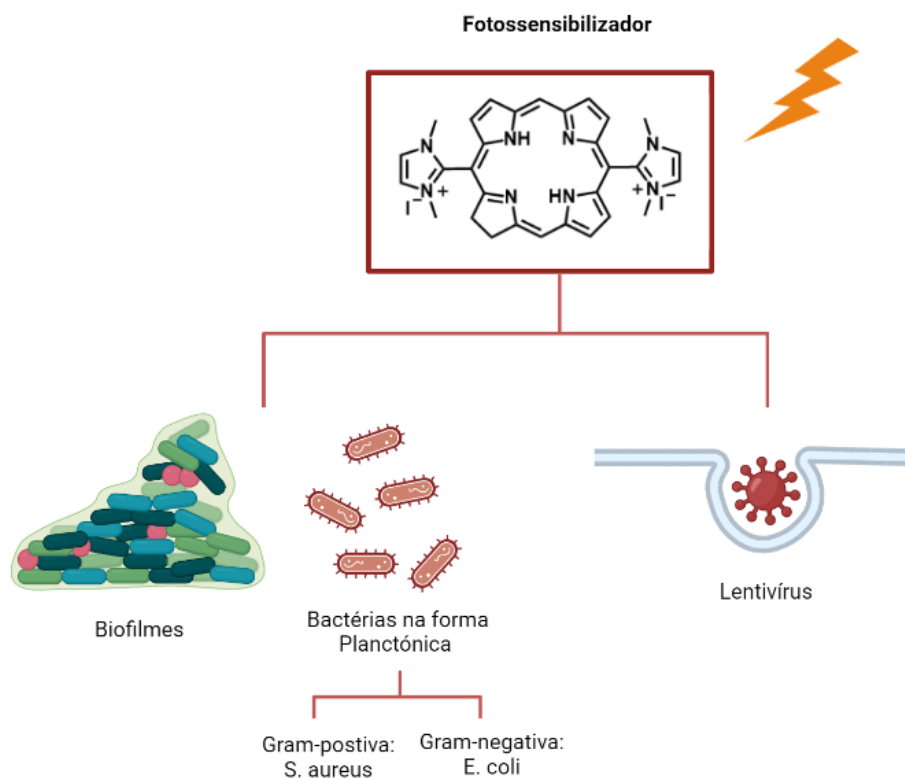


Figura 10. Esquema da proposta de trabalho a realizar nesta dissertação de mestrado.

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIVIRAL

1. Métodos

1.1 Reagentes

O espectro de absorção de formulação de clorina catiónica, 5,15-bis(1,3-dimetillimidazol-2-il)clorina, em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Sigma-Aldrich é apresentado na Figura 11. A clorina foi fornecida pelo Grupo de Catálise & Química Fina fundado e coordenado pela professora Mariette Pereira.

A concentração da solução stock foi calculada através do seu espectro de absorção, Figura 11, utilizando a lei de Beer-Lambert, Equação (i).

$$i. \quad A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Onde A é a absorvância no pico desejado, ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) é o coeficiente de absortividade molar, l (cm) é o percurso ótico e c (M) é a concentração da amostra de clorina. O coeficiente de absortividade molar da clorina a 644 nm é $= 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em dimetilsulfóxido (DMSO).

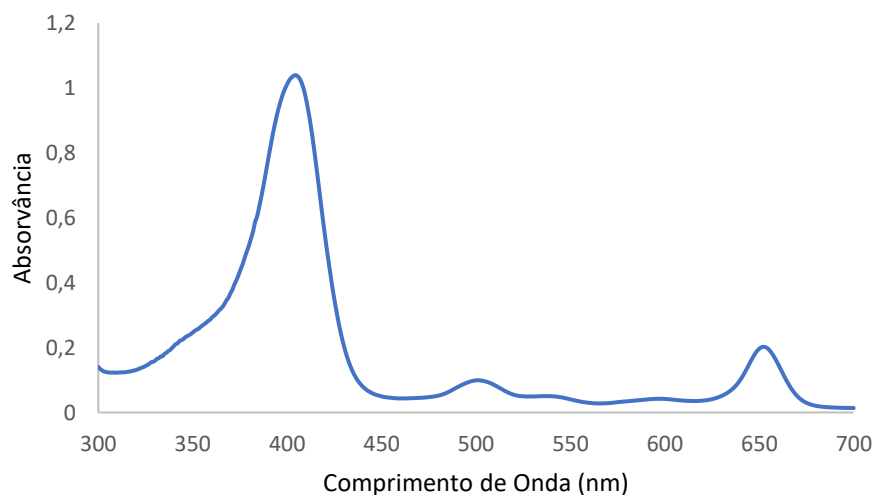


Figura 11. Espectro de absorção do fotossensibilizador clorina catiónica com uma concentração de 1,86 mM.

1.2 Fator de Correção

Para garantir uma uniformidade da dose de luz entregue ao PS catiónico, primeiro foi realizado um estudo sobre a sobreposição do espectro de absorção do PS com a emissão da fonte de luz do LED correspondente. Na figura 12, está apresentado como foi calculado o fator de correção da dose de luz (LDC), sobrepondo o espectro de absorção do LED com o espectro de absorção do fotossensibilizador. Um LED vermelho foi selecionado para irradiação de clorinas.

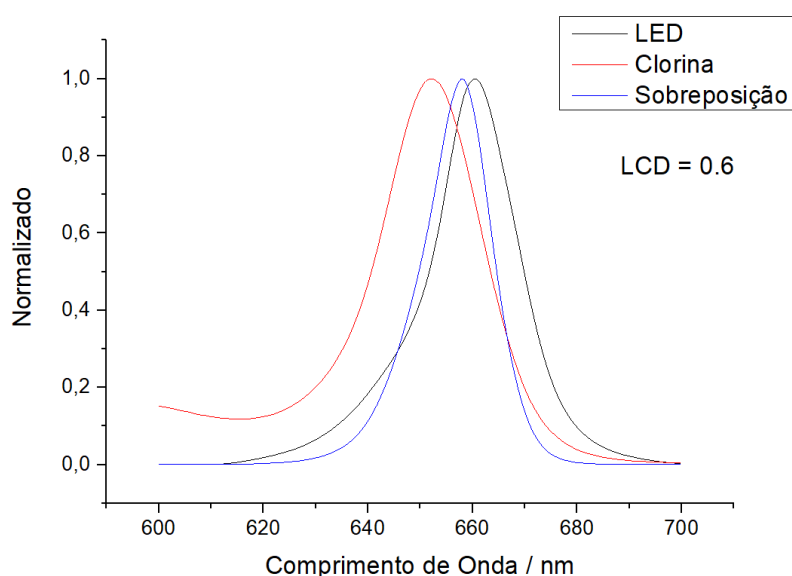


Figura 12. Sobreposição, azul, do espectro de absorção do PS, vermelho, com a emissão da fonte de luz do LED, preto, correspondente.

Calculado o fator de correção podemos ajustar os tempos de irradiação para o composto. A equação (ii) permite este cálculo, onde a dose de luz real absorvida (LD) é obtida pela multiplicação da potência da fonte de luz (P) pelo tempo (t) e pelo fator de correção da dose de luz (LDC), que pode variar entre 0 e 1.

$$\text{ii. } LD = P \times t \times LDC$$

1.3 Linhas Celulares Humanas

Células HEK293T humanas, linhagem de células embrionárias do rim, modificadas de forma a expressam o recetor ACE2 e células HaCaT, linhagens de células de queratinócitos humanos imortalizadas, foram usadas para avaliar a citotoxicidade e a fototoxicidade do fotossensibilizador usado neste estudo. Ambos os tipos de células foram cultivadas em DMEM (BioTech) com adição de 10% de soro bovino. Para realização dos ensaios, as células foram removidas por tripsinização, lavadas com PBS, e mantidas numa atmosfera humidificada a 37°C e a 5% CO₂.

1.4 Citotoxicidade e Fototoxicidade em Células Humanas.

A toxicidade para linhas de células humanas foi avaliada *in vitro* usando como fotossensibilizador a clorina catiónica para estimar a viabilidade celular após o tratamento adequado. Após a fixação das células, soluções de fotossensibilizador com diferentes concentrações entre 0 e 50 µM foram adicionados às culturas de células e incubados por 12 a 24 horas, a 37 °C, no escuro. Após lavagem com meio as células foram iluminadas com um LED de 660 nm aplicando uma dose de luz de 5 J/cm². Após 24 horas, foi feita a avaliação da viabilidade celular usando o método de Alamar Blue. O método de Alamar Blue consiste na utilização do corante resazurina que não é fluorescente, mas após a redução por células metabolicamente ativas é convertido em um produto altamente fluorescente (resorufina). A percentagem de viabilidade celular foi determinada usando um leitor automático de microplacas (Multiskan Go Thermo) para medir a fluorescência, Figura 13.

No caso da avaliação da citotoxicidade as células foram sujeitas às mesmas condições, mas não sofreram irradiação.

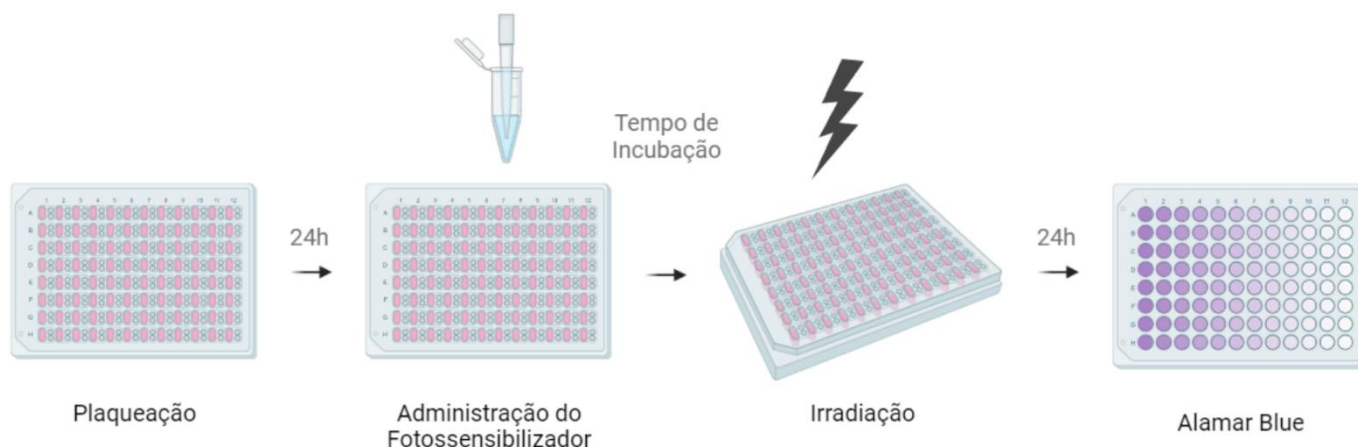


Figura 13. Esquema da metodologia usada para determinação da viabilidade celular após realização da terapia fotodinâmica.

1.5 Inativação do vírus em células HEK-293T humanas que expressam ACE2

Cerca de 8.5×10^3 células HEK-293T humanas que super-expressam permanentemente o gene hACE2 (células T CoronaAssay-293 (hACE2)–#: CACL-0012, Vector Builder), ou seja, células HEK-293 T-hACE2, foram plaqueadas em placas de 96 poços com DMEM rico em glicose, sem vermelho de fenol. Vinte e quatro horas depois as células foram infectadas com partículas lentivirais pseudotipadas e foi adicionado o fotossensibilizador nas diferentes concentrações. O fotossensibilizador foi incubado durante 12 horas. De seguida, as células foram lavadas por 2 vezes com DMEM sem vermelho fenol e irradiadas com um LED de 650 nm usando uma dose de luz de 4 J/cm^2 . Após 72 horas foi usado o equipamento FLUOstar OMEGA (BMG Labtech GmbH) e o kit Luciferase Assay System Bright-Glo-Promega, de acordo com as instruções do fabricante para avaliar a expressão do vírus. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio Alamar Blue com resazurina a $0,01 \text{ mg/mL}$ antes do ensaio de luciferase, Figura 14.

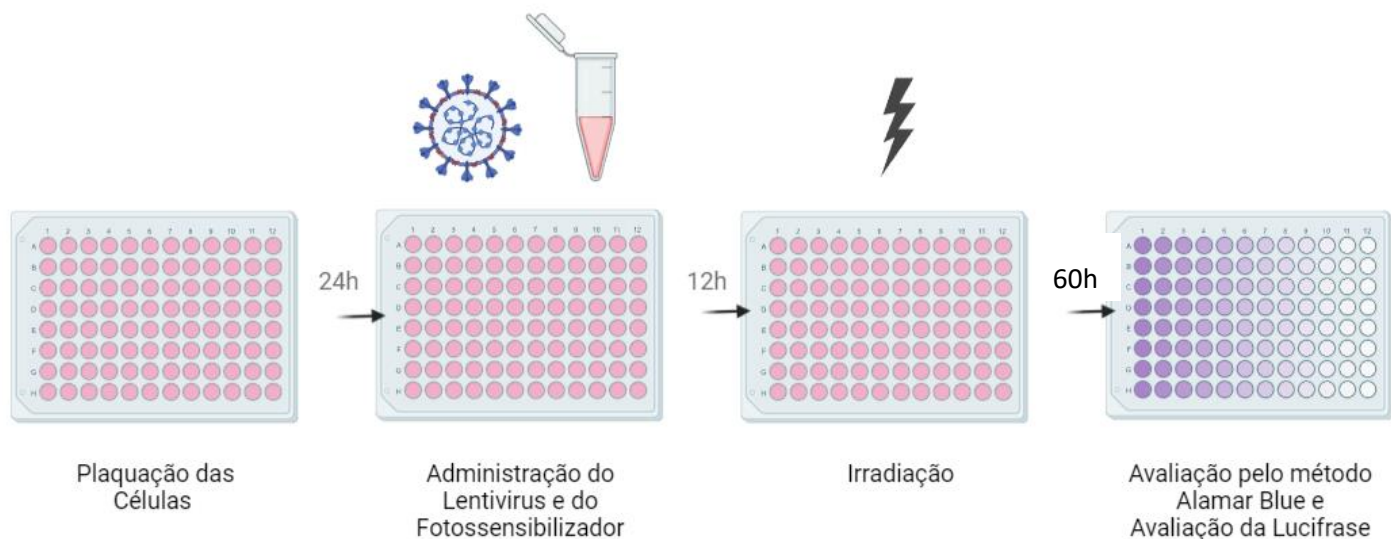


Figura 14. Esquema da metodologia usada no procedimento de terapia fotodinâmica antiviral.

1.6 Ativação do fotossensibilizador fora da célula

O ensaio de foto-inativação de vírus antes da sua adição a uma cultura de células foi realizado pela Dra. Catarina Lobo. 8.5×10^3 Células renais embrionárias humanas que superexpressam permanentemente o gene hACE2 (células T CoronaAssay-293 (hACE2)–#: CACL-0012, Vector Builder), ou seja, células HEK-293 T-hACE2, foram plaqueadas em placas de 96 poços com DMEM, sem vermelho de fenol, Sigma-Aldrich D1145. Vinte e quatro horas depois, as células foram infectadas com partículas lentivirais pseudotipadas previamente foto-inativadas. A foto-inativação destas partículas lentivirais foi realizada adicionando o fotossensibilizador às partículas lentivirais em DMEM sem vermelho de fenol, imediatamente seguida de iluminação com uma dose de luz de 4 J/cm^2 . O meio foi substituído 24 h após a infecção e a luminescência foi analisada 72 h pós-aPDT usando equipamento FLUOstar OMEGA (BMG Labtech GmbH) e kit Luciferase Assay System Bright-Glo-Promega, de acordo com as instruções do fabricante. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio Alamar Blue com resazurina a $0,01 \text{ mg/mL}$ antes do ensaio de luciferase, Figura 15.

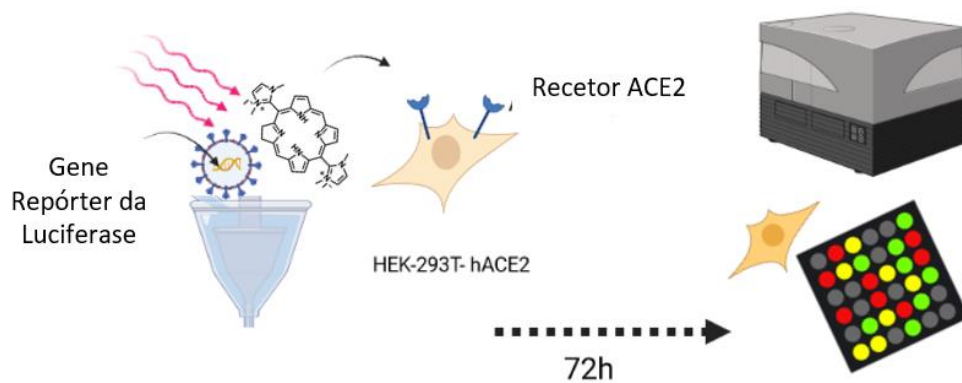


Figura 15. Esquema do ensaio de foto-inativação de vírus antes da sua adição a uma cultura de células realizado pela Dra. Catarina Lobo.

1.7 Análise estatística

Os valores medidos nas diferentes experiências são apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 8. A informação foi analisada com o teste One-way ANOVA. Cada condição tem um mínimo de três ensaios biológicos ($n=3$), sendo que cada um dos ensaios corresponde à média do triplicado.

2. Resultados

Na Figura 16, podemos avaliar a citotoxicidade do fotossensibilizador. Como podemos verificar, este fotossensibilizador não apresenta toxicidade apreciável no escuro. O que nos indica que será um bom fotossensibilizador para ser usado em terapia fotodinâmica se gerar toxicidade nos alvos desejados quando sujeito a irradiação.

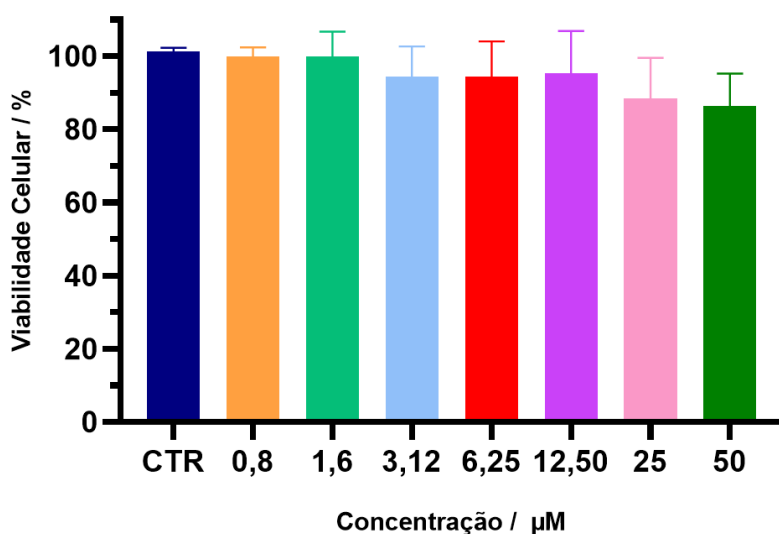


Figura 16. Viabilidade celular da clorina catiónica no escuro usando as células HaCaT com um período de incubação de 24 horas.

Na Figura 17, estão representados os resultados obtidos para uma gama de concentrações de 0,016 μM , 0,031 μM , 0,063 μM , 0,125 μM , 0,250 μM , 0,5 μM e 1 μM . Após um período de incubação de 24 horas com o fotossensibilizados, as células HaCaT foram lavadas e de seguida foram irradiadas com uma dose de luz de 5 J/cm². De acordo com os resultados obtidos, podemos verificar que a concentrações acima de 0,125 μM a viabilidade celular é inferior a 80 %.

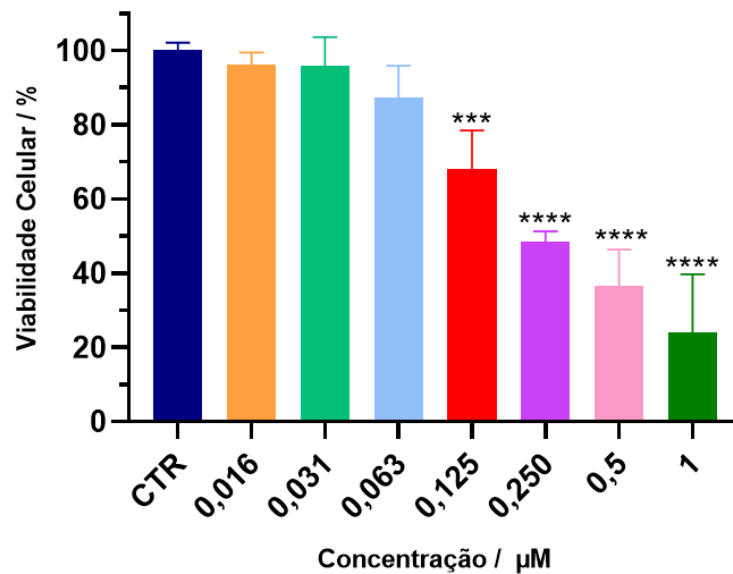


Figura 17. Terapia fotodinâmica de células HaCaT com diferentes concentrações da clorina catiónica, com 24 horas de incubação e 5 J/cm^2 de irradiação. As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.

Após os estudos efetuados de viabilidade acima reportados, a experiência foi transferida para o CNC, mas verificou-se uma maior diminuição da viabilidade celular a baixas concentrações. No CNC, as placas usadas eram de cor branca e nas experiências acima referidas as placas eram transparentes. Assim foi feito um novo ensaio com células HEK, com 12 horas de incubação, usando os dois tipos de placas para verificar se não havia diferença na viabilidade devido à reflexão da luz pelas placas brancas.

Analisando os resultados obtidos, Figura 18, placa branca e Figura 19, placa transparente, podemos verificar que não existe diferença significativa.

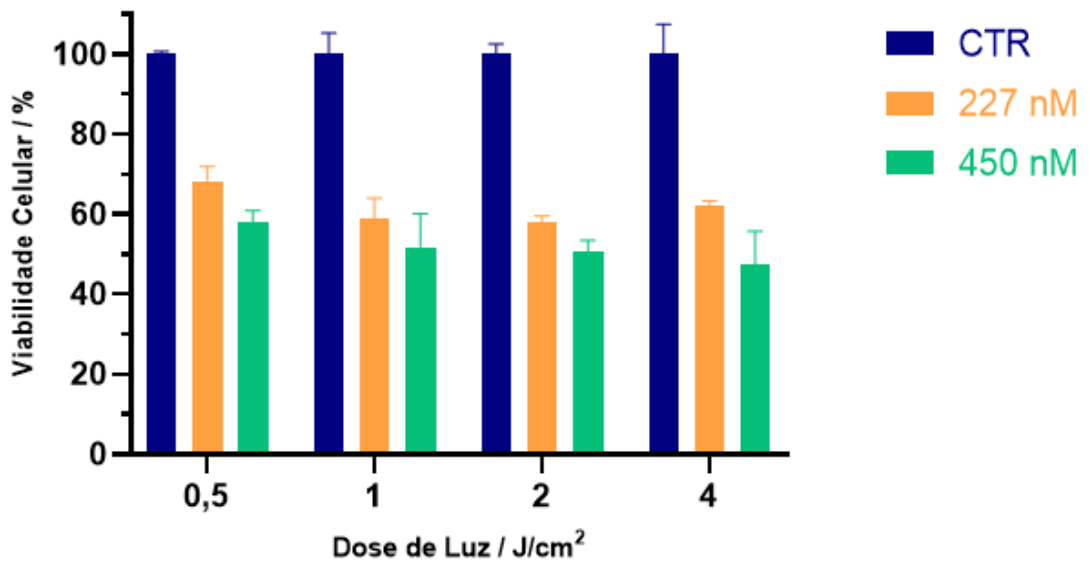


Figura 18. Terapia fotodinâmica de células HEK, com 12 horas de incubação, 2 concentrações de PS, 227 nM e 450 nM, e diferentes doses de luz, de 0,5 a 4 J/cm², usando uma **placa branca**.

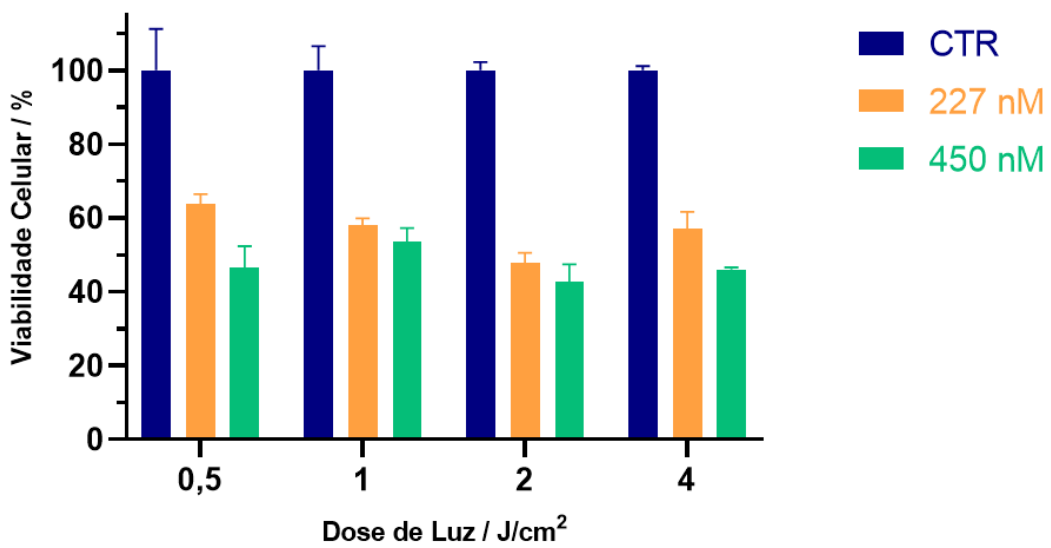


Figura 19. Terapia fotodinâmica de células HEK, com 12 horas de incubação, 2 concentrações de PS, 227 nM e 450 nM, e diferentes doses de luz, de 0,5 a 4 J/cm², usando uma **placa transparente**.

Passando para os estudos da terapia fotodinâmica antiviral, após 24 horas de plaquear as células, as células foram infectadas com as partículas lentivirais e foi administrado o fotossensibilizador nas concentrações de 227 nM e 450 nM. O fotossensibilizador foi incubado 12 horas no escuro e no final do período de incubação as células foram lavadas e irradiadas com uma dose de luz de 4 J/cm². Na Figura 20, podemos confirmar que o fotossensibilizador não apresenta atividade no escuro.

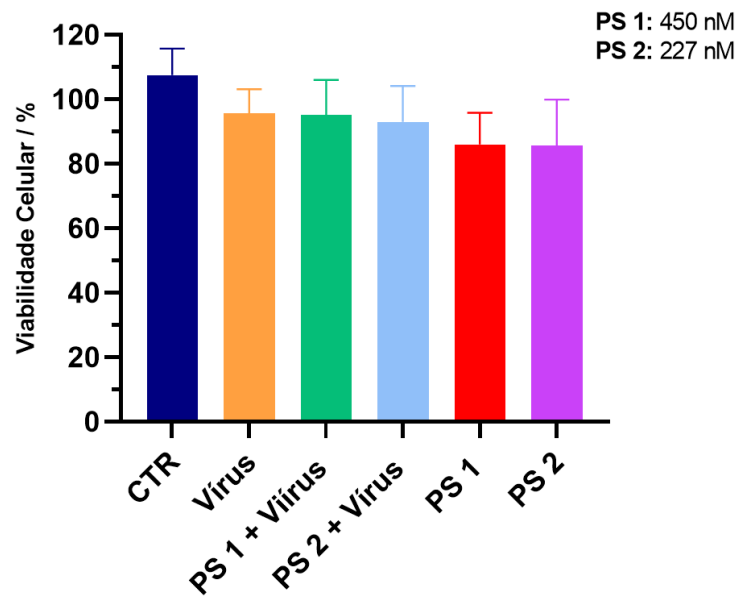


Figura 20. Estudo de toxicidade no escuro em células HEK infectadas com partículas lentivirais pseudotipadas, com 227 nM e 450 nM de concentração de fotossensibilizador por um período de incubação de 12 horas.

Na Figura 21, estão representados os resultados da terapia fotodinâmica usando uma dose de luz de 4 J/cm². Analisando os resultados, apenas se verifica viabilidade celular na condição em que é usado apenas luz e na condição de vírus e luz. Na condição de luz e fotossensibilizador seria de esperar resultados de viabilidade celular concordantes com os estudos apresentados nas Figuras 18 e 19, mas tal não se verificou.

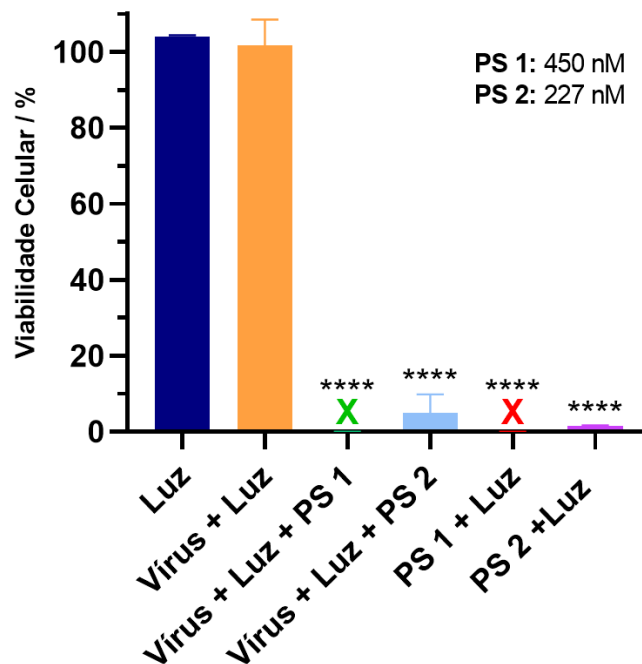


Figura 21. Terapia fotodinâmica em células HEK e vírus em diferentes condições com duas concentrações diferentes de PS e com uma dose de luz de 4 J/cm².

PS 1: 450 nM; PS 2: 227 nM. As marcas * (p < 0.05), ** (p < 0.01) e *** (p < 0.001) representam a diferença estatística.

Tendo em conta as diferenças de viabilidade nos resultados, foi feito um novo estudo para determinar qual era o problema da baixa viabilidade quando os estudos eram transferidos para o CNC. Analisando os dois procedimentos, a diferença verifica-se no tempo que se faz o teste de viabilidade celular com Alamar blue após a irradiação. No CNC o teste de viabilidade é feito 60 h após a irradiação e no nosso laboratório as medidas de viabilidade são feitas 24 h após a irradiação. Na figura 22, podemos verificar que há uma redução significativa da viabilidade celular quando o Alamar blue é feito 60 h após a irradiação.

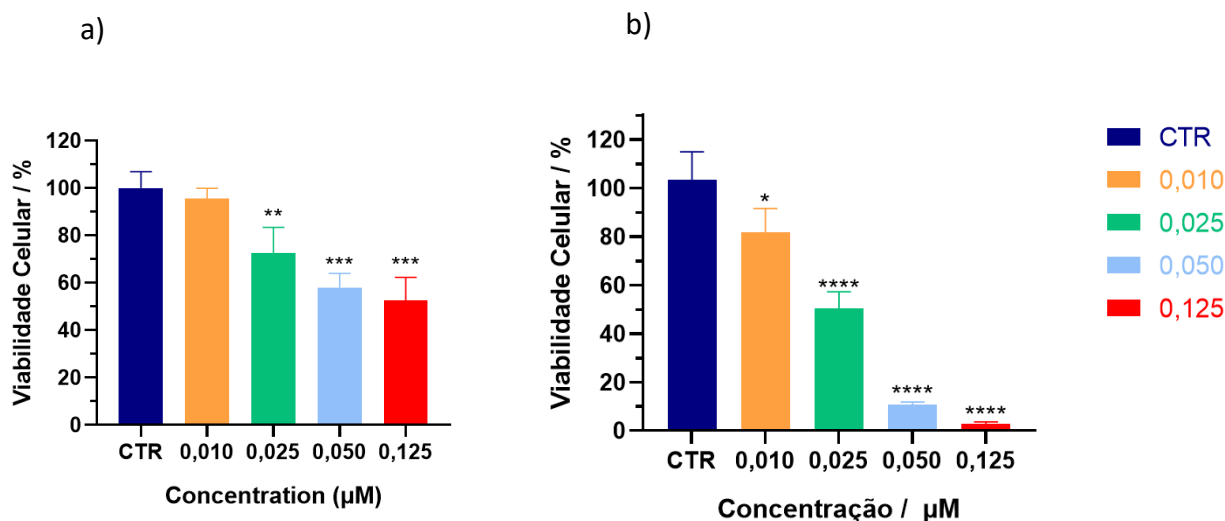


Figura 22. Terapia fotodinâmica com diferentes concentrações de PS, com 12 horas de incubação e 5 J/cm² de irradiação. a) Viabilidade medida com Alamar blue 24 h após irradiação; b) Viabilidade medida com Alamar blue 60 h após irradiação. As marcas * (p < 0.05), ** (p < 0.01) e *** (p < 0.001) representam a diferença estatística.

Os resultados do ensaio de foto-inativação de vírus antes da sua adição a uma cultura de células, realizados pela Dra. Catarina Lobo, são apresentados na Figura 23. Nesta experiência também foi usada a clorina catiónica com duas concentrações, de 227 nM e 450 nM, como fotossensibilizador, e uma dose de luz de 4 J/cm². Na condição de clorina, luz e lentivírus podemos observar que a viabilidade celular é assegurada e com 227 nM de PS a viabilidade é equivalente ao controlo. A Figura 23b apresenta a bioluminescência, que é diretamente proporcional à expressão de lentivírus, dividida pelo número de células viáveis. Com 227 nM houve uma redução de cerca de 50 % em relação ao controlo e com 450 nM não se observa qualquer expressão de vírus. Estes resultados levam em conta a redução da viabilidade celular, pois a intensidade de bioluminescência é dividida por um fator aproximadamente 2x menor para CL1 para dar conta da menor viabilidade celular.

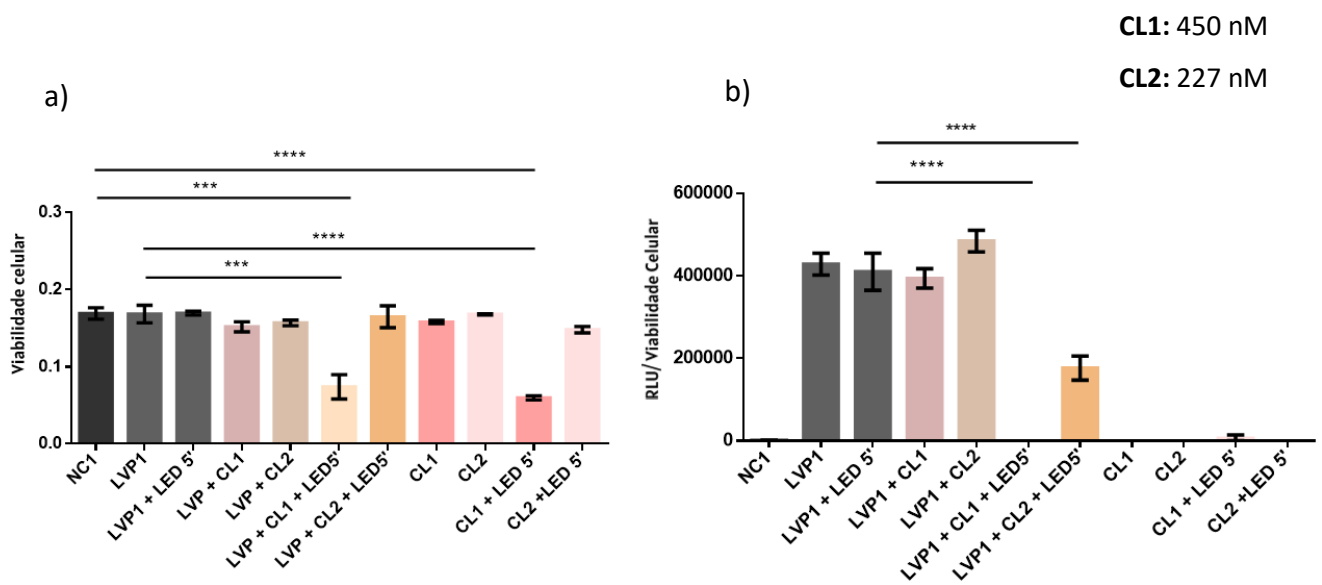


Figura 23. Foto-inativação de vírus com duas concentrações diferentes de PS e com uma dose de luz de 4J/cm², antes da sua adição a uma cultura de células HEK.

CL 1: 450 nM; CL 2: 227 nM. As marcas * (p < 0.05), ** (p < 0.01) e *** (p < 0.001) representam a diferença estatística.

3. Discussão

Na terapia fotodinâmica antimicrobiana pretende-se inativar micro-organismos em condições de baixa toxicidade para células humanas. Para encontrar estas condições, foram primeiramente realizados ensaios de viabilidade celular com e sem iluminação de fotossensibilizador incubado com queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) ou com células embrionárias de rim humano (HEK293) incorporando um antigénio viral (HEK293T). As células HaCaT informam sobre a toxicidade que se pode esperar em aplicações tópicas de fotossensibilizadores. As células HEK293T são particularmente adequadas para produzir grandes quantidades de partículas virais e são muito úteis no estudo de infeções virais.

Não foi encontrada citotoxicidade na ausência de luz, mesmo para uma concentração de fotossensibilizador de 50 μM . Com 24 horas de incubação e 5 J/cm^2 , foi encontrada fototoxicidade para concentrações superiores a 125 nM, mas mesmo a 227 nM e a 450 nM a fototoxicidade é aceitável. Depois de selecionadas as condições de concentração de PS, dose de luz e tempo de incubação em que a viabilidade celular é elevada, passámos para a tentativa de inativação viral.

Nesta parte do trabalho, foram testadas duas tentativas de inativação viral. Primeiramente, quando o vírus ainda não infetou a célula e o fotossensibilizador foi ativado juntamente com o vírus e só depois ambos foram adicionados às células. Numa segunda condição, as células foram incubadas com o vírus e com o PS e só depois foi feita a irradiação das células, já infetadas.

A experiência realizada pela Dra. Catarina Lobo com a clorina catiónica é muito idêntica à experiência realizada com o azul de metileno que se encontra na literatura.¹⁵ Podemos verificar que usando o azul de metileno a 3,2 μM e com uma dose de luz de 25 J, onde o fotossensibilizador foi irradiado com as partículas virais num volume de 250 μL e depois adicionadas às células, verificou-se uma quase ausência de infeção das células. Nestas condições, a viabilidade de células HaCaT é de aproximadamente 60 %. Estes resultados são bastante impressionantes e o objetivo deste trabalho foi verificar se o mesmo se observava com a clorina catiónica.

Usando a clorina catiónica como fotossensibilizador no lugar do azul de metileno, os resultados ilustrados na Figura 21, também demonstram que é possível ocorrer uma inativação viral antes do vírus infectar as células com uma concentração de 227 nM de fotossensibilizador e uma dose de luz de 4 J/cm² onde o fotossensibilizador foi, igualmente, irradiado com as partículas virais num volume total de 250 µL.

Apesar destes dados serem impressionantes, a inativação da carga viral está a ser feita fora da célula. Ou seja, os vírus são inativados antes de terem infectado as células.

Na tentativa de verificar se a desinfecção fotodinâmica também é eficaz quando as moléculas do fotossensibilizador e os vírus estão dentro das células foram realizados estudos em que primeiramente a célula foi incubada com o vírus e com o fotossensibilizador e só depois foi feita a irradiação. O grande desafio é obter seletividade de forma a foto-inativar o vírus sem que a célula infectada sofra danos irreversíveis.

Nesse ensaio, verificou-se que ocorreu uma redução muito significativa da viabilidade celular, o que não era de esperar tendo em conta os ensaios de viabilidade celular feitos anteriormente. Deste modo, foi feito um novo ensaio e verificou-se que a diferença de tempo de realização do ensaio com Alamar blue após a irradiação faz diferença na viabilidade celular. A realização do ensaio 60 h após a irradiação, em comparação com 24 h após a irradiação, levou a uma grande redução da viabilidade celular para concentrações de fotossensibilizador superiores a 25 nM, o que é surpreendente.

O ensaio com Alamar blue é um dos métodos mais correntes para avaliar a citotoxicidade *in vitro* de uma dada espécie ou procedimento. O ensaio utiliza um indicador de oxidação-redução, que na forma oxidada se designa resazurina e na forma reduzida se designa resorufina. A resazurina é azul e não-fluorescente, enquanto a resorufina é vermelha e intensamente fluorescente. Estas características espectroscópicas permitem a deteção por fluorescência da quantidade de resorufina formada usando comprimentos de onda de excitação (540 nm) e emissão (595 nm) adequados. O potencial de oxidação do Alamar blue (380 mV a pH 7 e 25 °C) é maior do que o de qualquer um dos componentes da cadeia transportadora de eletrões numa

célula (FMNH₂, FADH₂, NADH, NADPA e citocromos), pelo que não interfere com as reações de transferência de eletrão e não é tóxico. O Alamar blue permeia as células e as mudanças da sua intensidade de fluorescência no meio intracelular estão relacionadas com o número de células metabolicamente ativas. É interessante salientar que as partículas virais não têm atividade metabólica e dependem da célula hospedeira para se replicarem.⁷³

Seria de esperar que a realização de ensaios de viabilidade celular com Alamar Blue 24 h ou 60 h após aPDT indicassem os mesmos níveis de atividade metabólica relativamente aos respetivos controlos. As células metabolicamente ativas 24 h após o tratamento, deveriam continuar metabolicamente ativas 60 h após o tratamento. Em 60 h é de esperar que o número de células aumente apreciavelmente e não reduza, como foi observado, tendo em conta que as células que sobreviveram ao tratamento duplicam ao fim de 24 horas.

4. Conclusão

A pandemia de Covid-19 levou a que houvesse vários esforços na ciência e na medicina para combater milhares de mortes todos os dias pelo mundo. Apesar da pandemia estar atualmente mais controlada é importante estarmos preparados para outras pandemias virais.

Os vírus são muito abundantes e têm a capacidade de infectar as células eucarióticas ou procarióticas e fazer com que estas produzam milhares de cópias do vírus.

A terapia fotodinâmica é uma terapia promissora para a desinfecção viral. Neste trabalho, foram realizadas duas experiências. Numa das experiências o fotossensibilizador é ativado juntamente com o vírus fora das células e só depois é que este é adicionado a uma cultura de células. Numa segunda experiência, pretendemos estudar se é possível através da terapia fotodinâmica iluminar a carga viral na célula já infectada sem causar toxicidade para esta.

Realizadas as experiências, podemos concluir que realizando a foto-inativação do vírus antes de infectar as células com 227 nm de fotossensibilizador, há uma redução de cerca de 50 % da carga viral sem que a viabilidade celular seja comprometida. A foto-inativação é praticamente total quando a concentração de clorina aumenta para 450 nm.

Já quando a foto-inativação foi feita nas células infectadas com vírus, a viabilidade celular foi muito reduzida, mesmo na condição em que só tinha fotossensibilizador e luz, o que não seria de esperar tendo em conta os estudos de viabilidade celular feitos anteriormente. Comparando as duas experiências e de forma a encontrar o problema, percebemos que a diferença se podia dever ao tempo em que era realizado o ensaio de Alamar blue após a irradiação. O Alamar blue feito 60 h após a irradiação resultou numa viabilidade celular menor, cerca de 20%, quando comparada com o ensaio realizado às 24 h. Este é um resultado inesperado, que revela uma diminuição da divisão celular das células HEK-293 T-hACE2 após PDT.

Tendo em conta os resultados obtidos, é necessário realizar um novo ensaio com infecção viral realizando o ensaio do Alamar blue 24h após a irradiação certificando, anteriormente, que em 24 h é possível infetar as células.

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIBACTERIANA

1. Métodos

1.1 Linhas de Células Humanas

Células HaCaT, linhagens de células de queratinócitos humanos imortalizadas, foram usadas para avaliar a citotoxicidade no escuro e a fototoxicidade do fotossensibilizador usado neste estudo. Ambos os tipos de células foram cultivadas em DMEM (BioTech) com adição de 10% de soro bovino. Para realização dos ensaios, as células foram removidas por tripsinização, lavadas com PBS, e mantido em atmosfera umidificada a 37°C e 5% CO₂.

1.2 Citotoxicidade e Fototoxicidade em Células Humanas.

A toxicidade para linhas de células humanas foi avaliada *in vitro* usando como fotossensibilizador a clorina catiónica para estimar a viabilidade celular após o tratamento adequado. Após a fixação das células, soluções de fotossensibilizador com diferentes concentrações entre 0 e 10 µM foram adicionados às culturas de células e incubados por 30 minutos a 1 hora a 37 °C no escuro. Após lavagem com meio as células foram iluminadas com um LED de 650 nm aplicando uma dose de luz de 5 J/cm². Após 24 horas, foi feita a avaliação da viabilidade celular usando o método de Alamar Blue usando um leitor automático de microplacas (Multiskan Go Thermo), Figura 24.

No caso da avaliação da citotoxicidade as células foram sujeitas às mesmas condições, mas não sofreram irradiação.

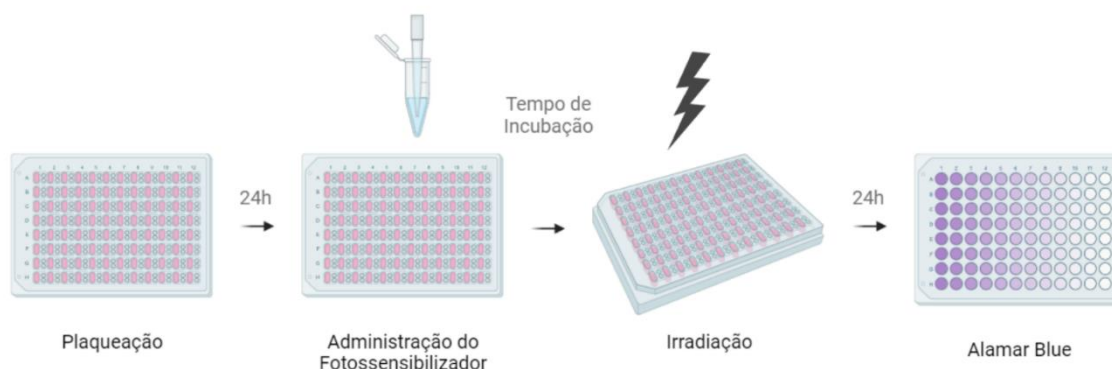


Figura 24. Esquema da metodologia usada para determinação da viabilidade celular após realização da terapia fotodinâmica.

1.3 Bactérias

Os ensaios foram realizados usando o padrão de cepas de bactérias da American Type Culture Collection (ATCC) que é geralmente usado como controle de suscetibilidade a antibióticos. As bactérias utilizadas foram: *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213.

As bactérias foram cultivadas em meio agar Mueller Hinton (MH).

1.4 Fotoativação de Bactérias Planctônicas

As células bacterianas planctônicas foram cultivadas em agar Mueller Hinton (MH) (Sigma-Aldrich) a 37°C durante a noite. A densidade celular foi ajustada para o padrão de McFarland 0,5 em água estéril, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Para a realização da terapia fotodinâmica, suspensões de bactérias em água estéril foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas no escuro por 60 min em temperatura ambiente com várias concentrações de fotossensibilizador. No final do tempo de incubação, as placas foram iluminadas com um LED de 650 nm com uma dose de luz de 4 J/cm².

As células incubadas com fotossensibilizadores no escuro foram cobertas com folha de alumínio pelo mesmo tempo que os grupos de PDT (1 h). De seguida, cada condição foi agitada e algumas diluídas em PBS (do inglês *phosphate buffered saline*). Alíquotas foram retiradas de cada poço, espalhadas com o auxílio de esferas em meio Mueller Hinton sólido em triplicado para determinação de CFU (do inglês *colony-forming unit*) e incubadas a 37°C no escuro. Após 24 horas, as colónias foram contadas. As experiências foram realizadas em triplicado, Figura 25.



Figura 25. Esquema da metodologia usada para determinação dos CFUs após a realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana em bactérias planctônicas.

1.5 Crescimento do Biofilme

Para o crescimento do biofilme, foram usadas culturas de *S. aureus* e *E. Coli* com uma densidade celular de $1,5 \times 10^8$ CFU/mL em BHI (do inglês *Brain Heart Infusion*) e estas foram cultivadas em placas de 96 poços e ficaram a crescer por 16-24 horas. Após o biofilme estar formado, o meio foi removido de cada poço e os biofilmes foram lavadas com água estéril.

1.6 Inativação Fotodinâmica de Biofilmes

Depois das placas estarem preparadas com os biofilmes, estes foram incubados com várias concentrações de fotossensibilizador, 0 – 50 μm , por 1-6 horas no escuro em temperatura ambiente. Os poços de controle foram incubados com PBS. De seguida, a placa foi iluminada com um LED de 650 nm com uma dose de luz de 5 J/cm^2 .

Após a irradiação, os biofilmes foram sonicados e o poço foi homogenizado. Posteriormente, os poços foram diluídos em água estéril e espalhadas com o auxílio de esferas em meio Mueller Hinton sólido de modo a contar as colónias formadas. Após 24 horas, as colónias foram contadas, e os CFU foram determinados, Figura 26.

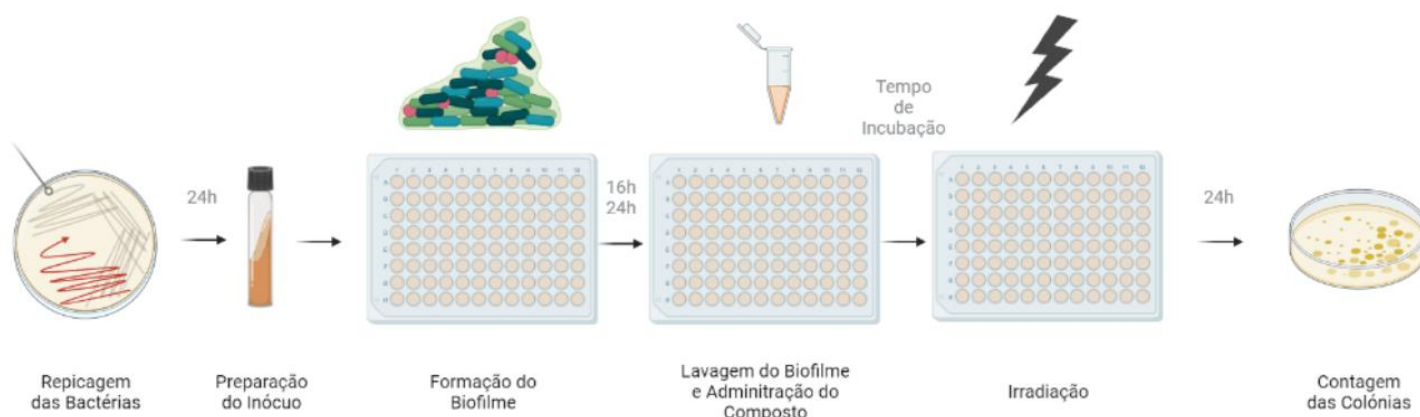


Figura 26. Esquema da metodologia usada para determinação dos CFUs após a realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana em biofilmes.

1.7 Concentração Mínima Inibitória

De forma a visualizar a concentração de fotossensibilizador e o tempo de incubação necessário para inativar as bactérias na forma planctónica e na forma de biofilmes, foi realizado um ensaio qualitativo em que após estas terem sido sujeitas à terapia fotodinâmica, as células bacterianas foram espalhadas em meio agar sólido com o auxílio de uma ança.

As bactérias espalhadas no meio não foram sujeitas a nenhuma diluição.

1.8 Análise estatística

Os valores medidos nas diferentes experiências são apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 8. A informação foi analisada com o teste One-way ANOVA. Cada condição tem um mínimo de três ensaios biológicos ($n=3$), sendo que cada um dos ensaios corresponde à média do triplicado.

2. Resultados

Inicialmente, foram realizados ensaios de viabilidade celular. Na Figura 27, células HaCaT foram incubadas com 1 μM , 2,5 μM , 5 μM e 10 μM por um período de incubação de 1 hora. Após o período de incubação as células foram lavadas e irradiadas com uma dose de luz de 5 J/cm^2 . Podemos verificar que com 1 μM temos cerca de 80 % de viabilidade celular e que para concentrações mais elevadas a viabilidade é inferior a 50 %.

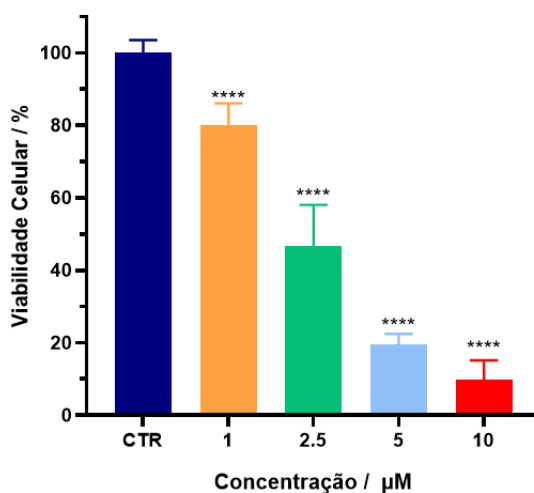


Figura 27. Terapia fotodinâmica em células HaCaT usando diferentes concentrações de clorina catiónica, com 1 hora de incubação e uma dose de luz de 5 J/cm^2 . As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.

Na tentativa de aumentar a percentagem de viabilidade celular, o período de incubação foi reduzido para 30 minutos. Como podemos verificar pela Figura 28, os resultados são equivalentes aos resultados obtidos com 1 hora de incubação, Figura 27.

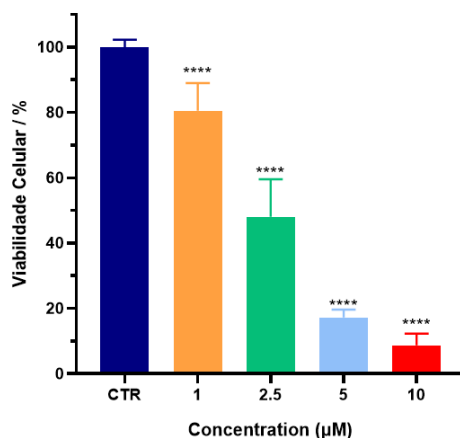


Figura 28. Terapia fotodinâmica em células HaCaT usando diferentes concentrações de clorina catiónica, com 30 minutos de incubação e uma dose de luz de 5 J/cm². As marcas * (p < 0.05), ** (p < 0.01) e *** (p < 0.001) representam a diferença estatística.

Para além dos estudos de viabilidade celular realizados acima com diferentes tempos de incubação do composto, foi realizado um novo ensaio em que as células incubadas com o composto foram irradiadas sem serem lavadas antes da irradiação. De acordo com os resultados obtidos na Figura 29, podemos verificar que a lavagem é um fator determinante na viabilidade celular.

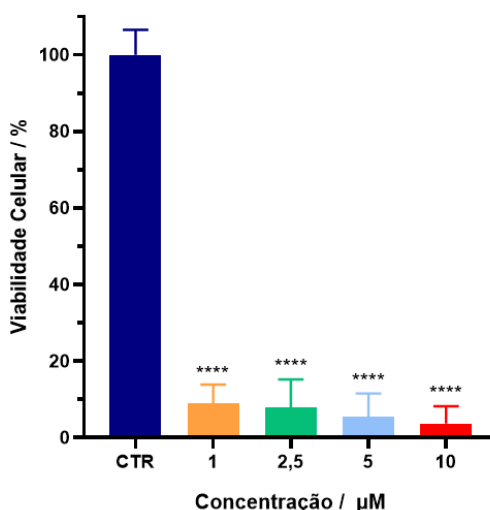


Figura 29. Terapia fotodinâmica em células HaCaT usando diferentes concentrações de fotossensibilizador, com 30 minutos de incubação e uma dose de luz de 5 J/cm². A irradiação é

feita sem ocorrer lavagem das células. As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.

Passando para os estudos antibacterianos, primeiramente foi estudada a atividade antibacteriana do fotossensibilizador no escuro. Como podemos verificar na Figura 30 e na Figura 31, o composto não tem atividade no escuro com 1 μM e 10 μM tanto usando água estéril como meio Mueller Hinton (MH) na preparação da solução de fotossensibilizador.

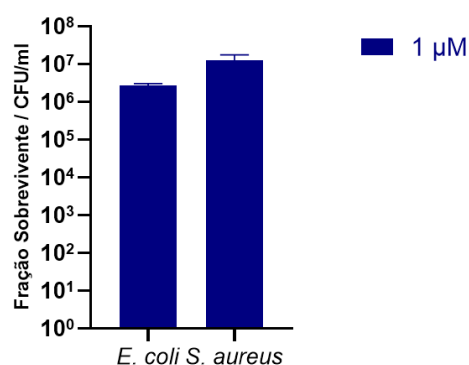


Figura 30. Estudo da toxicidade da clorina catiónica no escuro com 1 μM e 1 hora de incubação. A cultura das células bacterianas foi feita em **água estéril**.

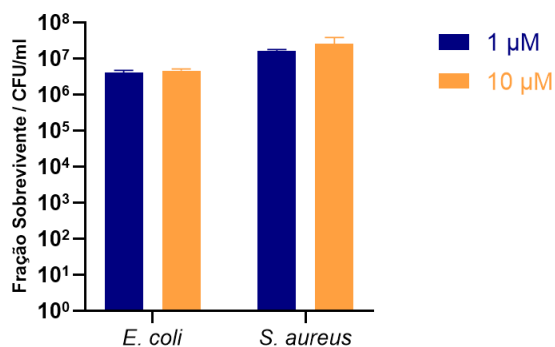


Figura 31. Estudo da toxicidade da clorina catiónica no escuro com 1 μM e 1 hora de incubação. A cultura das células bacterianas foi feita em **meio Mueller Hinton (MH)**.

A terapia fotodinâmica antibacteriana, foi realizada em duas condições que diferem no meio onde as bactérias se encontram quando é feita a irradiação. Na Figura 32, o fotossensibilizador foi preparado em água estéril e, deste modo, as células bacterianas

foram incubadas em água estéril com o composto e a irradiação foi feita neste meio. Já na Figura 33, o fotossensibilizador foi preparado em meio MH líquido e as células foram incubadas em meio e a irradiação foi feita em meio.

Comparando estas duas condições podemos concluir que o meio em que é feita a irradiação faz com que haja uma diferença significativa na redução dos CFU, tanto na bactéria *E. coli* como na bactéria *S. aureus*.

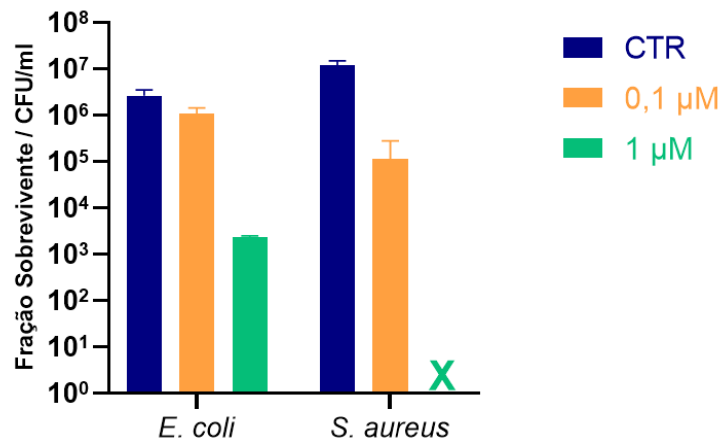


Figura 32. Terapia fotodinâmica nas bactérias planctônicas *E.coli* e *S.aureus* com duas concentrações diferentes PSs, usando uma dose de luz de 5 J/cm² e um tempo de incubação de 1 hora. A cultura das células bacterianas foi feita **em água estéril**.

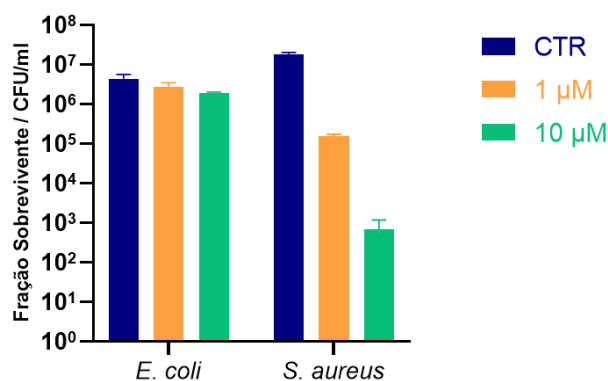


Figura 33. Terapia fotodinâmica nas bactérias planctônicas *E. coli* e *S.aureus* com duas concentrações diferentes de clorina, usando uma dose de luz de 5J/cm² e um tempo de incubação de 1 hora. A cultura das células bacterianas foi feita em **meio Mueller Hinton**.

Face aos resultados acima obtidos foi realizado um novo ensaio em que o fotossensibilizador foi preparado em água estéril para uma futura irradiação em água. Neste ensaio foram usadas uma gama de concentrações de 0,1 μM , 0,2 μM , 0,3 μM , 0,4 μM , 0,5 μM e 1 μM . As células bacterianas *S. aureus*, Figura 34, e *E. coli*, Figura 35, na forma planctónica foram sujeitas a um período de incubação de 1 hora e seguida de uma irradiação de 5 J/cm^2 com uma LED de 650 nm. De acordo com a Figura 34, podemos observar que com 0,5 μM e 1 μM temos uma redução de CFU superior a 7 ordens de grandeza e com apenas 0,2 μM já temos uma redução de 3 log de CFU.

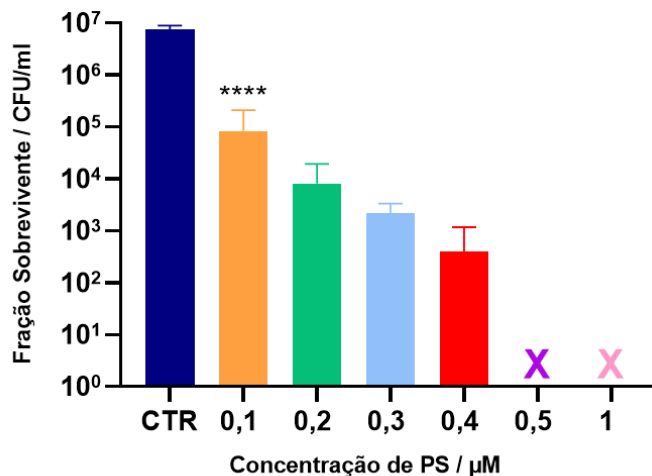


Figura 34. Terapia fotodinâmica na bactéria planctónica *S. aureus* com diferentes concentrações de PS, usando uma dose de luz de 5 J/cm^2 e um tempo de incubação de 1 hora. A cultura das células bacterianas foi feita **em água estéril**. As marcas * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.001$) representam a diferença estatística.

Na Figura 35, com a bactéria *E. coli* na forma planctónica verificamos uma redução de CFU superior a 7 ordens de grandeza com 1 μM . Com 0,3 μM temos uma redução de 3 log de CFU.

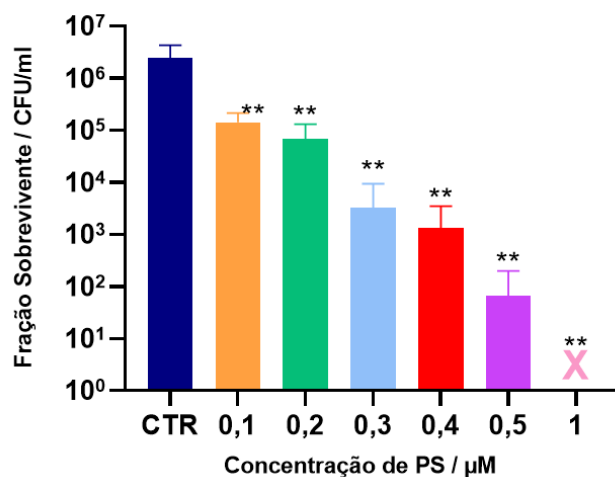


Figura 35. Terapia fotodinâmica na bactéria planctónica *E. coli* com diferentes concentrações de PS, usando uma dose de luz de 5 J/cm^2 e um tempo de incubação de 1 hora.

A cultura das células bacterianas foi feita **em água estéril**.

Na Figura 36 e na Figura 37 temos representado a concentração mínima inibitória para a bactéria *S. aureus* e *E. coli*, respetivamente. Estes dados são concordantes com os dados quantitativos anteriores, onde na bactéria *S. aureus* não temos qualquer colónia nas condições de $0,5\ \mu\text{M}$ e de $1\ \mu\text{M}$, e na bactéria *E. coli* não temos qualquer colónia com $1\ \mu\text{M}$ de fotossensibilizador. Podemos verificar, também, que em ambas as condições há uma redução do número de colónias com o aumento da concentração de fotossensibilizador.

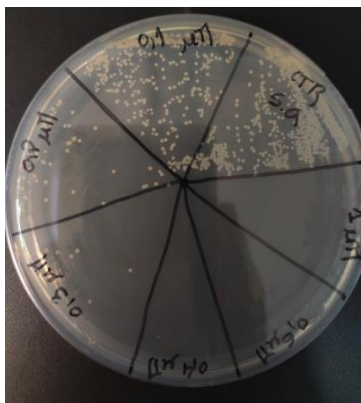


Figura 36. Concentração mínima inibitória de PS para terapia fotodinâmica eficaz em bactérias *S. aureus* na forma planctónica, usando uma dose de luz de $5\ \text{J/cm}^2$ e 1 hora de incubação.

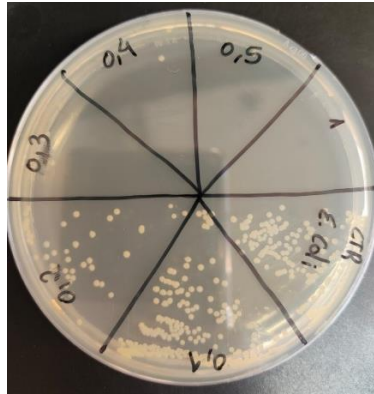


Figura 37. Concentração mínima inibitória de PS para terapia fotodinâmica eficaz em bactérias *E. coli* na forma planctônica. Com uma dose de luz de 5 J/cm^2 e 1 hora de incubação.

Passando para os resultados em biofilmes. Na Figura 38, temos os resultados de terapia fotodinâmica com o biofilme formado a partir da bactéria planctônica *S. aureus*. De acordo com os dados obtidos, verificamos que ocorreu uma redução de cerca de apenas 2 logs de CFU com $10 \mu\text{M}$. Na Figura 39, os biofilmes foram formados a partir da bactéria planctônica *E. coli* e verificamos que não ocorreu uma inativação considerável do biofilme. Para além disso, os valores de CFUs no controlo são muito elevados.

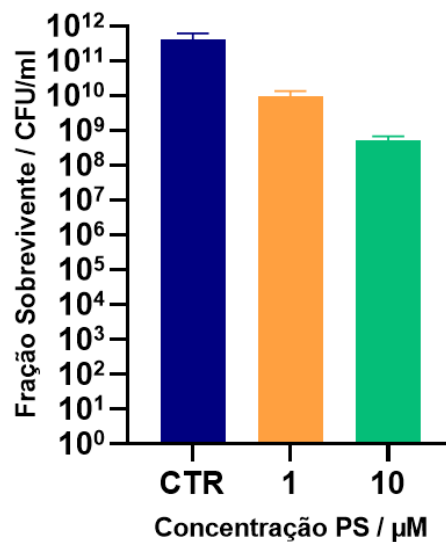


Figura 38. Biofilme formado a partir de bactérias *S. aureus* sujeito a terapia fotodinâmica com uma irradiação de 5 J/cm^2 e um tempo de incubação de 1 hora com duas concentrações de PS.

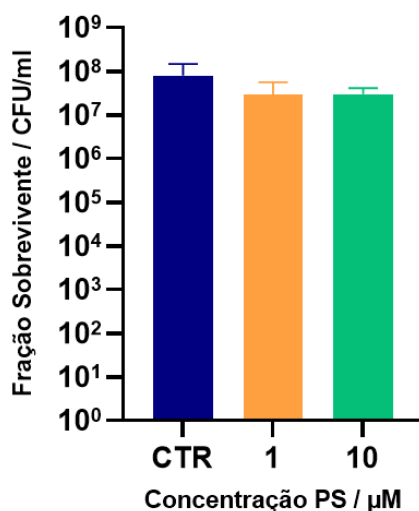


Figura 39. Biofilme formado a partir de bactérias *E. coli* sujeito a terapia fotodinâmica com uma irradiação de 5 J/cm^2 e um tempo de incubação de 1 hora com duas concentrações de clorina.

Tendo em conta o elevado número de unidade formadoras de colónias devendo-se sobretudo ao crescimento elevado dos biofilmes, foi feito um novo ensaio onde os biofilmes cresceram por um período de 16 horas em vez de 24 horas de crescimento.

Com a redução deste tempo de crescimento podemos verificar através da Figura 40 e 41 que houve redução de cerca de 1 log na condição de controlo relativamente aos dados obtidos anteriormente com 24 horas de crescimento.

Para além disso, foi adicionada uma concentração mais elevada de fotossensibilizador na tentativa de verificar uma redução dos CFU/ml. Com $50 \mu\text{M}$ já é possível ocorrer uma redução de pelo menos 3 log de CFU/ml. As restantes condições foram relativamente equivalentes aos dados obtidos anteriormente sugerindo que a redução do tempo de crescimento do biofilme não fez com que fosse mais suscetível a destruição deste através da terapia fotodinâmica.

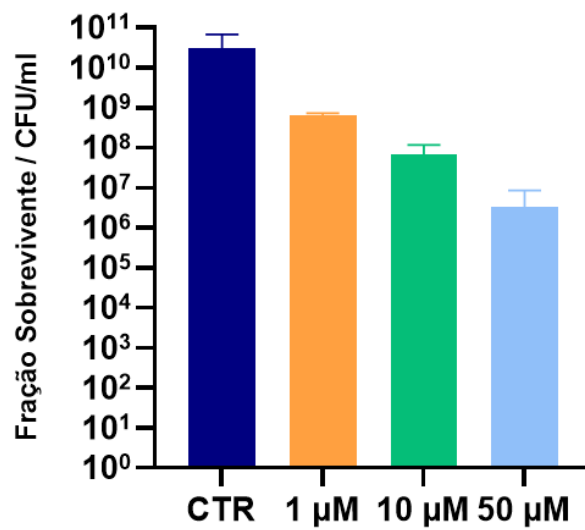


Figura 40. Biofilme formado a partir de bactérias *S. aureus* sujeito a terapia fotodinâmica com uma irradiação de 5 J/cm² e um tempo de incubação de 1 hora com duas concentrações de PS.

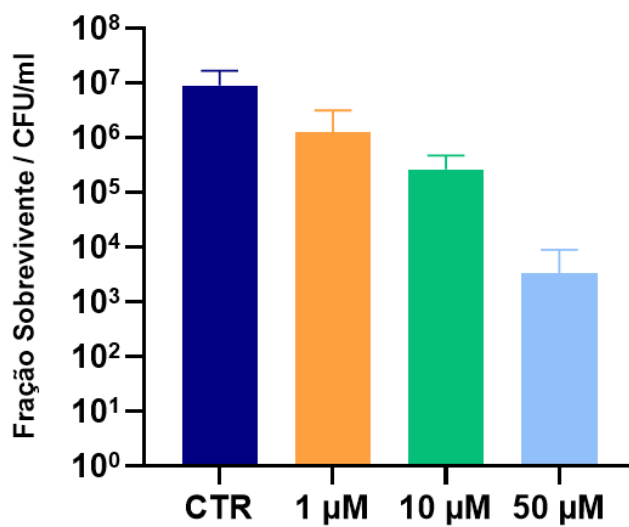


Figura 41. Biofilme formado a partir de bactérias *E. coli* sujeito a terapia fotodinâmica com uma irradiação de 5 J/cm² e um tempo de incubação de 1 hora com duas concentrações de clorina.

Por fim, foi realizado um último estudo com o objetivo de estudar se o tempo de incubação do fotossensibilizador contribuía para uma melhor penetração e destruição do biofilme formado a partir de bactérias *S. aureus* aquando da irradiação.

Na Figura 42, observou-se que houve um efeito maior na redução de CFU/ml quando o tempo de incubação da clorina é de 6 horas ocorrendo uma redução de 3 log. Já os resultados obtidos com 1 hora e 2 horas de período de incubação são relativamente idênticos, não se observando diferença logarítmica. Também é possível observar estes dados de uma forma qualitativa através da Figura 43.

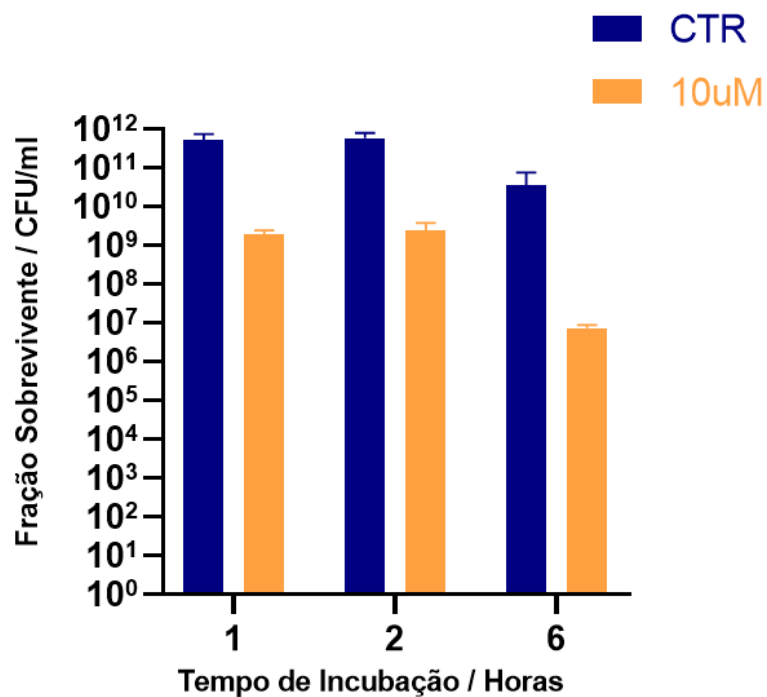


Figura 42. Biofilme formado a partir de bactérias *S. aureus* sujeito a terapia fotodinâmica com uma concentração de clorina de 10 μ M, uma dose de luz de 5 J/cm² com diferentes tempos de incubação.



Figura 43. Avaliação qualitativa da terapia fotodinâmica em biofilmes formados a partir de bactérias *S. aureus* com diferentes tempos de incubação e 10 µM de fotossensibilizador e uma dose de luz 5 J/cm².

3. Discussão

Tendo em conta que a resistência antimicrobiana se pode tornar uma das maiores ameaças para a saúde, afetando a nossa capacidade de curar determinadas infeções e que o número de espécies bacterianas resistentes é cada vez maior, é muito importante encontrar novas abordagens terapêuticas.⁶

O nosso contributo neste trabalho, foi investigar as condições em que um novo fotossensibilizador, que é uma clorina catiónica, é mais eficaz em terapia fotodinâmica antimicrobiana.

Primeiramente, é importante definir o porquê do uso deste fotossensibilizador na realização dos ensaios. As membranas das bactérias gram-negativas são compostas por polissacarídeos carregados negativamente o que dificulta a permeação da membrana.⁶² Deste modo, foi usado um fotossensibilizador que é uma clorina catiónica tornando-o um possível candidato para inativar bactérias gram-negativas eficientemente. Para além disso, é importante que este fotossensibilizador seja também capaz de penetrar as bactérias gram-positivas e de as inativar. Um PS ideal para a terapia fotodinâmica antimicrobiana deve ser de amplo espetro.⁶⁷

Apesar de podermos estar perante um fotossensibilizador capaz de foto-inativar microrganismos, é importante haver certa seletividade para estas espécies. Ou seja, não ser tóxico para as células hospedeiras. Assim, neste trabalho, foi feito um primeiro estudo de viabilidade celular de forma a determinar até que valores de concentração, tempo de incubação e doses de luz poderíamos alcançar sem provocar danos colaterais para as células saudáveis. O facto do fotossensibilizador ser catiónico também permite que haja uma absorção mais rápida pelas células bacterianas quando comparado com as células hospedeiras.⁶³

De acordo com o primeiro estudo de viabilidade celular, usando células HaCaT, podemos garantir que concentrações de clorina até 1 μM , dose de luz de 5 J/cm^2 e tempos de incubação de 1 hora, efetuando lavagens das células antes da irradiação, a

viabilidade celular após a aPDT é superior a 80 %. Estes dados foram tidos em conta quando passamos para a avaliação da foto-inativação das bactérias.

Na foto-inativação bacteriana, foram realizados estudos em bactérias na forma planctónica e foram usadas duas classes de bactérias. Bactérias Gram-negativas *E.Coli* e bactérias Gram-positiva *S. aureus* devido às suas diferenças estruturais.

Os resultados obtidos mostram que com apenas 0,3 μM de fotossensibilizador incubado por 1 hora e com apenas 5 J/cm^2 já é possível obter uma redução de 3 log de CFU/ml nas bactéria *S. aureus*, enquanto que com as *E.coli* são precisos 0,4 μM de fotossensibilizador para se verifica esta redução, Figura 30.

Estes resultados mostraram ser promissores e decidiu-se avançar com os estudos de biofilmes. Os biofilmes têm sido um dos problemas mais significativos enfrentados pela saúde pública e estimando-se serem responsáveis por cerca de 80% de todas as infeções, causando muitas mortes.²⁷ As bactérias na forma de biofilmes são 10 a 1000 vezes mais difíceis de destruir do que as bactérias planctónicas e foi possível verificar isso através dos estudos feitos nesta dissertação.⁷⁴

Quando passamos para os biofilmes, inicialmente o tempo de incubação foi mantido e foram usadas duas doses de composto, 1 μM e 10 μM . Realizadas as experiências, verificou-se que para biofilmes de *E. coli* não ocorria uma redução de pelo menos 3 log de CFU/ml na inativação dos biofilmes. Estes resultados demonstram a dificuldade do fotossensibilizador penetrar na matriz de biofilme formado por uma bactéria Gram-negativa e de o destruir.

Numa segunda tentativa, foi aumentada a concentração de fotossensibilizador para 50 μM e mantida a dose de luz de 5 J/cm^2 , tendo sido observada uma redução de mais de 3 log de CFU/ml para biofilmes de *S. aureus* e *E. coli*. Contudo, sabemos que nesta concentração e nas condições em que a terapia fotodinâmica é realizada, haverá danos nas células hospedeiras expostas a esta dose de luz.

Por fim, com 10 μM de PS foi realizado um estudo para verificar se o tempo de incubação tinha influência e verificamos que ao aumentar o tempo de incubação do fotossensibilizador em contacto com o biofilme antes da irradiação, a inativação era

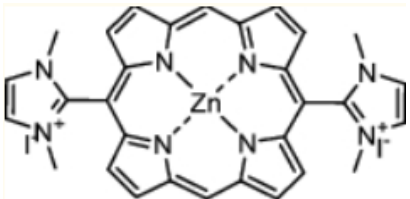
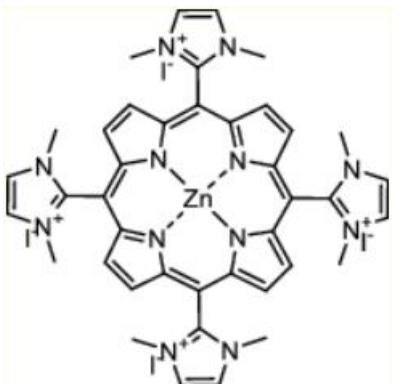
maior. Isto sugere que dando mais tempo ao fotossensibilizador para penetrar o biofilme, podem-se reduzir as doses necessárias para inativar o biofilme.

A matriz densa que compõe os biofilmes bacterianos é responsável por dificultar a difusão dos antimicrobianos em direção ao seu interior. Para além disso, a natureza aniónica dos componentes da membrana bacteriana, no caso da bactéria Gram-negativa, também deve ser levada em consideração. Apesar do fotossensibilizador usado ser catiónico e ter interações eletrostáticas favoráveis com as bactérias, é possível que este seja aprisionado na periferia do biofilme.

Dados obtidos da literatura, mostram que o PS1 e PS2 da Tabela 1, que são porfirinas catiónicas, deram resultados impressionantes contra bactérias planctónicas Gram-positivas, Gram-negativas e contra biofilmes de bactérias Gram-positivas. Os resultados obtidos para bactérias planctónicas com a clorina catiónica são comparáveis com os reportados para a correspondente porfirina. No entanto, os PS1 e PS2 deram uma redução de 6 logs de CFU/ml de bactérias em biofilme com 5,2 nM e 5 J/cm² de dose de luz com 1 µM e 12 J/cm², respetivamente. Estes dados são surpreendentes pois não se observou a esperada redução da eficácia em biofilmes. A diferença relativamente aos resultados obtidos neste trabalho e a outros reportados na literatura pode dever-se à maturidade dos biofilmes. Neste estudo, os biofilmes cresceram por 24h e posteriormente por 16h e o número mínimo de CFUs atingidos em relação ao crescimento do biofilme foi de 10¹¹, e enquanto no estudo que se encontra na literatura, o número de unidade formadores de colónias é de 10⁷. Esta diferença de densidade bacteriana inicial pode refletir a maturidade dos biofilmes e a sua permeabilidade.

Embora a clorina catiónica excitada a 650 nm não se tenha mostrado superior à correspondente porfirina catiónica excitada a 420 nm, a excitação a comprimentos de ondas mais elevados pode vir a trazer benefícios em estudos *in vivo* porque permite uma penetração da luz nos tecidos mais profunda.

Tabela 1. Estrutura/propriedades químicas do fotossensibilizador e ensaios *in vitro* para inativação de biofilmes.

Estrutura	Biofilme	Resultados
	<i>S. aureus</i> ATCC 25925	Redução de 7 log ₁₀ de CFU [PS]= 5,2 nM Dose de luz = 5 J/cm ² (Biotable λ = 400-650 nm)
	<i>S. aureus</i> ATCC 25925	Redução de 6 log ₁₀ de CFU [PS]= 1 μM Dose de luz = 12 J/cm ² (Biotable λ = 400-650 nm)

Em estudos anteriores, também podemos verificar que a inativação de biofilmes as doses de luz usadas são mais elevadas, na ordem dos 180 J/cm² com concentração de PS de 20 μM em biofilmes formados a partir da bactéria *S. aureus* usando o fotossensibilizador 5,10,15,20-tetrakis [4 - (3-N,N - dimetilamoniopropoxi)fenil] (TAPP) que é uma porfirina levou a uma redução de 3 log de CFU/ml.⁷⁵

Comparando os dados relados anteriormente, da literatura, com os dados obtidos neste estudo usando a clorina catiónica como fotossensibilizador, é necessário no caso dos estudos em biofilmes um novo ensaio com doses de luz mais elevadas, maiores tempos de incubação de modo a aumentar a inativação bacteriana. Tendo em conta, que é necessário a realização de novos ensaios de viabilidade de forma a verificar se doses mais elevadas de luz ou maiores tempos de incubação não serão tóxicos para as células hospedeiras.

4. Conclusão

A descoberta dos antibióticos foi, sem dúvida, um grande avanço na ciência e salvaram milhões de vidas. Contudo, o uso excessivo e o mau uso destes fez com que houvesse um aumento das espécies multirresistentes. Podemos retornar à época em que infecções comuns e ferimentos leves podem matar, causando consequências desastrosas ao longo da vida e ao longo das gerações.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é apresentada neste trabalho como uma possível alternativa ao uso convencional dos antibióticos. A aPDT apresenta vantagens em relação às terapias antibióticas, uma vez que tem a possibilidade de eliminar microrganismos independentemente do seu padrão de resistência. No caso dos biofilmes, que são mais difíceis de destruir do que bactérias na forma planctônica, a terapia fotodinâmica sugere ser uma boa abordagem, pois acredita-se ser capaz de iluminar os agentes produtores de biofilme, agindo simultaneamente em múltiplos alvos locais e variáveis.

Os resultados obtidos mostram que com apenas 0,3 μM de fotossensibilizador incubado por 1 hora e com apenas 5 J/cm^2 já é possível obter uma redução de 3 log de CFU/ml nas bactéria *S. aureus*, enquanto que com as *E. coli* são precisos 0,4 μM de fotossensibilizador para se verifica esta redução.

Nos biofilmes, observou-se uma redução de pelo menos 3 log de CFU/ml com uma concentração de 50 μM de fotossensibilizador com 1 h de incubação e 4 J/cm^2 porém, com esta concentração a viabilidade celular para as células hospedeiras não é assegurada. Numa outra experiência, foi aumentado o tempo de incubação para 6 horas, com 1 μM e 4 J/cm^2 e obteve-se uma redução de cerca de 3 log de CFU/ml. Estes resultados mostram a dificuldade de foto-inativar biofilmes em comparação às células bacterianas na forma planctônica.

Futuramente, deverão ser feitos novos ensaio com maiores doses de luz, e diferentes tempos de incubação para obter uma maior foto-inativação verificando primeiramente se a viabilidade celular é assegurada.

Capítulo 4

CONCLUSÃO FINAL

As infecções por microrganismos multirresistentes (MDR) são um dos grandes desafios para os sistemas de saúde e para as empresas farmacêuticas e prevê-se que este problema aumente, consideravelmente, aos longo das próximas décadas. Estas infecções podem ser causadas por diferentes tipos de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos ou parasitas.

Neste trabalho, foi testada uma nova clorina catiónica para terapia fotodinâmica antimicrobiana, nomeadamente na foto-inativação de vírus e de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas na forma planctónica e na forma de biofilmes.

Na foto-inativação viral, foram estudadas duas intervenções possíveis. (i) a foto-inativação do vírus quando este ainda não infetou a célula, (ii) a foto-inativação do vírus na célula já infetada. Realizadas as experiências, podemos concluir que a foto-inativação do lentivírus com 227 nM de fotossensibilizador antes de infetar as células resulta numa redução de cerca de 50 % da carga viral sem que a viabilidade celular seja comprometida.

Já quando a foto-inativação foi feita nas células infetadas com vírus, a viabilidade celular foi muito reduzida, mesmo na condição em que só tínhamos fotossensibilizador e luz, o que não seria de esperar tendo em conta os estudos de viabilidade celular feitos anteriormente. Comparando as duas experiências e de forma a encontrar o problema, percebemos que a diferença se podia dever ao tempo em que foi realizado o ensaio de Alamar blue após a irradiação. Tipicamente, em PDT os ensaios de viabilidade celular com Alamar blue são feitos 24 h após a iluminação, mas nos ensaios com vírus esse tempo foi aumentado para 60 h, de forma a serem feitos depois do ensaio coma luciferase. A viabilidade celular às 60 h é cerca de 20 % da viabilidade obtida com o ensaio realizado às 24 h.

Na foto-inativação bacteriana, os resultados obtidos mostram que com apenas 0,3 μM de fotossensibilizador incubado por 1 hora e com apenas 5 J/cm^2 já é possível obter uma redução de 3 log de CFU/ml nas bactérias *S. aureus*, enquanto que com as *E. coli* são precisos 0,4 μM de fotossensibilizador para se verificar esta redução.

Nos biofilmes, observou-se uma redução de pelo menos 3 log de CFU/ml com uma concentração de 50 μM de fotossensibilizador com 1 h de incubação e 4 J/cm^2 . Porém, com esta concentração a viabilidade celular para as células hospedeiras não é assegurada. Numa outra experiência, foi aumentado o tempo de incubação para 6 horas, com 1 μM e 4 J/cm^2 e obteve-se uma redução de cerca de 3 log de CFU/ml. Estes resultados mostram a dificuldade de foto-inativar biofilmes em comparação às células bacterianas na forma planctónica.

De uma forma geral, a clorina catiónica é um bom fotossensibilizador tanto para a foto-inativação de vírus como de bactérias na forma planctónicas e em biofilmes. Contudo é necessário ajustar os procedimentos da inativação do vírus quando este já se encontra dentro da célula e dos biofilmes, de forma a melhorar os resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

- (1) Aroso, R. T.; Schaberle, F. A.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M. Photodynamic Disinfection and Its Role in Controlling Infectious Diseases. *Photochem Photobiol Sci* **2021**, *20* (11), 1497–1545. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00102-1>.
- (2) Morrison, L.; Zembower, T. R. Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* **2020**, *30* (4), 619–635. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>.
- (3) Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **2010**, *74* (3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.
- (4) Medina, E.; Pieper, D. H. Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **2016**, *398*, 3–33. https://doi.org/10.1007/82_2016_492.
- (5) World Health Organization. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*; World Health Organization, 2014.
- (6) WHO report on surveillance of antibiotic consumption. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-report-on-surveillance-of-antibiotic-consumption> (accessed 2022-05-09).
- (7) Ligon, B. L. Penicillin: Its Discovery and Early Development. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* **2004**, *15* (1), 52–57. <https://doi.org/10.1053/j.spid.2004.02.001>.
- (8) Carlet, J.; Collignon, P.; Goldmann, D.; Goossens, H.; Gyssens, I. C.; Harbarth, S.; Jarlier, V.; Levy, S. B.; N'Doye, B.; Pittet, D.; Richtmann, R.; Seto, W. H.; Meer, J. W. van der; Voss, A. Society's Failure to Protect a Precious Resource: Antibiotics. *The Lancet* **2011**, *378* (9788), 369–371. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60401-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60401-7).
- (9) Klein, E. Y.; Van Boeckel, T. P.; Martinez, E. M.; Pant, S.; Gandra, S.; Levin, S. A.; Goossens, H.; Laxminarayan, R. Global Increase and Geographic Convergence in Antibiotic Consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, *115* (15), E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>.
- (10) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); Authority (EFSA), E. F. S.; Agency (EMA), E. M. ECDC/EFSA/EMA Second Joint Report on the Integrated Analysis of the Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Humans and Food-Producing Animals. *EFSA Journal* **2017**, *15* (7), e04872. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4872>.
- (11) *Antimicrobials in agriculture and the environment : reducing unnecessary use and waste / the Review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O'Neill*. Wellcome Collection. <https://wellcomecollection.org/works/x88ast2u> (accessed 2022-08-01).
- (12) Pérez-Laguna, V.; Gilaberte, Y.; Millán-Lou, M. I.; Agut, M.; Nonell, S.; Rezusta, A.; Hamblin, M. R. Combination of Photodynamic Therapy and Antimicrobial Compounds to Treat Skin and Mucosal Infections: A Systematic Review. *Photochem Photobiol Sci* **2019**, *18* (5), 1020–1029. <https://doi.org/10.1039/c8pp00534f>.

- (13) Institute, T. D. *WHO global priority pathogens list of antibiotic-resistant bacteria*. <https://www.doherty.edu.au/news-events/news/who-global-priority-pathogens-list-of-antibiotic-resistant-bacteria/> (accessed 2022-08-01).
- (14) Irwin, K. K.; Renzette, N.; Kowalik, T. F.; Jensen, J. D. Antiviral Drug Resistance as an Adaptive Process. *Virus Evol* **2016**, *2* (1), vew014. <https://doi.org/10.1093/ve/vew014>.
- (15) Lobo, C. S.; Rodrigues-Santos, P.; Pereira, D.; Núñez, J.; Trêpa, J. C. D.; Sousa, D. L.; Lourenço, J. V.; Coelho, M. F.; de Almeida, L. P.; da Cunha, J. S.; Arnaut, L. G. Photodynamic Disinfection of SARS-CoV-2 Clinical Samples Using a Methylene Blue Formulation. *Photochem Photobiol Sci* **2022**, *21* (6), 1101–1109. <https://doi.org/10.1007/s43630-022-00202-6>.
- (16) *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. <https://covid19.who.int> (accessed 2022-08-03).
- (17) *Portugal: WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data*. <https://covid19.who.int> (accessed 2022-08-03).
- (18) Hayami, M.; Okabe, A.; Kariyama, R.; Abe, M.; Kanemasa, Y. Lipid Composition of Staphylococcus Aureus and Its Derived L-Forms. *Microbiol Immunol* **1979**, *23* (6), 435–442. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1979.tb00483.x>.
- (19) 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 Surg Med* **2006**, *38* (5), 468–481. <https://doi.org/10.1002/lsm.20361>.
- (20) Sperandio, F. F.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-Negative Bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **2013**, *8* (2), 108–120. doi: 10.2174/1574891x113089990012
- (21) Delcour, A. H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1794* (5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>.
- (22) *Madigan, Brock Biology of Microorganisms, Global Edition, 15/E*. https://www.pearson.com/nl/en_NL/higher-education/subject-catalogue/biology/Brock-Biology-of-Microorganisms-Madigan.html (accessed 2022-08-02).
- (23) *Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges - PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33147701/> (accessed 2022-08-02). doi: 10.3390/microorganisms8111716
- (24) Cieplik, F.; Deng, D.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T. Antimicrobial Photodynamic Therapy – What We Know and What We Don't. *Critical Reviews in Microbiology* **2018**, *44* (5), 571–589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.
- (25) Del Pozo, J. L. Biofilm-Related Disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2018**, *16* (1), 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>.

- (26) Martins Antunes de Melo, W. de C.; Celiešiūtė-Germanienė, R.; Šimonis, P.; Stirkė, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) for Biofilm Treatments. Possible Synergy between APDT and Pulsed Electric Fields. *Virulence* **2021**, *12* (1), 2247–2272. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1960105>.
- (27) López, D.; Vlamakis, H.; Kolter, R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2* (7), a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>.
- (28) Taraszkievicz, A.; Fila, G.; Grinholc, M.; Nakonieczna, J. Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance. *BioMed Research International* **2012**, *2013*, e150653. <https://doi.org/10.1155/2013/150653>.
- (29) Flemming, H.-C.; Wingender, J. The Biofilm Matrix. *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8* (9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- (30) Kashef, N.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R. Advances in Antimicrobial Photodynamic Inactivation at the Nanoscale. *Nanophotonics* **2017**, *6* (5), 853–879. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>.
- (31) Mah, T.F. and O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *Trends in Microbiology*, *9*, 34-39. - References - Scientific Research Publishing. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
- (32) Ciofu, O.; Rojo-Molinero, E.; Macià, M. D.; Oliver, A. Antibiotic Treatment of Biofilm Infections. *APMIS* **2017**, *125* (4), 304–319. <https://doi.org/10.1111/apm.12673>.
- (33) Warriar, A.; Mazumder, N.; Prabhu, S.; Satyamoorthy, K.; Murali, T. S. Photodynamic Therapy to Control Microbial Biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2021**, *33*, 102090. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102090>.
- (34) Pankey, G. A.; Sabath, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases* **2004**, *38* (6), 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>.
- (35) Du, L.; He, Y.; Zhou, Y.; Liu, S.; Zheng, B.-J.; Jiang, S. The Spike Protein of SARS-CoV — a Target for Vaccine and Therapeutic Development. *Nat Rev Microbiol* **2009**, *7* (3), 226–236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>.
- (36) Grobbelaar, L. M.; Venter, C.; Vlok, M.; Ngoepe, M.; Laubscher, G. J.; Lourens, P. J.; Steenkamp, J.; Kell, D. B.; Pretorius, E. SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Induces Fibrin(Ogen) Resistant to Fibrinolysis: Implications for Microclot Formation in COVID-19. medRxiv March 8, 2021, p 2021.03.05.21252960. <https://doi.org/10.1101/2021.03.05.21252960>.
- (37) Walls, A. C.; Tortorici, M. A.; Snijder, J.; Xiong, X.; Bosch, B.-J.; Rey, F. A.; Veesler, D. Tectonic Conformational Changes of a Coronavirus Spike Glycoprotein Promote Membrane Fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (42), 11157–11162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708727114>.
- (38) Sungnak, W.; Huang, N.; Bécavin, C.; Berg, M.; Queen, R.; Litvinukova, M.; Talavera-Lopez, C.; Maatz, H.; Reichart, D.; Sampaziotis, F.; Worlock, K. B.; Yoshida, M.;

Barnes, J. L. SARS-CoV-2 Entry Factors Are Highly Expressed in Nasal Epithelial Cells Together with Innate Immune Genes. *Nat Med* **2020**, *26* (5), 681–687. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>.

(39) Nagy, P. D.; Pogany, J. The Dependence of Viral RNA Replication on Co-Opted Host Factors. *Nat Rev Microbiol* **2011**, *10* (2), 137–149. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2692>.

(40) Nathan, R.; Shawa, I.; De La Torre, I.; Pustizzi, J. M.; Hastrup, N.; Patel, D. R.; Huhn, G. A Narrative Review of the Clinical Practicalities of Bamlanivimab and Etesevimab Antibody Therapies for SARS-CoV-2. *Infect Dis Ther* **2021**, *10* (4), 1933–1947. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00515-6>.

(41) VARIANT SELECTION, CHARACTERIZATION, AND IMPACT ON ANTIBODY SARS-CoV-2 NEUTRALIZATION. *CROI Conference*.

(42) Lamb, Y. N. Remdesivir: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (13), 1355–1363. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01378-w>.

(43) Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* **2021**, *384* (8), 693–704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436>.

(44) Noreen, S.; Maqbool, I.; Madni, A. Dexamethasone: Therapeutic Potential, Risks, and Future Projection during COVID-19 Pandemic. *Eur J Pharmacol* **2021**, *894*, 173854. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173854>.

(45) Bojadzic, D.; Alcazar, O.; Buchwald, P. Methylene Blue Inhibits the SARS-CoV-2 Spike–ACE2 Protein–Protein Interaction—a Mechanism That Can Contribute to Its Antiviral Activity Against COVID-19. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.600372>

(46) Miclescu, A.; Wiklund, L. Methylene Blue, an Old Drug with New Indications? *Jurnalul Român de Anestezie Terapie intensivă* **2010**, <https://www.semanticscholar.org/paper/Methylene-blue%2C-an-old-drug-with-new-indications-Miclescu-Wiklund/0e17d0950bd1f726f5df68fdff84657b98badea5>

(47) Dabholkar, N.; Gorantla, S.; Dubey, S. K.; Alexander, A.; Taliyan, R.; Singhvi, G. Repurposing Methylene Blue in the Management of COVID-19: Mechanistic Aspects and Clinical Investigations. *Biomed Pharmacother* **2021**, *142*, 112023. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112023>.

(48) Bradberry, S. M. Occupational Methaemoglobinaemia. *Toxicol Rev* **2003**, *22* (1), 13–27. <https://doi.org/10.2165/00139709-200322010-00003>.

(49) Wang, J.; Zhao, C.; Kong, P.; Bian, G.; Sun, Z.; Sun, Y.; Guo, L.; Li, B. Methylene Blue Alleviates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Modulating AMPK/SIRT1 Signaling Pathway and Th17/Treg Immune Response. *J Neuroimmunol* **2016**, *299*, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.08.014>.

(50) Wiehe, A.; O'Brien, J. M.; Senge, M. O. Trends and Targets in Antiviral Phototherapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18* (11), 2565–2612. <https://doi.org/10.1039/C9PP00211A>.

- (51) Zou, L.; Ruan, F.; Huang, M.; Liang, L.; Huang, H.; Hong, Z.; Yu, J.; Kang, M.; Song, Y.; Xia, J.; Guo, Q.; Song, T.; He, J.; Yen, H.-L.; Peiris, M.; Wu, J. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med* **2020**, *382* (12), 1177–1179. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>.
- (52) Pérez-Laguna, V.; García-Malinis, A. J.; Aspiroz, C.; Rezusta, A.; Gilaberte, Y. Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy. *G Ital Dermatol Venereol* **2018**, *153* (6), 833–846. <https://doi.org/10.23736/s0392-0488.18.06007-8>.
- (53) Kessel, D. Photodynamic Therapy: From the Beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2004**, *1* (1), 3–7. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00003-1).
- (54) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. *CA Cancer J Clin* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (55) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One-Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2004**, *1* (4), 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- (56) Rocha, L. B.; Gomes-da-Silva, L. C.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Elimination of Primary Tumours and Control of Metastasis with Rationally Designed Bacteriochlorin Photodynamic Therapy Regimens. *Eur J Cancer* **2015**, *51* (13), 1822–1830. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.06.002>.
- (57) Silva, E. F. F.; Serpa, C.; Dabrowski, J. M.; Monteiro, C. J. P.; Formosinho, S. J.; Stochel, G.; Urbanska, K.; Simões, S.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G. Mechanisms of Singlet-Oxygen and Superoxide-Ion Generation by Porphyrins and Bacteriochlorins and Their Implications in Photodynamic Therapy. *Chemistry* **2010**, *16* (30), 9273–9286. <https://doi.org/10.1002/chem.201000111>.
- (58) Wainwright, M. The Emerging Chemistry of Blood Product Disinfection. *Chemical Society Reviews* **2002**, *31* (2), 128–136. <https://doi.org/10.1039/B101905H>.
- (59) Hamblin, M. R.; Hasan, T. Photodynamic Therapy: A New Antimicrobial Approach to Infectious Disease? *Photochem Photobiol Sci* **2004**, *3* (5), 436–450. <https://doi.org/10.1039/b311900a>.
- (60) Engelhardt, V.; Krammer, B.; Plaetzer, K. Antibacterial Photodynamic Therapy Using Water-Soluble Formulations of Hypericin or MTHPC Is Effective in Inactivation of Staphylococcus Aureus. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9* (3), 365–369. <https://doi.org/10.1039/B9PP00144A>.
- (61) Shawar, R.; Cooper, B. H. Comparative Kinetics of Hematoporphyrin Derivative Uptake and Susceptibility of Bacillus Subtilis and Streptococcus Faecalis to Photodynamic Action. *Photochem Photobiol* **1990**, *52* (4), 825–830. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1990.tb08688.x>.

- (62) Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Parish, J. H.; Brown, S. B. Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane of Escherichia Coli. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, *44* (3), 522–527. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.522-527.2000>.
- (63) Soncin, M.; Fabris, C.; Buseti, A.; Dei, D.; Nistri, D.; Roncucci, G.; Jori, G. Approaches to Selectivity in the Zn(II)-Phthalocyanine-Photosensitized Inactivation of Wild-Type and Antibiotic-Resistant Staphylococcus Aureus. *Photochem Photobiol Sci* **2002**, *1* (10), 815–819. <https://doi.org/10.1039/b206554a>.
- (64) Dai, T.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Localized Infections – State of the Art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2009**, *6* (3–4), 170–188. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.10.008>.
- (65) Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y. Photodynamic Inactivation of Gram-Negative Bacteria: Problems and Possible Solutions. *J Photochem Photobiol B* **1992**, *14* (3), 262–266. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)85104-3](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85104-3).
- (66) Huang, L.; Terakawa, M.; Zhiyentayev, T.; Huang, Y.-Y.; Sawayama, Y.; Jahnke, A.; Tegos, G. P.; Wharton, T.; Hamblin, M. R. Innovative Cationic Fullerenes as Broad-Spectrum Light-Activated Antimicrobials. *Nanomedicine* **2010**, *6* (3), 442–452. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.10.005>.
- (67) Sharma, S. K.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, Y.-Y.; St Denis, T. G.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Isr J Chem* **2012**, *52* (8–9), 691–705. <https://doi.org/10.1002/ijch.201100062>.
- (68) Schaberle, F. A. Assessment of the Actual Light Dose in Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2018**, *23*, 75–77. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.009>.
- (69) Sabino, C. P.; Wainwright, M.; Ribeiro, M. S.; Sellera, F. P.; dos Anjos, C.; Baptista, M. da S.; Lincopan, N. Global Priority Multidrug-Resistant Pathogens Do Not Resist Photodynamic Therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2020**, *208*, 111893. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111893>.
- (70) Theodoro, L. H.; Pires, J. R.; Fernandes, L. A.; Gualberto Júnior, E. C.; Longo, M.; de Almeida, J. M.; Garcia, V. G. Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy on Periodontally Infected Tooth Sockets in Rats. *Lasers Med Sci* **2015**, *30* (2), 677–683. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1400-8>.
- (71) Maisch, T.; Baier, J.; Franz, B.; Maier, M.; Landthaler, M.; Szeimies, R.-M.; Bäuml, W. The Role of Singlet Oxygen and Oxygen Concentration in Photodynamic Inactivation of Bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (17), 7223–7228. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611328104>.
- (72) Alves, E.; Faustino, M. A.; Neves, M. G.; Cunha, A.; Tome, J.; Almeida, A. An Insight on Bacterial Cellular Targets of Photodynamic Inactivation. *Future Med Chem* **2014**, *6* (2), 141–164. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.211>.
- (73) Bonnier, F.; Keating, M. E.; Wróbel, T. P.; Majzner, K.; Baranska, M.; Garcia-Munoz, A.; Blanco, A.; Byrne, H. J. Cell Viability Assessment Using the Alamar Blue

Assay: A Comparison of 2D and 3D Cell Culture Models. *Toxicology in Vitro* **2015**, *29* (1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014>.

(74) Hu, X.; Huang, Y.-Y.; Wang, Y.; Wang, X.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1299. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01299>.

(75) Reynoso, E.; Ferreyra, D. D.; Durantini, E. N.; Spesia, M. B. Photodynamic Inactivation to Prevent and Disrupt Staphylococcus Aureus Biofilm under Different Media Conditions. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **2019**, *35* (5), 322–331. <https://doi.org/10.1111/phpp.12477>.