



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

BRUNA PEREIRA DA SILVA

**INCORPORAÇÃO DE ZINCO-PORFIRINAS EM HIDROGÉIS PARA
APLICAÇÃO EM INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Recife

2024

BRUNA PEREIRA DA SILVA

**INCORPORAÇÃO DE ZINCO-PORFIRINAS EM HIDROGÉIS PARA APLICAÇÃO
EM INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produção e controle de medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Adriana Fontes

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças

Recife

2024

BRUNA PEREIRA DA SILVA

**“INCORPORAÇÃO DE ZINCO-PORFIRINAS
EM HIDROGÉIS PARA APLICAÇÃO EM INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 12/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Christiane Philippini Ferreira Borges (Examinadora externa)
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

Prof^a. Dr^a. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Bruna Pereira da.

Incorporação de zinco-porfirinas em hidrogéis para aplicação em inativação fotodinâmica antimicrobiana / Bruna Pereira da Silva. - Recife, 2025.

119f.: il.

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Beate Saegesser Santos.

Coorientação: Adriana Fontes.

Coorientação: Júlio Santos Rebouças.

Inclui referências e apêndices.

1. Metaloporfirinas; 2. Hidrogéis; 3. Infecções cutâneas; 4. Terapia fotodinâmica. I. Santos, Beate Saegesser. II. Fontes, Adriana. III. Rebouças, Júlio Santos. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial à minha mãe, Carmelita
Lúcia, uma mulher incrível que criou
cinco filhos com muito amor, trabalho e
dedicação. A realização desse sonho é
nossa!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus pelo dom da vida e por me fortalecer na busca da realização desse sonho.

À toda minha família, por acreditarem no meu potencial e me motivarem nos momentos de dificuldades, em especial à minha mãe Carmelita, minha maior inspiração. Ao meu cachorrinho Paçoca por todo amor e companhia nas longas madrugadas.

À minha orientadora Dr^a. Beate Saegesser por toda compreensão, ensinamentos, amizade e por ser referência não só de pesquisadora, como também de mulher que impulsiona outras a serem o que desejam.

Aos professores Dr^a. Adriana Fontes, Dr. Júlio Rebouças e seus grupos de pesquisa por todas as contribuições e ricas discussões ao longo da elaboração do trabalho.

Às professoras presentes na banca minha grande admiração e gratidão por toda contribuição e disponibilidade. Especialmente a Dr^a. Christiane que acompanhou meu início no projeto e Dr^a. Danielle por abrir as portas do LAM para os experimentos.

Aos colegas do LINSO pela parceria e auxílio ao longo dos experimentos, em especial à Evanisia, Cláudio, Marques e Gabriel.

Ao laboratório LABTECBI da UFRPE, na pessoa de Prof^a. Dr^a. Ana Porto e do Dr. Thiago Pageú, ao departamento de antibióticos UFPEDA, na pessoa de Prof^a. Dr^a. Glaucia Manoela e da doutoranda Amanda Silva, por todos os ensinamentos e por terem disponibilizado os laboratórios para a realização dos experimentos.

Aos meus amigos queridos de jornada acadêmica, Helimarcos e Malu, por sempre estarem presentes e por me compreenderem nos momentos difíceis e por se alegrarem nos momentos de conquistas. Minha amiga Wilma, companheira de apartamento em Recife pela parceria. Às minhas amigas Ana Mayara, Aída, Menilla, Jéssica e Mayara, que tanto me apoiaram para que tudo desse certo.

Aos órgãos de fomento pelo financiamento de bolsa no início do doutorado e incentivos financeiros. À Universidade Pública por me proporcionar mudança de vida através de oportunidades. E por fim a todos que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho.

“Irmão, você não percebeu que você é o único representante do seu sonho na face da terra? Somos maior, nos basta só sonhar, seguir...levanta e anda.”

Emicida

RESUMO

O aumento da resistência bacteriana às classes de antimicrobianos tem sido preocupante. Novas alternativas de tratamento vem sendo alvo de pesquisas, entre elas a inativação fotodinâmica, técnica mediada por luz em comprimento de onda adequado, fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular, que combinados levam a um estresse oxidativo e morte das células-alvo. Infecções cutâneas de grande relevância clínica podem ser ocasionadas por agentes infecciosos multirresistentes como *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA). Neste trabalho, zinco-porfirinas (ZnP) foram caracterizadas e incorporadas em géis poliméricos para serem utilizadas na inativação fotodinâmica de cepas de *S. aureus* resistentes. Foram utilizadas como FS, ZnPETil e ZnPHexil, e como matriz polimérica testadas hidroxietilcelulose (HEC), carbopol e alginato, além de utilizar o propilenoglicol e ureia como agentes umectantes para as formulações tópicas. Apesar da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ter sido semelhante para ZnPETil (79,9%) e ZnPHexil (78,2%) os resultados iniciais de inativação fotodinâmica para *S. aureus* isolada da mastite bubalina, nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e no tempo de irradiação de 1min, demonstraram que a ZnPHexil foi mais efetiva nos testes *in vitro*, sendo a selecionada para o estudo. O gel de HEC1% (m/v) demonstrou maior compatibilidade com o FS, através da avaliação dos espectros de absorção, emissão e características organolépticas. A adição de agentes umectantes nos hidrogéis apresentou aumento da espalhabilidade, e o hidrogel com ureia apresentou maior produção de EROs (58,5%), quando comparado à formulação com propilenoglicol (48,7%). A irradiação no comprimento de onda de 410 nm (47,61 mW/cm²) apresentou resultados mais promissores que em 450 nm (48,7 mW/cm²) para um menor tempo de irradiação (1min), por isso foi o adotado para o estudo. Porém, na avaliação dos gráficos pode ser observado que ambos podem ser aplicados quando utilizado maior tempo (a partir de 2min). Mediante os ensaios com cepas de *S. aureus* ATCC e *S. aureus* resistente isolada da mastite, foi observado que a menor concentração e o menor tempo testado (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ /1min) foram suficientes para inativar os microrganismos estudados, mas também foi verificada uma possível toxicidade no escuro do FS em solução na concentração de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Quando testados os hidrogéis com e sem ureia em cepas de *S. aureus* ATCC e MRSA, a efetividade do FS também foi observada na menor concentração (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) que demonstrou total inativação em todas formulações e tempo de irradiação testado (3min), inclusive na cepa multirresistente. O gel sem FS não apresentou inativação, e na cepa MRSA não foi observada toxicidade no escuro em nenhuma amostra avaliada. Os hidrogéis desenvolvidos com a incorporação de ZnPHexil apresentaram-se como uma alternativa promissora para o tratamento fotodinâmico de infecções causadas por bactérias multirresistentes. As amostras com e sem ureia destacaram-se por apresentarem total efetividade em menor tempo de tratamento e utilizando baixas concentrações de FS.

Palavras-chave: Metaloporfirinas; Hidrogéis; Infecções cutâneas; Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

The increase in bacterial resistance to antimicrobial classes has been a cause for concern. New treatment alternatives have been the subject of research, including photodynamic inactivation, a technique mediated by light at an appropriate wavelength, photosensitizer (PS) and molecular oxygen, which combined lead to oxidative stress and death of the target cells. Skin infections of great clinical relevance can be caused by multi-resistant infectious agents such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In this study, zincoporphyrins (ZnP) were characterized and incorporated into polymer gels to be used in the photodynamic inactivation of resistant *S. aureus* strains. ZnPETil and ZnPHexil were used as FS, and hydroxyethylcellulose (HEC), carbopol and alginate were tested as the polymeric matrix, in addition to using propylene glycol and urea as wetting agents for the topical formulations. Although the generation of reactive oxygen species (ROS) was similar for ZnPETil (79.9%) and ZnPHexil (78.2%), the initial photodynamic inactivation results for *S. aureus* isolated from buffalo mastitis, at concentrations of 1 and 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and an irradiation time of 1min, showed that ZnPHexil was more effective in the in vitro tests and was selected for the study. The HEC1% (w/v) gel showed greater compatibility with the FS, through the evaluation of absorption and emission spectra and organoleptic characteristics. The addition of wetting agents to the hydrogels showed an increase in spreadability, and the hydrogel with urea showed greater production of ROS (58.5%) when compared to the formulation with propylene glycol (48.7%). Irradiation at a wavelength of 410 nm (47.61 mW/cm²) showed more promising results than at 450 nm (48.7 mW/cm²) for a shorter irradiation time (1min), which is why it was adopted for the study. However, an evaluation of the graphs shows that both can be applied when a longer time is used (from 2 minutes). Through the tests with strains of *S. aureus* ATCC and resistant *S. aureus* isolated from mastitis, it was observed that the lowest concentration and the shortest time tested (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ /1min) were sufficient to inactivate the microorganisms studied, but a possible toxicity in the dark of the FS in solution at a concentration of 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ was also verified. When hydrogels with and without urea were tested on strains of *S. aureus* ATCC and MRSA, the effectiveness of FS was also observed at the lowest concentration (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$), which showed total inactivation in all formulations and irradiation time tested (3min), including the multi-resistant strain. The gel without FS showed no inactivation, and in the MRSA strain no toxicity was observed in the dark in any of the samples evaluated. The hydrogels developed with the incorporation of ZnPHexil were shown to be a promising alternative for the photodynamic treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria. The samples with and without urea stood out for their total effectiveness in a shorter treatment time and using low concentrations of PS.

Keywords: Metalloporphyrins; Hydrogels; Skin infections; Photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do fotossensibilizador Photofrin®.....	27
Figura 2: Mecanismo de ação envolvido na inativação fotodinâmica antimicrobiana para gerar espécies reativas de oxigênio.....	28
Figura 3: Relação do comprimento de onda da fonte de luz com sua capacidade de penetração na pele.....	30
Figura 4: Estrutura do anel porfirínico base livre.....	32
Figura 5: Estruturas químicas e espectros de absorção eletrônica de (A) porfirina de base livre e (B) porfirina complexada ao íon Zn (II).....	33
Figura 6: Fotossensibilizadores à base de Zn (II) -porfirina com seus acrônimos correspondentes.....	34
Figura 7: Representação das diferentes composições das bactérias: (a) gram-positiva (b) gram-negativa.....	35
Figura 8: Teste de citotoxicidade da ZnPHexil mediante a viabilidade de macrófagos pelo ensaio MTT.....	36
Figura 9: Estrutura molecular dos polímeros: (A) carbopol 940®; (B) hidroxietilcelulose e (C) alginato.....	39
Figura 10: Método experimental de estimativa de espalhabilidade de um sistema semissólido: (a) suporte de madeira com alumínio forrado com papel milimetrado, (b) placa de vidro.....	45
Figura 11: Parâmetros de aplicação dos LEDbox azuis ($\lambda = 410 \text{ nm}$ / $\lambda = 450 \text{ nm}$) utilizados no estudo comparativo de geração indireta de espécies reativas de oxigênio pelo método RNO.....	47
Figura 12: Distribuição das amostras na placa de 96 poços para inativação fotodinâmica de <i>Staphylococcus aureus</i> isolado da mastite, para escolha entre ZnPEtil e ZnPHexil como fotossensibilizador do estudo.....	48

Figura 13: Sequência do experimento de inativação fotodinâmica de <i>Staphylococcus aureus</i> isolado de mastite e ATCC, para comparativo da reprodutibilidade da leitura de microplaca e contagem de unidades formadoras de colônia.....	50
Figura 14: Sequência do experimento de inativação fotodinâmica de <i>Staphylococcus</i> resistente à metilina e ATCC, utilizando soluções e hidrogéis com ZnPHexil como fotossensibilizador e contagem de unidades formadoras de colônia para avaliação dos resultados.....	51
Figura 15: Espectros de absorção e diferença da estrutura química das ZnP _s utilizadas no estudo. (a) ZnPETil; (b) ZnPHexil.....	52
Figura 16: Redução da absorbância do RNO em função da geração de espécies reativas de oxigênio por (a) ZnPETil; (b) ZnPHexil.	53
Figura 17: Teste de viabilidade bacteriana da <i>Staphylococcus aureus</i> isolada de um caso de mastite bubalina irradiada por 1 min em contato com amostras dos fotossensibilizadores ZnPETil e ZnPHexil com concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$...	55
Figura 18: Hidrogéis desenvolvidos na fase 1 do estudo para determinação do polímero a ser escolhido para incorporação da ZnPHexil.....	57
Figura 19: Espectros de emissão (a) e absorção (b) dos hidrogéis produzidos na fase 1 do estudo para escolha do polímero.....	58
Figura 20: Hidrogéis de HEC 1% m/v desenvolvidos na fase 2 do estudo com e sem ZnPHexil em diferentes concentrações para visualização da fluorescência.....	60
Figura 21: Determinação da espalhabilidade do gel HEC 1% m/v com e sem a incorporação de ZnPHexil ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e agentes umectantes.	62
Figura 22: Caracterização óptica da ZnPHexil e dos hidrogéis desenvolvidos com HEC 1% com e sem agentes de umectação.....	64
Figura 23: Comparativo da variação da intensidade de absorção de RNO em $\lambda = 460$ nm em função do tempo de irradiação, usando LEDbox com emissão em $\lambda = 410$ nm	

e $\lambda = 450$ nm para a solução e géis desenvolvidos com ZnPHexil ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$).....	66
Figura 24: Avaliação da viabilidade celular sem aplicação da irradiação para análise da toxicidade no escuro da ZnPHexil nas concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) <i>S.aureus</i> ATCC (b) <i>S.aureus</i> mastite.	70
Figura 25: Avaliação da viabilidade bacteriana da inativação da <i>S.aureus</i> ATCC (a) e <i>S.aureus</i> isolado da mastite (b) com irradiação de 1 e 3 minutos, utilizando o LED azul e a ZnPHexil em concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ como fotossensibilizador....	71
Figura 26: Avaliação da viabilidade celular quando testada ZnPHexil em solução e incorporada em hidrogéis de HEC1% m/v com e sem ureia, nas concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sem aplicação da irradiação.	73
Figura 27: Avaliação da viabilidade bacteriana da inativação da <i>S. aureus</i> ATCC(a) e <i>S. aureus</i> MRSA (b) com irradiação de 3 min, utilizando o LED azul $\lambda = 410$ nm (47.61 mW/cm^2) e a ZnPHexil em solução nas concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e incorporada em hidrogéis de HEC1% m/v com e sem ureia.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos e materiais utilizados no presente estudo.....	41
Tabela 2: Componentes dos hidrogéis desenvolvidos com incorporação da ZnPHexil testada no estudo.....	43
Tabela 3: Componentes dos hidrogéis desenvolvidos com hidroxietilcelulose e incorporação da ZnPHexil com adição de agentes umectantes.....	44
Tabela 4: Comparação da leitura do espectro de absorção do método indireto RNO para quantificar EROs das zinco-porfirinas investigadas no estudo.....	54
Tabela 5: Características macroscópicas do ativo e dos hidrogéis produzidos na etapa 1 do estudo para escolha do polímero para melhor veiculação da ZnPHexil.....	57
Tabela 6: Dados espectrais referentes à análise dos gráficos de absorção e emissão da Figura 19.....	59
Tabela 7: Potencial hidrogeniônico da ZnPHexil em solução e hidrogéis desenvolvidos com hidroxietilcelulose 1%, com e sem ZnPHexil, com e sem os agentes umectantes.....	61
Tabela 8: Espalhabilidade dos hidrogéis desenvolvidos com hidroxietilcelulose 1%, com e sem ZnPHexil, com e sem os agentes umectantes.....	61
Tabela 9: Determinação da espalhabilidade do gel HEC 1% m/v com e sem a incorporação de ZnPHexil ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$).....	61
Tabela 10: Dados espectrais referentes à análise de absorbância e emissão da ZnPHexil solução e hidrogéis desenvolvidos com HEC1%.....	65
Tabela 11: Comparação da leitura do espectro de absorção do método indireto RNO com irradiação de 30s para quantificar as espécies reativas de oxigênio dos géis investigados no estudo com emissão em 410 e 450nm.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ALG	Alginato de sódio
AM	Azul de metileno
CBP	Carbopol 940®
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEC	Hidroxietilcelulose
MO	Microrganismo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ZnPEtil	ZnTE-2-PyP4+
ZnPHexil	ZnTnHex-2-PyP4+
ZnPs	Zinco-porfirinas

LISTA DE SIGLAS

aPDI	Antimicrobial photodynamic inactivation
AgNPs	Nanopartículas de prata
BHI	Brain heart infusion broth
BMDMs	Macrófagos derivados de medula óssea
CCD	Cromatografia de camada delgada
CIM	Concentração mínima inibitória
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fotossensibilizador
^s FS	FS no estado fundamental
^s FS*	FS no estado excitado
^T FS*	FS no estado excitado tripleto
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED	Light Emitting Diode
LPS	Lipopolissacarídeos
MH	Mueller hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
RNO	N,N-dimetil-4-nitrosoanilina
TFD	Terapia fotodinâmica

LISTA DE SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular no estado fundamental
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superóxido
OH^-	Radical hidroxila
CH	Metino
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
λ	Comprimento de onda
g	Grama
μ	Micro
π	Pi
J cm^{-2}	Joule por centímetros quadrado
nm	Nanômetro
mol L^{-1}	Mol por litro
mW	Miliwatts
m/v	Massa/volume
mL	Mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 Resistência bacteriana a antimicrobianos	21
3.1.1 Problema de saúde pública	21
3.1.2 Mecanismos de resistência	22
3.1.3 Histórico do uso de antibióticos e resistência	23
3.1.4 Infecções cutâneas ocasionadas por <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina	24
3.1.4.1 <i>Tratamento farmacológico</i>	25
3.2 Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana	26
3.2.1 Breve histórico	26
3.2.2 Mecanismo de ação	27
3.2.3 Fontes de luz e parâmetros de aplicação	29
3.2.4. Fotossensibilizadores	30
3.2.4.1. <i>Porfirinas e metaloporfirinas</i>	31
3.3 Aplicação tópica de fotossensibilizadores	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Tipo de estudo	41
4.2 Locais do estudo	41
4.3 Materiais utilizados	41
4.4 Etapas do estudo	42
4.4.1 Síntese dos fotossensibilizadores	42

4.4.2 Desenvolvimento dos hidrogéis	43
4.4.3 Caracterização físico-química dos hidrogéis	45
4.4.4 Caracterização óptica das zinco-porfirinas e hidrogéis desenvolvidos...	46
4.4.5 Detecção indireta de EROS por método RNO/ L-histina	46
4.4.6 Desenvolvimento de método de inativação fotodinâmica de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando zinco-porfirinas com e sem hidrogéis	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Seleção da zinco-porfirina do estudo	52
5.1.1 Caracterização físico-química	52
5.1.2 Detecção indireta de EROs por método RNO/ L-histidina	53
5.1.3 Inativação fotodinâmica de <i>Staphylococcus aureus</i> : origem veterinária	55
5.2 Caracterização dos hidrogéis desenvolvidos	56
5.2.1 Caracterização dos hidrogéis desenvolvidos na Etapa 1	56
5.2.1.1 Análise organoléptica	56
5.2.1.2 Caracterização óptica das formulações	58
5.2.2 Caracterização dos hidrogéis desenvolvidos na Etapa 2	59
5.2.2.1 Análise organoléptica	59
5.2.2.2 Caracterização físico-química	60
5.2.2.3 Caracterização óptica das formulações	63
5.2.2.4 Detecção indireta de EROs por método RNO/ L-histidina	66
5.3 Inativação fotodinâmica de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando zinco-porfirina como fotossensibilizador	69
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE 1	
APÊNDICE 2	

1 INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos é considerada um dos maiores problemas de saúde pública mundial e tem sido observada em todas as opções farmacológicas disponíveis em uso clínico. Os fatores associados à disseminação de cepas resistentes de microrganismos têm sido relatados como mutações gênicas adaptativas ao ambiente, o uso indiscriminado de antibióticos e o surgimento de infecções cruzadas em várias partes do mundo. Sabe-se que infecções causadas por microrganismos resistentes estão associadas a maior morbidade, alto custo de tratamento e maior risco de mortalidade (Alos *et al.*, 2015; Amos-Tautua; Songca; Oluwafemi, 2019; Darby *et al.*, 2023).

Estima-se a ocorrência de 700 mil mortes anualmente ocasionadas por infecções com cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado. Segundo a Organização Mundial da Saúde, caso novas estratégias não sejam tomadas esse número deverá aumentar a 10 milhões de mortes por ano em 2050, ultrapassando as principais causas de mortalidade atuais, como doenças cardiovasculares e câncer (Morrison; Zembower, 2020).

As infecções cutâneas representam um espectro clínico de distúrbios dermatológicos que variam em gravidade e etiologia. Um dos principais agentes infecciosos que podem desencadear tais condições é *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), uma bactéria gram-positiva que tem sido amplamente reconhecida por sua capacidade de causar desde lesões superficiais até doenças mais invasivas. Quando as infecções tópicas estão associadas a bactérias multirresistentes o tratamento por muitas vezes torna-se mais complexo por não ocorrer resposta clínica a uma gama de antimicrobianos (Silva *et al.*, 2016; Falcone ; Tiseo, 2023).

Desta forma, surge a necessidade pelo desenvolvimento de métodos alternativos aos fármacos para a erradicação de microrganismos multirresistentes, entre eles tem se destacado a inativação fotodinâmica antimicrobiana ou em inglês *antimicrobial photodynamic inactivation* (aPDI). O princípio básico da aPDI envolve um fotossensibilizador (FS), que é ativado através do uso de uma fonte de luz em um comprimento de onda ressonante com a banda de absorção do FS. Através da ativação do FS são geradas espécies reativas de oxigênio (EROs), como oxigênio singlete e superóxido, que induzem o microrganismo alvo à morte. Como critérios

para segurança da técnica, os efeitos da aPDI devem ser limitados aos locais de aplicação e irradiação do FS com inativação relativamente rápida, sem causar citotoxicidade aos tecidos sadios adjacentes ao tratamento (Castro *et al.*, 2016; Souza T.H.S *et al.*, 2021a).

Dentre os FS explorados, as porfirinas têm sido alvo de diversos estudos com aplicação em microrganismos devido à baixa toxicidade no escuro, alta eficiência para geração de EROs intracelular e versatilidade estrutural permitindo a modulação de sua anfifilicidade e caráter iônico, facilitando a biodisponibilidade e interações com estruturas celulares. Desta forma, o uso de porfirinas em baixas concentrações e com parâmetros de irradiação adequados na aPDI podem contribuir para melhores resultados em infecções resistentes do que os apresentados pelos tratamentos padrões apenas com fármacos na grande maioria das lesões de pele (Fontana *et al.*, 2015; AL-Mutairi *et al.*, 2018). Porém, para maior eficácia clínica da aPDI em infecções cutâneas pode ser aplicada a incorporação dos FS em formulações farmacêuticas adequadas (Apostolidou *et al.*, 2024).

Boas formulações tópicas para aPDI devem possuir fácil administração, ser atóxica, não causar dor ou irritação local, além de maior adesão à pele possibilitando maior tempo de permanência do que o FS na sua forma de solução. O desenvolvimento de hidrogéis poliméricos antimicrobianos tem se mostrado como boas alternativas para a incorporação dos FS (Leung *et al.*, 2020) principalmente por sua facilidade de obtenção e transparência. Desta forma, o presente estudo tem o objetivo de preparar e caracterizar géis poliméricos com incorporação de zinco-porfirinas (ZnPs), para aplicação na aPDI de cepas de *S. aureus* multirresistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver hidrogéis com incorporação de zinco-porfirinas hidrofílicas e avaliar as condições necessárias para aplicação na inativação fotodinâmica de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar opticamente os FSs: ZnPEtil e ZnPHexil;
- Selecionar a ZnP com efeitos fotodinâmicos mais efetivos;
- Selecionar componentes (polímero e agentes de umectação) e desenvolver hidrogéis para aplicação tópica com incorporação da ZnP selecionada;
- Caracterizar físico-quimicamente os FSs estudados e os hidrogéis desenvolvidos: aspectos organolépticos, pH, espalhabilidade, centrifugação, espectroscopia de absorção e emissão;
- Avaliar e comparar a eficiência de produção de espécies reativas de oxigênio dos FSs estudados e hidrogéis desenvolvidos;
- Avaliar e determinar parâmetros metodológicos para maior eficiência de inativação fotodinâmica da ZnP em solução, testada em cepa de *Staphylococcus aureus* de origem clínica, para posterior ensaios com os hidrogéis desenvolvidos;
- Avaliar a eficiência da inativação fotodinâmica com os parâmetros anteriormente determinados para os ensaios com os hidrogéis desenvolvidos e selecionados para testes em cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Resistência bacteriana a antimicrobianos

3.1.1 Problema de saúde pública

As infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos vêm se tornando cada vez mais frequentes. Estas infecções estão associadas a uma maior morbidade, mortalidade e custos. Estima-se que até 2050, a resistência antimicrobiana causará 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo. Em 2019, a OMS declarou a resistência antimicrobiana como uma das dez principais ameaças globais à saúde pública que a humanidade enfrenta, ultrapassando as principais causas de mortalidade atuais, como doenças cardiovasculares e câncer. No mesmo ano, um relatório das Nações Unidas declarou que foram observados dados alarmantes de resistência em países de todos os níveis sociais, o que dificulta o tratamento básico de doenças comuns e torna mais arriscado a realização de procedimentos médicos convencionais (Morrison; Zembower, 2020; Bassetti *et al.*, 2022).

As bactérias patogênicas em um processo infeccioso, possuem a capacidade de agredir o organismo e os sistemas naturais de defesa através da transmissão, invasão e aderência de células e tecidos do hospedeiro produzindo a doença. Para contornar esse processo são utilizados os medicamentos antimicrobianos (Cavalcanti, 2012; Simoes Silva; Oliveira, 2013; Memar *et al.*, 2018).

Considera-se resistência antimicrobiana, a sobrevivência de cepas bacterianas ao tratamento com antibióticos, independentemente de suas características químicas, em concentrações que deveriam ser letais. Essa resistência tem se tornado cada vez mais preocupante, visto os casos em que o tratamento convencional não tem mais se demonstrado efetivo. A rápida multiplicação dos microrganismos patogênicos resistentes permite que eles sobrevivam mesmo na presença de antibióticos em pequenas concentrações (Paoli, 2005; Cavalcanti, 2012; Hatlen; Miller, 2021).

A maioria dos antibióticos conhecidos é produzida por microrganismos e muitos organismos no ambiente, incluindo plantas e animais, que produzem naturalmente substâncias antimicrobianas. A exposição aos antimicrobianos seleciona as bactérias resistentes e conduz à propagação da resistência antimicrobiana.

Vários fatores contribuem para esta seleção: a utilização e o abuso de antibióticos, isso inclui o uso desnecessário de antibióticos para tratar infecções virais,

o uso de antibióticos de espectro largo em vez de antibióticos mais específicos, e o uso prolongado de antibióticos sem supervisão médica. Outro fator diz respeito a determinada classe de medicamentos prescritos como é o caso daqueles medicamentos que causam depressão no sistema imunológico e doenças crônicas que podem suscitar imunossupressão e isso facilita o aumento de bactérias patogênicas resistentes. Além do uso indiscriminado em humanos, essa resistência também sofre impactos do uso incorreto de antibióticos na agricultura, na pecuária e na indústria (Taraszkiewicz *et al.*, 2013; Barbosa, 2015; Memar *et al.*, 2018; Christaki *et al.*, 2020).

3.1.2 Mecanismos de resistência

A resistência aos antibióticos exibida pelas bactérias pode ser intrínseca, adquirida ou adaptativa. A intrínseca é definida como a resistência exibida devido às propriedades inerentes da bactéria. Exemplos de resistência intrínseca incluem a resistência aos glicopeptídeos exibida pelas bactérias gram-negativas devido à impermeabilidade da membrana externa presente no envelope celular desse tipo de bactérias (Lee, 2019).

A resistência adquirida é definida como a resistência expressa quando uma bactéria previamente sensível adquire um mecanismo de resistência através de uma mutação ou da aquisição de novo material genético de uma fonte exógena, denominada como transferência horizontal de genes. Esse processo pode ocorrer através de três mecanismos principais (Holmes *et al.*, 2016; Munita ; Arias, 2016):

- Transformação: é uma forma de recombinação genética em que fragmentos de DNA livres de uma bactéria morta entram numa bactéria receptora e são incorporados no seu cromossoma. Apenas algumas bactérias são naturalmente transformáveis;
- Transdução: envolve a transferência de material genético entre uma bactéria doadora e uma bactéria receptora por um bacteriófago e;
- Conjugação: principal mecanismo de transferência horizontal de genes. Envolve a transferência de material genético de uma célula bacteriana para outra por contato físico direto entre as células. Forma-se uma pílula sexual entre as duas células bacterianas através do qual um plasmídeo é

transferido da célula doadora para a célula receptora. Múltiplos genes de resistência estão frequentemente presentes num único plasmídeo, permitindo a transferência de resistência a diversos fármacos num único evento de conjugação.

E por fim, a adaptativa é definida como a resistência que resulta de modulações na expressão gênica como resposta a mudanças ambientais. Em vez de ser causada por alterações genéticas, que geralmente produzem fenótipos irreversíveis, a resistência adaptativa é possivelmente o resultado de alterações epigenéticas, como estresse, estado de crescimento do MO, pH, concentrações de íons, condições nutricionais, níveis subinibitórios de antibióticos. É diferente da intrínseca e adquirida, a resistência adaptativa é transitória. Ela permite que as bactérias respondam mais rapidamente ao antibiótico, geralmente revertendo para o estado original assim que o sinal indutor é removido (Fernández; Breidenstein; Hancock, 2011; Lee, 2019; Salimiyan *et al.*, 2018).

O fenômeno da resistência adaptativa pode ser responsável pelas diferenças observadas quando se compara a eficácia *in vitro* e *in vivo* de um antibiótico e poderia estar envolvido no insucesso clínico dos tratamentos convencionais. Além disso, o aumento da resistência em resposta a estímulos ambientais pode não reverter completamente após a remoção do estímulo, levando a um aumento gradual da concentração mínima inibitória (CIM) ao longo do tempo. Por último, foi proposto que a capacidade das populações bacterianas de proliferar na presença de níveis subinibitórios de antibióticos através da resistência adaptativa pode eventualmente permitir o desenvolvimento de mecanismos de resistência mais eficazes e permanentes (Fernández; Breidenstein; Hancock, 2011; Salimiyan *et al.*, 2018; Salam *et al.*, 2023).

3.1.3 Histórico do uso de antibióticos e resistência

O primeiro antibiótico utilizado com sucesso terapêutico foi a penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928, para controlar infecções bacterianas em soldados durante a Segunda Guerra Mundial. Porém, em 1940, antes dessa utilização já tinham sido descritas as primeiras cepas de *Staphylococcus* resistentes à penicilina. Para controlar as primeiras penicilinas, a meticilina foi introduzida em

1959 e, um ano depois, em 1960, foi registrada uma cepa de *Staphylococcus* resistente à metilicina (MRSA) (Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013).

A vancomicina foi introduzida no mercado em 1958, para o tratamento de MRSA. Porém, em 1979, também foram notificados estafilococos coagulase-negativos resistentes à vancomicina e, dez anos mais tarde, foi descrita a resistência a *Enterococcus* (Courvalin, 2006), seguindo-se, em 1997, para o relato de cepas de *S. aureus* menos susceptíveis no Japão (Fowler, 2005). Outro exemplo histórico é a tetraciclina, que foi introduzida em 1950, seguida de cepas de *Shigella* resistentes à tetraciclina em 1959. Para além disso, a levofloxacina foi introduzida na prática clínica em 1996 e, no mesmo ano, foi notificado um pneumococo resistente (Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013; Salam *et al.*, 2023).

Entre 1960 e 1980, registrou-se uma produção aparentemente adequada de novos antimicrobianos pela indústria farmacêutica. No entanto, após a década de 1980, a taxa de descoberta de novas classes de antibióticos diminuiu drasticamente (Parmar, 2023). Em consequência do aumento da resistência antimicrobiana e da escassez de novos antimicrobianos, infecções bacterianas devidas a agentes patogênicos multirresistentes ou extensivamente resistentes a medicamentos se tornaram uma grande preocupação na prática clínica em todo o mundo, incluindo as infecções cutâneas de maior severidade (Falcone; Tiseo, 2023).

3.1.4 Infecções cutâneas ocasionadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina

O gênero *Staphylococcus* compreende 52 espécies e 28 subespécies, porém o *S. aureus* é a bactéria de maior importância clínica. A maioria das infecções de pele e tecidos moles tem como principal patógeno o *S. aureus* que é uma bactéria gram-positiva reconhecida como um microrganismo comensal comum da pele. Se apresenta na forma esférica e possui apenas 1 µm de diâmetro, aproximadamente. Ela se distingue de outras espécies de *Staphylococcus* devido à sua positividade para provas bioquímicas de coagulase, fermentação de manitol e testes de desoxirribonuclease e à sua pigmentação em amarelo ouro (Bréton-Martinez *et al.*, 2024). A presença de fatores de virulência, toxinas e condições ambientais (por exemplo, feridas cirúrgicas) são fatores significativos de progressão para as mais variadas infecções. Desta forma, infecções cutâneas acometidas por *S. aureus* podem

ocasionar desde uma foliculite leve autolimitada até infecções invasivas como bacteremia, abscessos, celulite e que podem se agravar para pneumonia, osteomielite, meningite, endocardite e até evoluir para uma sepse (Hatlen; Miller, 2021). Atualmente *S. aureus* pode ser classificada, de acordo com sua sensibilidade aos β -lactâmicos, em: sensível à meticilina (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA).

A resistência se torna preocupante pois a classe β -lactâmica inclui grande parte dos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica, como as penicilinas, a amoxicilina, a oxacilina, a meticilina, dentre outras (Hamilton; Macgowan, 2019). Nascimento ; Carstensen (2021), evidenciaram que o Brasil ocupa um dos piores índices de prevalência de MRSA no mundo, sendo mais de 50% dos *S. aureus* isolados categorizados como MRSA. Nesse contexto, o tratamento farmacológico se torna um grande desafio.

3.1.4.1 Tratamento farmacológico

A escolha do agente antimicrobiano para o tratamento é desafiadora e tem gerado altos custos aos serviços hospitalares pelo surgimento cada vez mais frequente de cepas de *S. aureus* MRSA. As infecções por MRSA que antes eram restritas ao ambiente hospitalar, nas últimas décadas tem se mostrado cada vez mais presentes também na comunidade, podendo causar infecções não só em indivíduos com comorbidades, mas também em indivíduos saudáveis. O tratamento destas infecções cutâneas é realizado com formulação tópica e dependendo da gravidade com associação à antibioticoterapia oral ou endovenosa. Como opção tópica é preconizado o uso da mupirocina pomada a 2%, classificada como bactericida, seu mecanismo de ação consiste em uma competição do aminoácido isoleucina pelo sítio ativo da bactéria. Consequentemente, não há incorporação deste aminoácido à cadeia polipeptídica do MO, inibindo assim a síntese proteica da bactéria. Porém, pelo seu uso contínuo, também já é possível observar resistência a esse medicamento, devido a alterações no sítio ativo do alvo (Falcone et al., 2020).

A associação com fármacos orais pode ser uma opção sendo os mais prescritos a tetraciclina e rifampicina, combinados, assim como a clindamicina, a linezolida e o sulfametoxazol-trimetoprima. Como fármacos endovenosos são indicados principalmente a vancomicina e teicoplanina, glicopeptídeos que agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana. Diante da baixa perspectiva de novos

antimicrobianos chegarem ao mercado nos próximos anos e da escassez de possibilidades terapêuticas tópicas para infecções cutâneas por *S. aureus* MRSA atualmente (De Queiroz *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2021), surge a necessidade da investigação de novas terapias e desenvolvimento de novas formulações tópicas que possam atuar de forma exclusiva ou como adjuvantes.

3.2 Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana

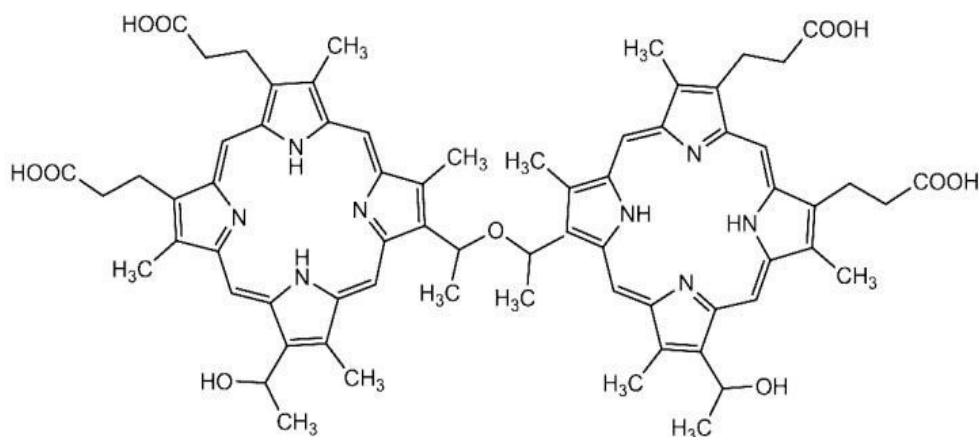
3.2.1 Breve histórico

Existem relatos da terapia através da luz ou da helioterapia ter sido utilizada ao longo da história desde as antigas civilizações, porém o conceito da terapia fotodinâmica (TFD) só teve seu primeiro registro em 1900 na Alemanha, quando um estudante de medicina, Oscar Raab sob a orientação do professor Hermann Von Tappeiner, descobriu acidentalmente que paramécios (*Paramecium scaudatam*) em contato com o corante acridina, podiam ser mortos quando expostos à luz, o que não acontecia quando ambos estavam no escuro. Posteriormente, foi descoberto que para acontecer a inativação na presença da luz era necessária ainda mais um componente no processo, o oxigênio molecular, a partir disso o termo “ação fotodinâmica” foi estabelecido (Abrahamse ; Hamblin, 2016).

Após essas descobertas a TFD foi testada inicialmente como terapia para o câncer e outras doenças de pele. Porém, só após os resultados do primeiro ensaio clínico em grande escala coordenado por Dougherty é que foi introduzido no mercado em 1993 o Photofrin®, uma formulação contendo derivados diméricos e oligoméricos de hematoporfirina, que foi o primeiro FS aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e indicado para o tratamento de câncer de pulmão, do trato digestivo e urinário (Figura 1) (Santos, 2016).

Com o avanço dos estudos a aplicação da TFD foi expandida em diversas áreas, como a dermatologia, oftalmologia, odontologia, cardiologia, cosméticos, purificação do sangue, desinfecção da água e na inativação de microrganismos. No tratamento de processos infecciosos essa aplicação tem sido amplamente investigada, principalmente como alternativa para os casos de resistência dos microrganismos ao tratamento com antibióticos convencionais. Essa modalidade é conhecida como inativação fotodinâmica antimicrobiana/aPDI (do inglês “antimicrobial photodynamic inactivation”) (Ezzeddine *et al.*, 2013; Abrahamse; Hamblin, 2016).

Figura 1: Estrutura química do fotossensibilizador Photofrin®.



Fonte: Santos, 2016.

O tratamento antimicrobiano aplicando aPDI tem sido bem explorado na odontologia, em diversas infecções orais utilizando o FS na forma de solução. Porém, torna-se interessante mais pesquisas com a incorporação desses FS em formas farmacêuticas tópicas e aplicação em outros tipos de infecções cutâneas. Para o sucesso dessa terapia o FS escolhido precisa ser seletivo para o alvo de aplicação, ainda se faz necessário a escolha do comprimento de onda apropriado da luz empregada e essa associação resulta em reações que podem modificar biomoléculas e estruturas celulares a ponto de causar morte celular através da geração de EROs (Kharkwal *et al.*, 2011a; Garcez *et al.*, 2012; Taraszkievicz *et al.*, 2013; Casu; Fanuli; Viganò, 2018;). Assim, compreender o mecanismo de ação da técnica torna-se imprescindível para sua aplicação correta.

3.2.2 Mecanismo de ação

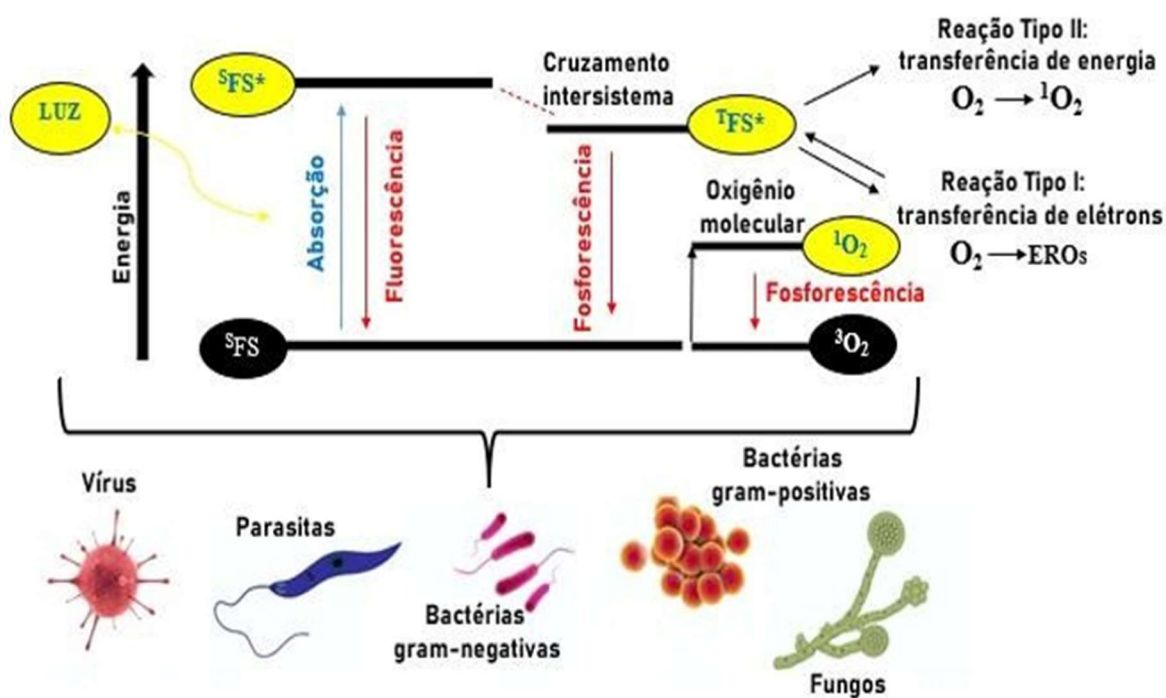
A aPDI é estritamente dependente da interação de três componentes: um FS apropriado, uma fonte de luz com comprimento de onda ressonante com a banda de absorção do FS e oxigênio molecular que por mecanismos de óxido-redução e formação de EROs podem induzir a inativação de microrganismos. Essa técnica tem sido amplamente estudada como alternativa aos tratamentos convencionais de infecções, especialmente quando há resistência aos antimicrobianos (Souza *et al.*, 2021b).

A técnica envolve duas etapas: inicialmente, o FS administrado é acumulado na célula/tecido alvo ou próximo dela; e em seguida, o sistema é irradiado por uma

fonte de luz adequada para o FS escolhido e que na presença de oxigênio produz EROs. O FS que está no seu estado fundamental (^SFS), após a absorção de fótons passa para seu estado excitado ($^S\text{FS}^*$) que é instável e de curta duração. Porém neste estado, o $^S\text{FS}^*$ pode voltar ao seu estado fundamental através da emissão de fluorescência, pode produzir a formação de EROs ou ainda através da inversão do spin do elétron excitado, conhecido como cruzamento intersistema, pode gerar o estado excitado tripleto do FS ($^T\text{FS}^*$) que é menos energético, mas tem um tempo de vida mais longo (Viana, 2015; Fong *et al.*, 2017).

O $^T\text{FS}^*$ pode reagir com o oxigênio molecular de duas formas para gerar espécies reativas, chamadas de reação do Tipo I (via formação de radicais) e reação do Tipo II (via formação de oxigênio tripleto) como demonstrado na Figura 2.

Figura 2: Mecanismo de ação envolvido na inativação fotodinâmica antimicrobiana para gerar espécies reativas de oxigênio. ^SFS fotossensibilizador no estado fundamental, $^S\text{FS}^*$ fotossensibilizador no estado excitado, $^T\text{FS}^*$ fotossensibilizador no estado excitado tripleto, $^1\text{O}_2$ oxigênio no estado singleto, $^3\text{O}_2/\text{O}_2$ oxigênio no estado tripleto.



Fonte: adaptado de Agostinis *et al.* (2011) ; Souza T.H.S *et al.* (2021a).

Na reação do Tipo I tanto o $^T\text{FS}^*$ pode interagir com estruturas endomembranas (mitocôndrias, lisossomo, ribossomo e outras) da célula possibilitando a transferência de elétrons (Baptista *et al.*, 2017). Na reação do Tipo II o $^T\text{FS}^*$ transfere energia para o oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\text{O}_2/\text{O}_2$),

denominado tripleto, levando-o a um estado excitado favorecendo a conversão de um spin formando oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que é uma espécie reativa de oxigênio altamente citotóxica e desencadeia danos celulares responsáveis pela morte celular (Charara *et al.*, 2017).

As reações do Tipo I e do Tipo II podem ocorrer simultaneamente e gerar a formação de EROs tais como, $\text{O}_2^{\bullet-}$ (superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), $\text{OH}^{\bullet}$ (radical hidroxila) e $^1\text{O}_2$. Em geral, independentemente do tipo de EROs formado por eles serem gerados intracelularmente e ter instabilidade, possuem a capacidade de danificar vários componentes biológicos, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, em uma ampla gama de microrganismos independentemente de sua estrutura ou resistência a antimicrobianos, provavelmente resultando em defeitos funcionais e culminando na morte dos microrganismos (Baptista *et al.*, 2017).

3.2.3 Fontes de luz e parâmetros de aplicação

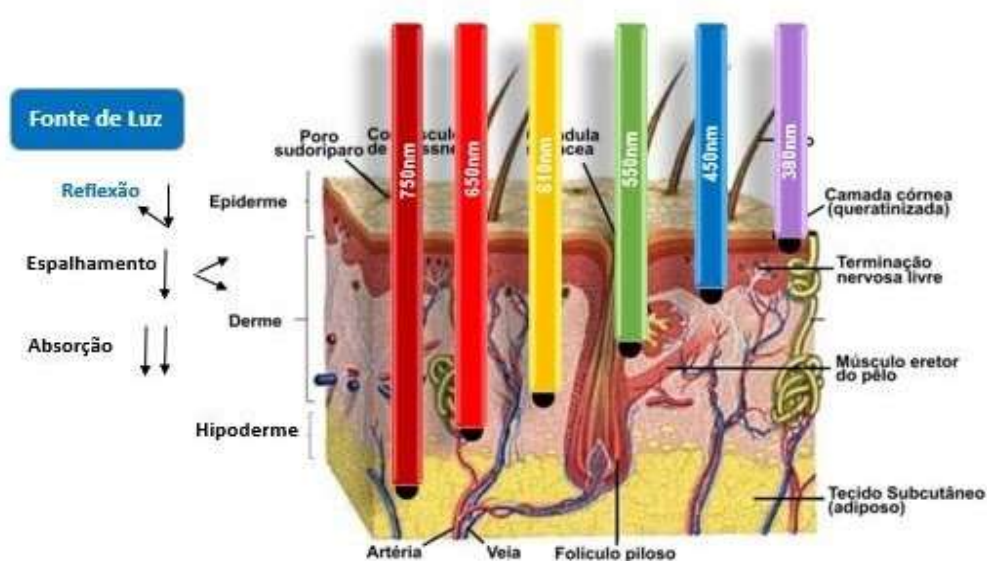
A literatura apresenta três classes principais de fontes de luz para aPDI/ TFD: Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), LED (*Light Emitting Diode*) e Lâmpadas de halogênio. A otimização do tratamento com as diferentes fontes de luz está relacionada com os parâmetros: potência média, faixa de comprimentos de onda, irradiância, irradiação contínua ou pulsada, tempo de irradiação/tratamento e tempo de pré-irradiação (Nagata, 2012; Sorbellini, Rucco ; Rinaldi, 2018).

O conhecimento sobre a dosimetria da luz no tratamento fotodinâmico com a definição de parâmetros físicos, é relevante para uma aplicação bem sucedida da aPDI. É importante conhecer a potência média da fonte de luz utilizada para calcular a irradiância a administrar. A taxa de fluência ou irradiância se refere na relação proporcional entre a potência de saída da luz por área, expressa geralmente em mW/cm^2 (Souza, T.H.S *et al.*, 2021a). O controle da irradiância é também importante para evitar danos térmicos em tratamentos *in vitro* e *in vivo*. A exposição radiante ou dose (luz) são definições também aplicadas e se referem à quantidade de energia aplicada à amostra por área (J/cm^2). A energia é calculada utilizando a potência média (W) $\times$ tempo de irradiação (segundos) (Issa; Manuela-Azulay, 2010; Santos, 2016).

Uma fonte de luz deve ser monocromática, com comprimento de onda na região da luz visível, entre 400 a 800 nm. A incidência da luz no alvo terapêutico depende do comprimento de onda a ser utilizado e esse fator depende do FS escolhido para

administração. Desta forma, torna-se importante considerar o tipo de pele e a profundidade da área lesionada, pois podem ocorrer fenômenos ópticos de reflexão, absorção e espalhamento da luz que podem interferir na transmissão da luz para tecidos mais profundos (Araújo, 2021). A relação escolha do comprimento de onda da fonte de luz *versus* capacidade de penetração na pele, pode ser observada na Figura 3.

Figura 3: Relação do comprimento de onda da fonte de luz com sua capacidade de penetração na pele.



Fonte: adaptado de Braga, 2017.

Como demonstrado, após estabelecido os parâmetros de aplicação, outro fator muito importante para a eficácia da terapia fotodinâmica é a escolha adequada do FS. Nesse sentido, é importante considerar, além do alvo terapêutico, as características físico-químicas do FS, tais como; carga elétrica, anfifilicidade e eficiência na geração de EROs (Braga, 2017; Araújo, 2021).

3.2.4 Fotossensibilizadores

A qualidade de um FS para aPDI/TFD depende de vários fatores, entre eles a ausência da toxicidade no escuro, ter seletividade, uso em comprimento de onda clinicamente útil e uma eliminação relativamente rápida dos tecidos normais para minimizar os efeitos secundários da fototoxicidade. Além disso, é desejável que tenha pureza controlável, fácil e reprodutível obtenção e que sua preparação permita fácil reconstituição, boa solubilidade e estabilidade em solução aquosa a pH fisiológico para que além de um armazenamento adequado, promova boa circulação e acúmulo seletivo nas células (Oliveira *et al.*, 2015; Abrahamse ; Hamblin, 2016).

A natureza do FS também é determinante para a sua seletividade e eficácia no tratamento, características como distribuição de carga e lipofilia da molécula estão entre os parâmetros mais importantes para controlar a captação celular e a distribuição do FS dentro da célula. De forma geral, FSs catiônicos como as zinco-porfirinas interagem melhor com as membranas biológicas, por essas serem aniônicas. Os FS também devem possuir alto rendimento quântico do estado tripleto após sua irradiação, para interagir com o oxigênio molecular e outros substratos em tempo adequado e gerar EROs em quantidade suficiente (Ezzeddine *et al.*, 2013; Moghnie *et al.*, 2017; Al-Mutairi, R. *et al.*, 2018).

Outro fator a ser observado é a fotodegradação ou fotobranqueamento do FS, que está relacionado com mudanças irreversíveis nas propriedades dos cromóforos após a irradiação. Tais alterações são geradas no substrato devido a fotorreações do FS com EROs que podem inviabilizar a absorção de luz pelo FS e impedir a geração de mais espécies reativas. Por isso, o armazenamento correto e escolha do FS mais adequado são essenciais para a efetividade da técnica (Giansante, 2014). Existem vários compostos que vêm sendo testados e utilizados na aPDI/TFD. Dentre eles, podem ser citados porfirinas, ftalocianinas, clorinas, texafirinas, fenotiazinas (como o azul de metileno), fulerenos, entre outros. No entanto, as porfirinas são uma das classes mais amplamente utilizadas na terapia fotodinâmica, com destaque nesse estudo para as metaloporfirinas conjugadas com Zn^{2+} , que demonstram diversas vantagens na sua aplicação (Giansante, 2014; Mete *et al.*, 2021; Souza T.H.S *et al.*, 2021a).

3.2.4.1 Porfirinas e metaloporfirinas

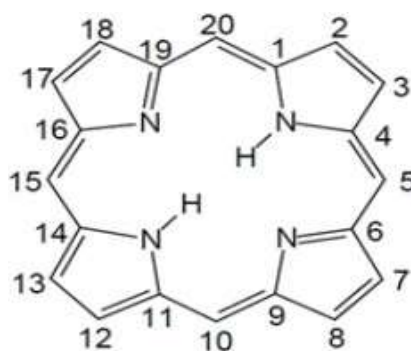
3.2.4.1.1 Características fotofísicas e fotoquímicas

Porfirinas são compostos macrocíclicos, aromáticos, altamente conjugados e muitos de seus derivados metálicos estão presentes em várias proteínas com funções biológicas, como: hemoglobina e mioglobina, porém elas também podem ser obtidas de forma sintética. Diversas porfirinas naturais e sintéticas têm sido utilizadas como potentes FSs em doenças tóxicas acometidas por microrganismos, como candidíase, acne vulgar e herpes labial. Nos processos fotodinâmicos porfirinas apresentam características e vantagens interessantes como baixa toxicidade no escuro *in vitro* e/ou *in vivo*, alta eficiência para geração de EROs intracelular e rendimentos quânticos

altos (Φ) para geração de $^1\text{O}_2$ e versatilidade estrutural permitindo sua modulação química, facilitando desta forma sua biodisponibilidade e interação com estruturas celulares (Souza T.H.S *et al.*, 2021a).

A base estrutural das porfirinas é constituída por anéis tetrapirrólicos ligados entre si por quatro grupos CH (metino), formando os compostos de base livre. (Figura 4), que podem ser classificados como de primeira, segunda e terceira geração que não apresentam boa atividade catalítica em oxidação de substratos orgânicos (Friedermann, 2005; Viana, 2015).

Figura 4: Estrutura do anel porfirínico base livre. *Carbonos nas posições 5,10,15 e 20 são denominados “carbonos em posições meso”. Os átomos das posições 2,3,7,8,12,13,17 e 18 são conhecidos como carbonos nas posições β -pirrólicas.



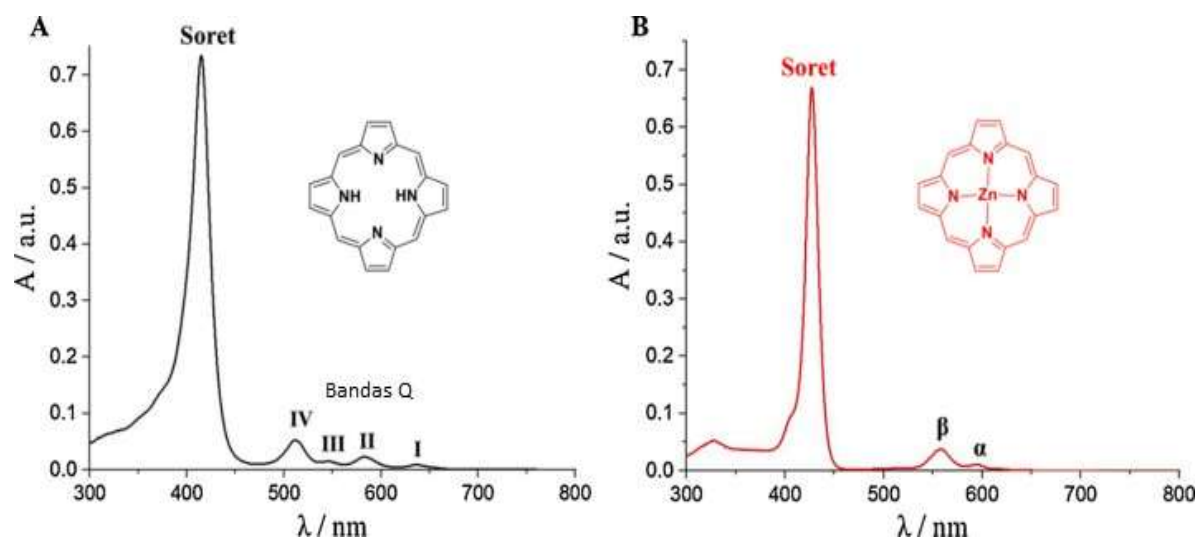
Fonte: adaptado de Viana (2015).

Porém, os quatro átomos de nitrogênio centrais são adequados para quelar elementos químicos, geralmente metais, resultando em metaloporfirinas. No caso das zinco-porfirinas, a complexação com Zn (II) têm potencial para apresentar características melhoradas, sendo FSs mais eficazes do que seus análogos de base livre. Estas mudanças estruturais do macrociclo aumentam a estabilidade química do porfirina e além disso, podem ser projetadas para modular seu caráter lipofílico ou iônico, aumentar a interação com membranas celulares e consequentemente sua seletividade, conduzir um rendimento quântico de oxigênio singlete mais elevado e facilitar a eliminação pelo organismo no pós-tratamento fotodinâmico, minimizando assim os efeitos adversos (Castro *et al.*, 2016; Souza T.H.S *et al.*, 2021).

As propriedades espectroscópicas das porfirinas são características com bandas bem definidas de absorção eletrônica. A banda mais intensa é conhecida como banda Soret, geralmente localizada em torno de 420 nm. As outras bandas menores, em torno de 500 e 800 nm, conhecidas como bandas Q (Skwor *et al.*, 2016).

No caso das metaloporfirinas, representadas aqui pelas zinco-porfirinas, pode ser observado na Figura 5 que ocorre um deslocamento da banda Soret e o espectro demonstra a substituição das bandas Q, por bandas denominadas α e β .

Figura 5: Estruturas químicas e espectros de absorção eletrônica de (A) porfirina de base livre e (B) porfirina complexada ao íon Zn (II).



Fonte: adaptado de. Souza T.H.S. *et al.* (2021a)

As propriedades fotofísicas, bem como a absorção e distribuição celular podem ser afetadas pela alteração de carga, tamanho, forma, versatilidade estrutural e orientação espacial do FS. A presença de cargas nas porfirinas não só proporciona melhor solubilidade em água, como também podem ampliar seu espectro de ação (Souza T.H.S *et al.*, 2021a).

Nas células cancerosas, enquanto a ZnPEtil tende a se acumular preferencialmente nos lisossomos e/ou distribuído no citoplasma, a ZnPHexil devido a sua maior lipofilicidade teve melhor interação com as células cancerígenas, especialmente com organelas essenciais como as mitocôndrias. Quando avaliada a ação fotodinâmica nas células bacterianas, a maior efetividade da ZnPHexil pode ser justificada pela maior absorção do FS quando comparada às suas análogas mais hidrofílicas, sua absorção intracelular chega a ser 8 vezes maior que quando utilizada a ZnPMetil. O que sugere que a maior lipofilicidade está relacionada com a maior efetividade da inativação fotodinâmica (Thomas *et al.*, 2015; Souza T.H.S *et al.*, 2021a). Na Figura 6 pode ser observado as porfirinas complexadas com Zn (II) e seus análogos.

Figura 6: Fotossensibilizadores à base de Zn(II) - porfirina com seus acrônimos correspondentes.



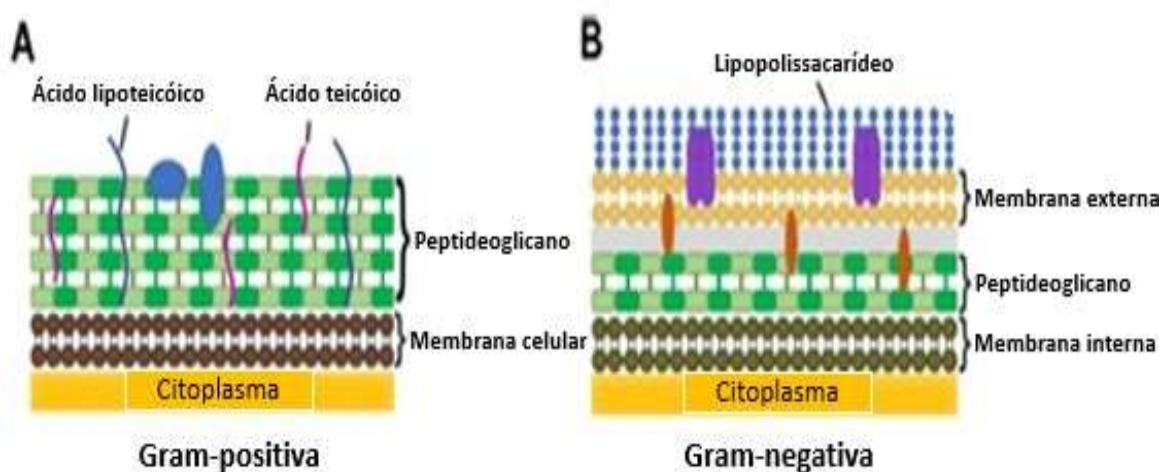
Fonte: Souza T.H.S. *et al.* (2021a)

3.2.4.1.2 Aplicação de zinco-porfirinas na inativação fotodinâmica

Embora ainda não totalmente elucidado, o mecanismo de interação do FS com barreiras celulares externas e absorção parece ocorrer através de uma combinação de atração eletrostática e interações hidrofóbicas. Em alguns casos, como em bactérias, existem fatores adicionais. FSs aniônicos são conhecidos por ter atividade contra bactérias gram-positivas, mas não contra gram-negativas. A explicação para esses fenômenos está associada à diferença de composição da superfície celular entre os dois tipos de bactérias. Bactérias gram-positivas têm superfícies celulares compostas por espessas camadas de peptidoglicano com a presença de ácidos lipoteicóicos e teicóicos dispostos ao longo dessas camadas (Fig. 7A), tornando porosidade que facilita a internalização de FS na célula. Por sua vez, a membrana externa de bactérias gram-negativas contém lipopolissacarídeos (LPS) e ácido siálico (Fig. 7B), resultando em uma superfície de caráter mais aniônico do que em bactérias Gram-positivas e, consequentemente, de repulsão eletrostática significativa para FSs aniônicos (Ezzedine *et al.*, 2013; Souza T.H.S *et al.*, 2021a).

Merchat *et al.* (1996) observaram em um estudo comparativo que porfirinas catiônicas inibiram o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Por outro lado, porfirinas aniônicas inibiram apenas bactérias gram-positivas. Em geral, a superfície das células é carregada negativamente, o que implicaria em uma maior absorção celular de FSs catiônicos.

Figura 7: Representação das diferentes composições das bactérias: (a) gram-positiva (b) gram-negativa.



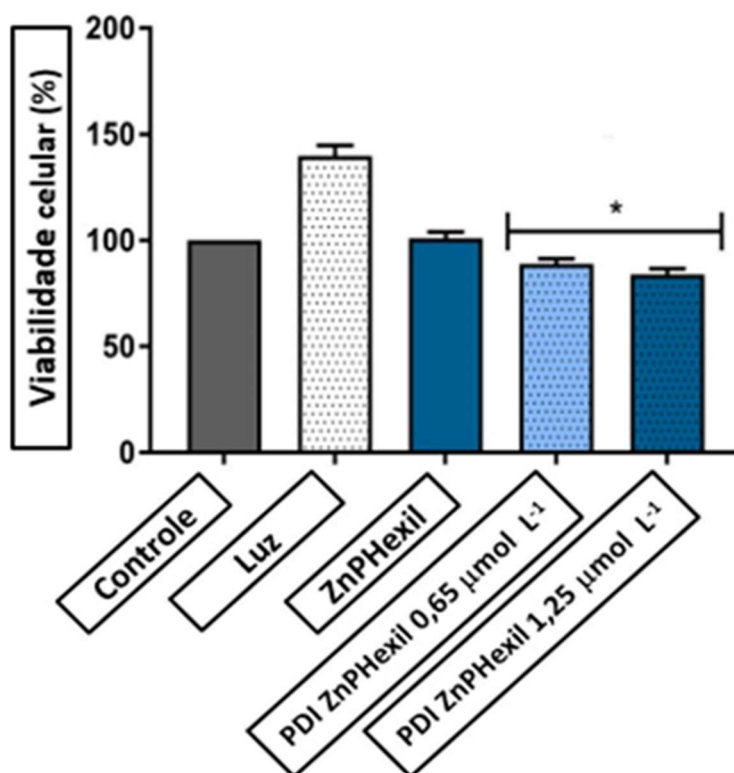
Fonte: adaptado Souza T.H.S *et al.* (2021a).

Uma caracterização mais completa da fotofísica e fotoquímica de ZnP_s é certamente necessária para desenvolver FSs aprimorados para aPDI e maior entendimento sobre os aspectos mecanicistas do FS e suas ações em sistemas biológicos. As vias do tipo I com ZnP_s como FSs são fotoquimicamente complexas e muito trabalho ainda é necessário para desvendar completamente as nuances que correspondem a reações de transferência de elétrons em uma base molecular. É importante notar também que a eficiência biológica do FS depende não apenas na capacidade do ZnP de fotogerar ¹O₂ ou outros tipos de EROs, mas também na captação celular efetiva, distribuição subcelular e interação com os sistemas biológicos, o que pode ser alcançado através da modulação da lipofilicidade e da carga iônica da porfirimina (Bristown *et al.*, 2006; Ezzedine *et al.*, 2013).

3.2.4.1.3 Citotoxicidade da ZnPHexil

No ensaio de Souza T.H.S *et al.* (2021a), o teste de citotoxicidade com células de mamíferos foi realizado com macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs), a ZnPHexil foi aplicada nas concentrações de 0,65 e 1,25 µmol L⁻¹ através do método MTT. A irradiação foi de 3,4 J/cm². Os resultados do ensaio podem ser observados na Figura 8.

Figura 8: Teste de citotoxicidade da ZnPHexil através da viabilidade de macrófagos pelo ensaio MTT. Controle: células não tratadas; Luz: 3,4 J/cm²; ZnPHexil: 1,25 µmol L⁻¹ no escuro; PDI: Luz+ ZnPHexil 0,65 µmol L⁻¹; PDI: Luz+ ZnPHexil 1,25 µmol L⁻¹. (n=3; *P<0.05)



Fonte: Souza T.H.S *et al.* (2021a).

Mediante os resultados (Figura 8), pode ser observado que as amostras irradiadas apenas com luz apresentaram uma resposta aumentada em comparação com o controle. Já é conhecido que a irradiação com luz azul pode exercer efeitos reguladores sobre a atividade mitocondrial, a proliferação e a diferenciação de certos tipos de células de mamíferos. Com bactérias a luz azul pode aumentar, mas também inibir ou não variar o crescimento dependendo do tipo de bactérias e dos fatores fotodinâmicos aplicados (Peçanha, Ferreira ; Diniz, 2018). No estudo, quando as amostras com o FS foram tratadas fotodinamicamente nas concentrações de 0,65 e 1,25 µmol L⁻¹ apresentaram viabilidade superior a 80%, o que estatisticamente não se demonstrou relevante para indicativo de citotoxicidade. O que pode justificar a ZnPHexil ter atividade fotodinâmica em microrganismos e não ter em células de mamíferos é o fato de que os MO apresentam maior sensibilidade ao estresse oxidativo. As células de mamíferos possuem sistemas antioxidantes mais eficientes e uma composição celular de maior complexidade (Sebastian *et al.*, 2020).

No mesmo estudo de Souza, foi testada a concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, os dados não foram expostos no gráfico pelo autor, mas foi apresentado que ocorreu menor viabilidade celular (60%) nessa concentração. É importante evidenciar que no estudo de Souza não foi observada citotoxicidade no escuro para ZnPHexil na concentração de $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$. No ensaio realizado por Thomas *et al.* (2015) através do método MTT com testes de inativação para *E.coli* foi observado que a ZnPHexil na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ só apresentou atividade na presença de luz. Porém na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi observada significativa toxicidade no escuro com viabilidade celular reduzida ($75,46 \pm 8,9\%$). No estudo de Alenezi *et al.* (2017) com cepa de *E.coli* também não ocorreu toxicidade no escuro na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ não apresentou relevância em sua toxicidade ($> 80\%$). Diante da necessidade de se explorar a atividade fotodinâmica, de acordo com as variações de concentrações do FS e com segurança citotóxica, o presente estudo preconizou comparar os resultados de inativação das soluções e hidrogéis de ZnPHexil em duas concentrações, 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, justamente para avaliar a eficiência da atividade fotodinâmica em cepas de *S. aureus* resistentes com diferentes concentrações do FS.

3.3 Aplicação tópica de fotossensibilizadores

A aplicação dos FS em aPDI para uso tópico em sua grande maioria, vem sendo feita através de preparações em soluções. Sabe-se que a via de administração pode interferir de maneira direta na duração e extensão da ação terapêutica, por conta da distribuição do fármaco no organismo. Administrar o FS diretamente no local de ação desejado aumenta a probabilidade de eficácia fotodinâmica e redução da dose necessária para obtenção do efeito, além de atenuar a toxicidade do ativo. A economia no uso de zinco-porfirinas é um fator relevante, visto que sua síntese possui um custo maior quando comparada a outros FS. Então, a escolha da via de administração mais adequada é essencial para favorecer a biodisponibilidade do ativo e a eficácia da aPDI (Santos, 2016).

A utilização de formas farmacêuticas semissólidas para incorporação do FS e aplicação tópica, se apresenta como uma alternativa de melhoria, pois pelo fato da formulação apresentar maior viscosidade o ativo permanece por mais tempo em contato com a mucosa cutânea infeccionada, o que pode favorecer maior ligação do

FS à parede celular bacteriana e dessa forma melhorar os efeitos fotodinâmicos do sistema. Entre as formas farmacêuticas semissólidas mais empregadas na formulação de produtos farmacêuticos se encontram pomadas, cremes, pastas e hidrogéis (Florence; Naorem, 2014; Junqueira *et al.*, 2016).

Os hidrogéis são compostos por uma parte dispersa, outra dispersante e por agentes gelificantes apropriados. São amplamente utilizados para veicular ativos, porém ainda existem poucos estudos com seu uso na veiculação de FSs para aPDI. Os hidrogéis apresentam uma boa adsorção, mucoadesividade e são biocompatíveis. A formação do gel e aumento de viscosidade ocorrem por essas formulações possuírem na sua composição polímeros hidrofílicos tridimensionais, que são compostos por unidades de repetição denominadas monômeros, ligadas entre si através de ligações covalentes. Estes polímeros possuem uma grande capacidade de absorver grandes quantidades de água e aumentar seus espaços intersticiais por intumescimento (Peterle, 2017; Liang Hui *et al.*, 2017).

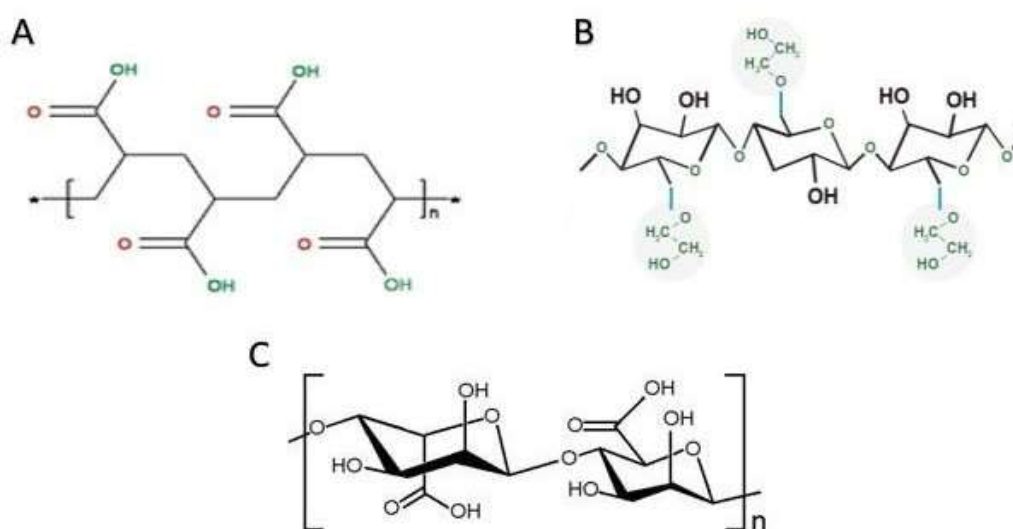
Os polímeros podem ser de origem sintética e natural e são utilizados desde a confecção de materiais à produção de matrizes farmacêuticas. Diferentemente das moléculas pequenas, onde o interesse está principalmente associado às suas propriedades químicas, as macromoléculas são importantes, especialmente por suas propriedades físicas (Kamaly *et al.*, 2010). No presente estudo são utilizados dois polímeros sintéticos carbopol 940® e a hidroxietilcelulose (HEC), além do alginato de sódio, de origem natural. Na figura 9 está demonstrada a estrutura molecular dos polímeros selecionados para o estudo.

A Figura 9(A) corresponde a um polímero composto de ácido acrílico de alta massa molecular, comercialmente conhecido como Carbopol 940® e muito utilizado em formulações cosméticas. Uma de suas características é a formação de hidrogéis de caráter catiônico, alta viscosidade e estabilidade térmica em baixas concentrações. Sua transparência é atingida com pH próximo de 7 (Yamane, 2016; Monteiro, Tavares, Vasconcelos, 2020).

A Figura 9(B) mostra a estrutura molecular da hidroxietilcelulose (HEC®) formada por grupos hidroxietila que advém de uma reação entre a celulose e óxido de etileno. É um polímero não iônico, de baixa toxicidade, biocompatível e razoavelmente solúvel em água. Possui boa transparência e boa viscosidade sendo muito aplicado em produtos farmacêuticos, principalmente em cosméticos (Yamane, 2016; Monteiro, Tavares, Vasconcelos, 2020).

Na Figura 9(C) pode ser observada a estrutura molecular do alginato, substância existente na cápsula celular de algumas bactérias e na parede celular de algas marinhas marrons. Caracteriza-se como um polímero natural, biocompatível e com baixa toxicidade. Possui capacidade de formar matrizes inertes e biodegradabilidade sob funções fisiológicas e por isso tem sido muito empregado na área biomédica (Cacuro; Waldman, 2018).

Figura 9: Estrutura molecular dos polímeros: (A) carbopol 940®; (B) hidroxietilcelulose e (C) alginato.



Fonte: (A) <https://openi.nlm.nih.gov/>; (B) <https://xn--portugus-q1a.michemcel.com/productos/hechidroxietilcelulose/>; (C) https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Estrutura-do-alginato-de-sodio_fig1_328351811.

Além disso, podem ser usados excipientes na formulação de hidrogéis poliméricos para melhorar aspectos como permeação, penetração e absorção dos ativos na pele, de acordo com a necessidade do alvo terapêutico. No presente estudo foram utilizados propilenoglicol e ureia como agentes de umectação. O propilenoglicol é um composto orgânico de álcool diol usado em vários tipos de produtos da indústria dermatológica. É um fluido viscoso, incolor, inodoro e miscível em água que ajuda outros ingredientes a serem absorvidos pela pele. Enquanto que a ureia é uma substância química orgânica que pode ser produzida naturalmente no corpo humano ou sintetizada, possui diversas aplicações em formulações tópicas e dependendo de sua concentração na formulação pode ser aplicada como agente hidratante, queratolítico ou agente umectante (Prestes *et al.*, 2009).

Gonzalez-Delgado *et al.* (2016) testou gel de carbopol com nanopartículas de PLGA com incorporação da porfirina ZnPMetil e observou que apesar de obter uma formulação estável, foi necessário 4h30min para liberação da porfirina dos sistemas desenvolvidos. Na revisão de Gnanasekar *et al.* (2023) são relatados materiais poliméricos que foram projetados para aplicação em aPDI, onde géis de quitosana acoplados a ciclodextrina com incorporação de rosa de bengala e nanopartículas de sulfeto de cobre utilizando PVA apresentaram boa efetividade fotodinâmica. Neste sentido os hidrogéis propostos no presente trabalho, apesar de serem formulações mais simples, possuem vantagens por possuírem preservação da transparência, porosidade através da escolha adequada do polímero e boa estabilidade durante armazenamento.

Além disso, apresentam fácil obtenção, baixo custo quando comparados a outras formas farmacêuticas (Dehne; Hecht; Bausch, 2017), sendo desta forma uma formulação com grande potencial para facilitar a aplicação da aPDI no Sistema Único de Saúde (SUS), que teve a incorporação da terapia fotodinâmica em suas opções de tratamentos disponíveis em setembro de 2023, através da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec) para o tratamento de pacientes com câncer de pele do tipo basocelular superficial e nodular, através do uso do cloridrato de aminolevulinato de metila (metil-ALA) sob a forma de creme a 16% (Brasil, 2023).

Estudos desenvolvidos pelo grupo (Araújo, 2021) em que foram testados géis de hidroxietilcelulose (0,5%), com azul de metileno ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), onde ocorreu total inativação de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* associados à mastite nos tempos de 6 e 3 minutos, respectivamente. Santos, (2016) realizou o desenvolvimento e caracterização óptica de géis de carbopol com incorporação de ZnPEtil onde foi observado aumento de 6% na produção de EROs com a incorporação do FS na matriz polimérica, porém não foram realizados testes *in vitro* de inativação para maior avaliação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

A pesquisa desenvolvida tem caráter experimental, qualitativo e quantitativo. Inicialmente foi selecionado a ZnP e os parâmetros fotodinâmicos com maior efetividade para a aplicação desejada em solução com aplicação em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* isolada da mastite bubalina e em seguida foram desenvolvidos os hidrogéis com incorporação do ZnPHexil e associação com agentes de umectação para a escolha das formulações com melhores perfis para os testes *in vitro* com cepas multirresistentes de *S. aureus* MRSA.

4.2 Locais do estudo

Os experimentos foram realizados nos laboratórios: LINSO (Laboratório de Interfaces, Nanomateriais e Sistemas Coloidais) e no LAM (Laboratório de Análises Microbiológicas) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, na UFPEDA (Departamento de Antibióticos), no LOB (Laboratório de Óptica Biomédica) da Universidade Federal de Pernambuco e no LABTECBI (Laboratório de Tecnologia de Bioativos) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4.3 Materiais utilizados

Os materiais e compostos utilizados nos experimentos e preparo dos hidrogéis estão descritos na Tabela 1. Nas soluções e formulações quando necessário foi utilizado água destilada e tampão fosfato pH 7,2.

Tabela 1: Compostos e materiais utilizados no presente estudo.

Composto/ Material	Marca
Carbopol 940®	Codossal Química
Alginato de sódio	Dinâmica química contemporânea LTDA
Hidroxietil celulose - HEC®	Codossal Química
Trietanolamina	Codossal Química
N,n-dimetil-4-nitrosoanilina - RNO	Sigma-Aldrich
L- histidina	Sigma-Aldrich
Mueller hinton - MH	HIMEDIA

Brain heart infusion broth - BHI	HIMEDIA
Agar	HIMEDIA
Propilenoglicol	NEON
Ureia	Dinâmica química contemporânea LTDA

Fonte: própria autora.

4.4 Etapas do estudo

4.4.1 Síntese dos fotossensibilizadores

Duas zinco-porfirinas foram utilizadas como fotossensibilizadoras nos testes iniciais da pesquisa: ZnTE-2-PyP⁴⁺ (ZnPEtil) e ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (ZnPHexil) (BENOV *et al.*, 2015). Ambas foram sintetizadas e purificadas através da colaboração com o Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças, do departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Porém, após testes iniciais apenas a ZnPHexil fez parte da continuidade do estudo por ter demonstrado melhores resultados para a aplicação desejada.

Para a síntese da ZnPEtil realizou-se etilação da Zn-tetrakis(2-piridil) porfirina (ZnT-2-PyP) (Rebouças, Carvalho e Idemori, 2002) usando uma adaptação de procedimentos da literatura (Tovmasyan *et al.*, 2013). O ZnT-2-PyP e o etiltosilato foram dissolvidos em N, N-dimetilformamida (DMF) e aquecido por 110° sob agitação magnética por 24 horas. A reação de etilação foi monitorada por cromatografia de camada delgada (CCD) e espectroscopia de absorção eletrônica e de emissão como reportado por porfirinas análogas (Rebouças, Spasojevic e Batinic, 2008). O produto final foi purificado conforme descrito por Ezzeddine *et al.* (2013). A caracterização espectroscópica foi realizada a partir de dados reportados no estudo de Benov *et al.* (2002).

Para a obtenção da ZnPHexil, inicialmente sua respectiva precursora H₂T-2-PyP foi preparada através da condensação de pirrol e de 2-piridinacarboxaldeído em ácido acético (solvente/catalisador) a 100 °C, utilizando uma adaptação do método de Adler *et al.* (1964) e purificada segundo um procedimento descrito por Hambright *et al.* (1985). A H₂T-2-PyP foi alquilada com *n*-HexOTs (Batinić-Haberle *et al.*, 2002). Em seguida, a porfirina tetracatiônica resultante H₂TnHex-2-PyPCL₄ foi submetida à metalação Zn (AcO)₂.2H₂O em meio aquoso

básico pH $\sim$ 12, de acordo com adaptação da literatura (Benov *et al.*, 2002). O rendimento global foi de 85 %. A ZnPHexil apresentou características cromatográficas e espectrais idênticas às aquelas descritas na literatura (Ezzeddine *et al.*, 2013).

4.4.2 Desenvolvimento dos hidrogéis

Para o preparo dos hidrogéis, foram utilizados três polímeros que tiveram a ZnPHexil incorporada: carbopol® 940 (CBP), hidroxietilcelulose (HEC) e alginato de sódio (ALG), para que entre eles fosse selecionado o que mais se adequasse na interação com a porfirina e com a técnica aPDI. O preparo da formulação foi baseado na metodologia descrita por Melo, Domingues ; Lima (2018), com adaptações. Os componentes das formulações para escolha do polímero estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Componentes dos hidrogéis desenvolvidos com incorporação da ZnPHexil testada no estudo.

Hidrogel	Composição
Carbopol ® 940	Polímero 0,5% Trietanolamina qs PBS qsp 100%
Hidroxietilcelulose	Polímero 1% PBS qsp 100%
Alginato de sódio	Polímero 3% PBS qsp 100%

Fonte: bases poliméricas adaptadas de Melo, Domingues; Lima (2018).

Inicialmente os polímeros foram pesados conforme a concentração desejada (CBP 0,5%; HEC 1%; ALG 3%) e veiculados na solução do FS, que foi preparada através da solubilização em tampão fosfato salino (PBS), ou ainda para as amostras placebo apenas veiculadas em PBS, na finalização as amostras foram agitadas em agitador magnético por 30 min até o aumento da viscosidade e a formação de um sistema gelificado com homogeneidade e sem bolhas de ar ou material disperso. Para correção de pH, no caso do gel de carbopol, a trietanolamina foi utilizada até alcançar pH 6,5.

A concentração final do FS nos hidrogéis produzidos foi de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os testes que utilizam de diluição, sendo a concentração para análise final e dos testes *in vitro* de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As formulações foram envasadas em recipiente de prolipropileno, protegido de luz e armazenadas à temperatura ambiente ($T = 25^\circ\text{C}$). As amostras

foram preparadas no dia anterior das análises para garantia de estabilidade. Após análises organolépticas e espectroscópicas iniciais, o hidrogel de HEC foi selecionado, e adicionado na formulação base excipientes para melhoria da forma farmacêutica. Foram utilizados o propilenoglicol (5%) e a ureia (10%) em concentrações indicadas como agentes umectantes, para assim ser selecionada a formulação que apresentou melhor perfil para os testes *in vitro*. Foram produzidas 8 formulações, denominadas de G1 a G8, sendo que cada lote de bancada apresentou 50 g de hidrogel com a variação de composição descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Componentes dos hidrogéis desenvolvidos com hidroxietilcelulose e incorporação da ZnPHexil com adição de agentes umectantes.

Hidrogel	Composição
G1	Hidroxietilcelulose 1% PBS qsp 100%
G2	Hidroxietilcelulose 1% ZnPHexil 10^{-6} mol L ⁻¹ PBS qsp 100%
G3	Hidroxietilcelulose 1% Propilenoglicol 5% PBS qsp 100%
G4	Hidroxietilcelulose 1% ZnPHexil 10^{-6} mol L ⁻¹ Propilenoglicol 5% PBS qsp 100%
G5	Hidroxietilcelulose 1% Ureia 10% PBS qsp 100%
G6	Hidroxietilcelulose 1% ZnPHexil 10^{-6} mol L ⁻¹ Ureia 10% PBS qsp 100%
G7	Hidroxietilcelulose 1% Propilenoglicol 5% Ureia 10% PBS qsp 100%
G8	Hidroxietilcelulose 1% ZnPHexil 10^{-6} mol L ⁻¹ Propilenoglicol 5% Ureia 10% PBS qsp 100%

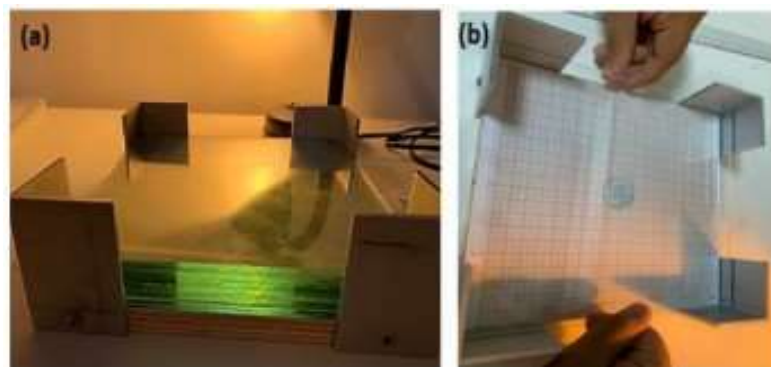
Fonte: própria autora.

4.4.3 Caracterização físico-química dos hidrogéis

4.4.3.1 Determinação de pH e espalhabilidade

Para a caracterização físico-química foram verificados o pH e a espalhabilidade das amostras. O pH foi estimado através do uso de fitas com imersão nas amostras e a espalhabilidade através de adaptações feitas por Araujo (2021) em método proposto por Knorst (1991). Neste experimento o sistema semissólido é aplicado em placas de vidro e é observado a deformação da área em função da massa adicionada sobre ele, até que não se observe mais deformação. A Figura 10 mostra o dispositivo utilizado para tal medida experimental.

Figura 10: Método experimental de estimativa de espalhabilidade de um sistema semissólido: (a) suporte de madeira com alumínio forrado com papel milimetrado; (b) placa de vidro.



Fonte: Baseado em Knorst (1991) ; Araujo (2021).

Utilizando-se os dados de deformação esquematizados na Figura 10, a espalhabilidade pode ser estimada através da Equação 1.

$$Ei = (d^2 \times \pi) / 4 \quad (1)$$

onde

Ei = espalhabilidade da amostra para peso i

(mm^2) d = diâmetro médio (mm)

$\pi = 3,14$

4.4.3.2 Teste de centrifugação

Para avaliação da estabilidade coloidal do gel foi realizado o teste de centrifugação (Centrífuga CENCE-TD3) com 10 g dos 8 tipos de hidrogéis

desenvolvidos no estudo, G1 a G8, foram testadas tanto as amostras com ZnPHexil e agentes umectantes quanto as formulações sem agente FS (placebo). As amostras foram submetidas a uma rotação de 3000 rpm por 30 min acondicionadas em tubos Falcon 15 mL (ANVISA, 2004). Os resultados macroscópicos foram analisados através de observação visual para confirmação de estabilidade das formulações propostas ou detecção de possíveis instabilidades, como separação de fase ou sedimentação.

4.4.4 Caracterização óptica das zinco-porfirinas e hidrogéis desenvolvidos

Amostras das zincoporfirinas em solução e após seleção da utilizada no estudo incorporada nos géis poliméricos desenvolvidos ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram caracterizadas opticamente através dos espectros de emissão e excitação realizados em espectrofluorímetro da marca PerkinElmer modelo LS55, e dos espectros de absorção eletrônica no UV-Vis realizados em espectrofotômetro modelo *Evolution 600 UV-vis*, fabricante Thermo scientific, utilizando o Software – visionpro. As soluções e formulações contendo ZnP foram excitadas no comprimento de onda de 427 nm, enquanto que as análises de absorção foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 350 a 700 nm (Ezzeddine *et al.*, 2013).

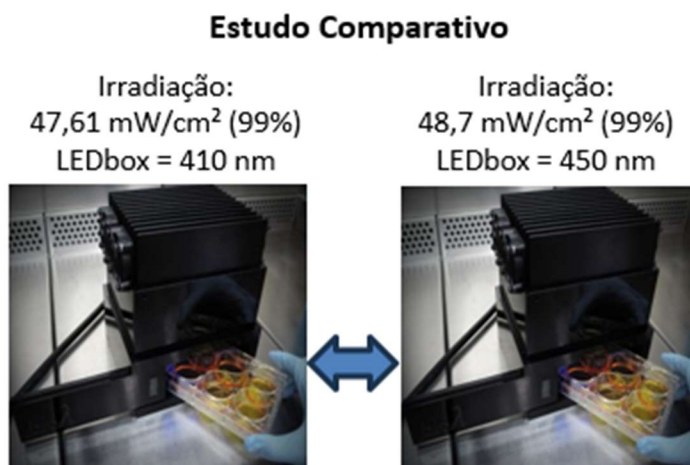
4.4.5 Detecção indireta de EROs por método RNO/ L-histidina

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelas ZnPs estudadas e formulações desenvolvidas, realizou-se a determinação indireta de ROS. Para este ensaio foi utilizado como reagentes N, N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e L-histidina (Toffoli, 2008), ambos da Sigma Aldrich®. Para a realização dessa técnica em uma cubeta foi inserido 1 mL de cada um dos componentes na seguinte ordem: Solução ou gel com ZnP ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$), L-histidina ($45 \mu\text{mol L}^{-1}$), RNO ($39 \mu\text{mol L}^{-1}$), após serem diluídas e homogeneizadas, os componentes passam a apresentar as seguintes concentrações no volume total, 5; 15 e 13 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. As amostras em solução e na formulação de gel contendo ZnP foram irradiadas através de LED azul (Blackbox Smart, acoplado com LEDbox $\lambda = 410 \text{ nm}$ e Light Chamber, BioLambda®) com irradiância de 47,61 mW/cm².

Para comparativo na Etapa 2 do estudo os hidrogéis desenvolvidos também foram irradiados utilizando o LEDbox com emissão em comprimento de onda $\lambda = 450$

nm e com potência de 48,7 mW/cm² para avaliação se ambos poderiam ser utilizados nas etapas do estudo sem grandes modificações nos resultados, como demonstrado na Figura 11. Porém após verificar diferenças significativas nos testes na geração de EROs, o LEDbox com emissão em $\lambda = 410$ nm foi selecionado como o mais apropriado para todas as avaliações subsequentes. Os espectros de absorção foram verificados na faixa de 350 a 700 nm. Foram realizadas 8 medidas nos tempos de irradiação adotados para exposição das amostras (0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 s), totalizando 3 min.

Figura 11: Parâmetros de aplicação dos LEDbox azuis ($\lambda = 410$ nm/ $\lambda = 450$ nm) utilizados no estudo comparativo de geração indireta de espécies reativas de oxigênio pelo método RNO. *Leitura da absorbância do RNO a $\lambda = 460$ nm. Tempos de irradiação: 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 s.



Fonte: própria autora.

Foi verificada a absorção em comprimentos de onda diferentes para o RNO, visto que a absorbância da ZnP também é próxima a essa faixa, foram verificadas em 440, 450 e 460 nm para evitar interações entre a ZnP e o RNO e desta forma o comprimento de onda de 460 nm foi selecionado para avaliação por ser uma região de menor sobreposição. Para as leituras iniciais de ZnP e hidrogéis foi utilizado um espectrofotômetro modelo *Evolution 600 UV-vis* (Thermo scientific - Software – visionpro) e para os testes com hidrogéis de HEC1% e o comparativo de comprimentos de onda de emissão do LEDbox foi utilizado o Spectrostar Nano (BMG, Labtech).

4.4.6 Desenvolvimento de método de inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* utilizando zinco-porfirinas como fotossensibilizador formuladas ou não em hidrogéis

4.4.6.1 Teste inicial por leitura de microplaca com resazurina para escolha da zinco-porfirina do estudo

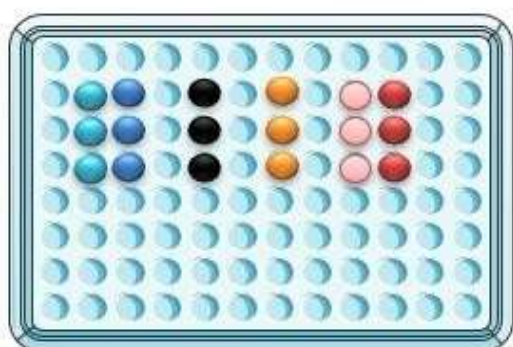
Um teste inicial microbiológico foi realizado com a cepa resistente de *Staphylococcus aureus* isolada de um caso de mastite bubalina (Medeiros *et al.*, 2011) cedida pelo laboratório LABTECBI da UFRPE. No ensaio foram testadas a ZnPETil e ZnPHexil, para avaliação de eficiência e escolha da melhor candidata para continuidade do estudo. Para determinação da eficiência da inativação fotodinâmica foi utilizada a leitura de microplaca através da resazurina, com adaptações do estudo de Cabral Filho *et al.* (2018). A reativação ocorreu em meio caldo nutriente utilizando estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h, com preparo de uma suspensão direta em solução de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) ajustada para concentração final de 10^8 UFC/mL utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda em 595 nm, de acordo com a CLSI (2016). O inóculo foi diluído a uma concentração de 10^5 UFC/mL, utilizando PBS. A ZnPETil e ZnPHexil foram testadas nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com irradiação de 1 min ou sem irradiação. Todas as amostras foram testadas em triplicata. As placas foram divididas em Placa 1 (sem irradiação ou controle) e Placa 2 (irradiação de 1 min), com as amostras distribuídas como demonstrado na Figura 12:

MO (10 μL) + MC (90 μL) + FS 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (100 μL)

MO (10 μL) + MC (190 μL)

MC (190 μL) *MO = microrganismo ; MC = meio de cultura ; FS = fotossensibilizador

Figura 12: Distribuição das amostras na placa de 96 poços para inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* isolado da mastite, para escolha entre ZnPETil e ZnPHexil como fotossensibilizador do estudo.



Legenda:

- ZnPETil 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ●
- ZnPETil 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ●
- ZnPHexil 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ●
- ZnPHexil 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ●
- MO ●
- MC ●

Fonte: própria autora.

Após a distribuição das amostras o tempo de pré-irradiação foi de 10 minutos, em shaker (50 rpm). Na sequência a placa 2 foi irradiada com LED azul (Blackbox Smart, acoplado com LEDbox $\lambda = 410$ nm e Light Chamber, BioLambda®) por 1min e com irradiância de 47,61 mW/cm², essa sequência foi utilizada em todos os ensaios posteriores, e por fim ambas foram incubadas em estufa (37°C) por 24h. Após a incubação foi adicionado resazurina (0,01%) nas amostras e feita leitura antes e após 45 min para cálculo da viabilidade celular relativa (%) seguindo a Equação 2:

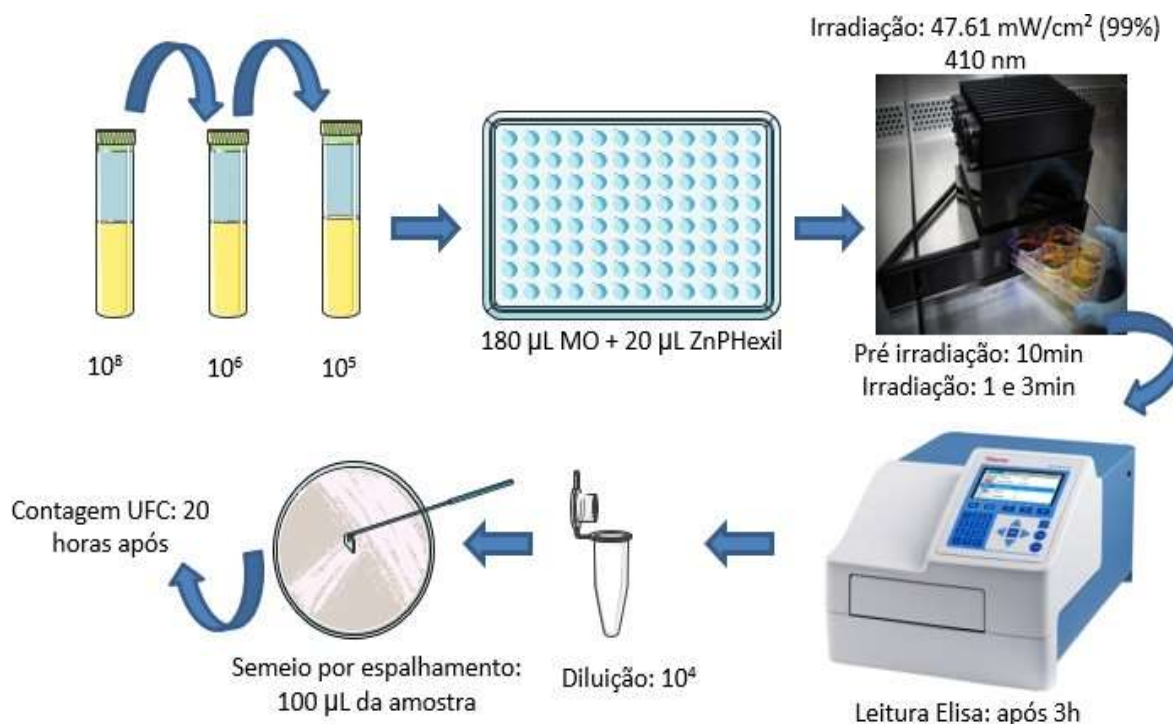
$$\text{Viabilidade celular relativa (\%)} = \frac{(A_{562 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) \text{ de amostras irradiadas}}{(A_{562 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) \text{ de amostras controle}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Fonte: adaptado de Cabral Filho (2018).

4.4.6.2 Determinação de método com amostras em solução para avaliação do estudo: leitura de microplaca por espectrofotometria versus contagem de unidades formadoras de colônias

Após o teste citado anteriormente a ZnPHexil foi selecionada e a partir disso, os resultados da leitura de microplaca por espectrofotometria (leitor Elisa) foram comparados à contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), para maior confiabilidade na avaliação da inativação fotodinâmica das formulações propostas. Os testes foram realizados com as mesmas concentrações da ZnPHexil (1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) utilizadas anteriormente, porém apenas com as amostras em soluções e com ajustes na metodologia para melhor reprodutibilidade. As alterações realizadas foram o volume das amostras, agora de MO (180 μL) + FS (20 μL). A irradiação das amostras foi realizada em 1 e 3 min e a leitura de microplaca por espectrofotometria foi feita (após 3h dos tratamentos) para comparativo com a contagem do número de UFC (após 20h dos tratamentos). A contagem de UFC foi realizada a partir de uma segunda diluição, para uma concentração final de 10⁴ UFC/mL, e então, 100 μL foi adicionado a uma placa de petri contendo ágar Mueller Hinton, sendo plaqueada utilizando uma alça em L estéril. As placas foram colocadas em incubação (37°C) durante 24h. Os testes foram realizados novamente com *S. aureus* resistente isolada da mastite, porém também com a cepa *S. Aureus* ATCC (20PE). A sequência experimental com as descritas modificações está representada na Figura 13.

Figura 13: Sequência do experimento de inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite e ATCC, para comparativo da reprodutibilidade da leitura de microplaca por espectrofotometria *versus* contagem de unidades formadoras de colônia.



Fonte: própria autora.

Após o método mais eficiente de inativação fotodinâmica ter sido definido, os testes foram realizados com as soluções e hidrogéis desenvolvidos no estudo e utilizando cepa de origem clínica *S. aureus* com fenótipo de resistência MRSA comprovado, oriundo de infecção humana.

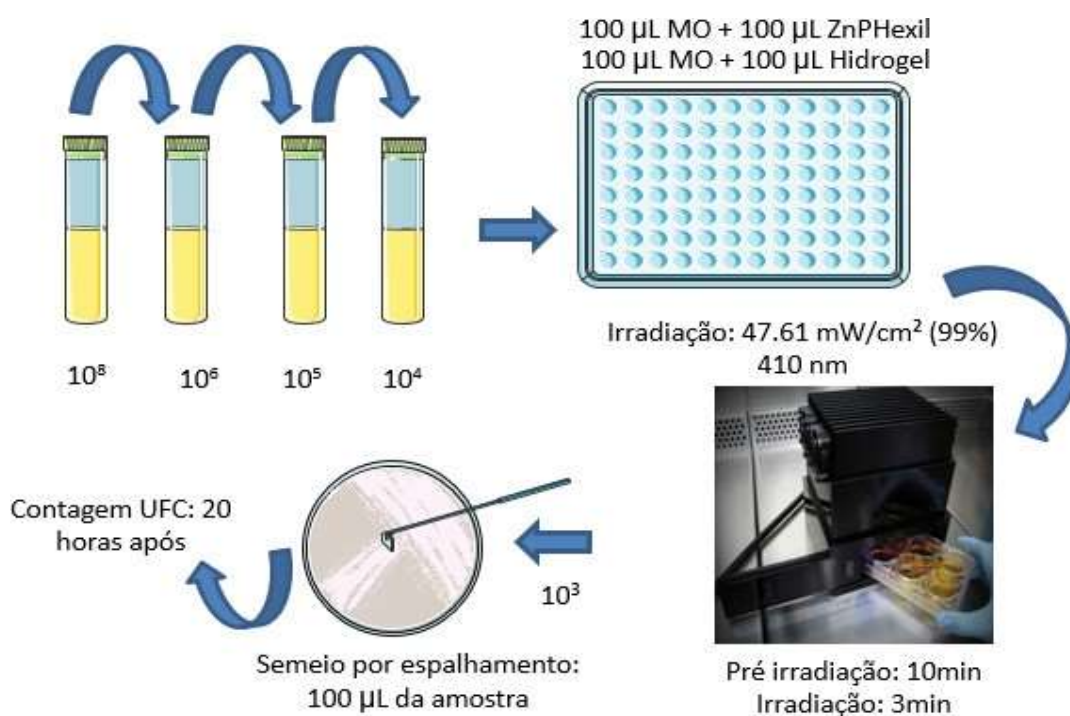
4.4.6.3 Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* MRSA utilizando hidrogéis com ZnPHexil como fotossensibilizador

Para finalização dos ensaios as formulações de hidrogéis com ZnPHexil incorporadas, que foram selecionadas no estudo físico-químico e óptico com melhores perfis para inativação fotodinâmica foram testadas com as cepas isoladas de humanos *S. aureus* ATCC 29213 e a *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA01), ambas cedidas pelo HC/UFPE. Para o ensaio novas alterações foram realizadas: o volume das amostras, agora de MO (100 µL) + FS (100 µL), para que fosse utilizada menor quantidade de ZnPHexil nas formulações dos hidrogéis utilizados no teste. O tempo de irradiação selecionada foi de 3 min, para que houvesse maior tempo de ação

na rede polimérica e a avaliação da inativação foi realizada apenas por contagem do número de UFC (após 20h dos tratamentos) que foi selecionado como o método com maior confiabilidade para o estudo.

A contagem de UFC nesta etapa foi realizada para uma concentração final de 10^3 UFC/mL, e então, 100 μ L foi adicionado a uma placa de petri contendo ágar Mueller Hinton, sendo plaqueada utilizando uma alça em L estéril. As placas foram colocadas em incubação (37°C) durante 24h. A sequência experimental com as descritas modificações está representada abaixo na Figura 14.

Figura 14: Sequência do experimento de inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e ATCC, utilizando soluções e hidrogéis com ZnPHexil como fotossensibilizador e contagem de unidades formadoras de colônia para avaliação dos resultados.



Fonte: própria autora.

4.4.6.4 Análise estatística

A análise dos resultados de viabilidade celular dos testes de inativação fotodinâmica foram realizados utilizando GraphPad Prism 10.2. Os dados obtidos em UFC.mL⁻¹ foram expressos em Log10 usando o método proposto por Jeff *et al.* (1997). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA *one way*) com valor de *p* menor que 0,05.

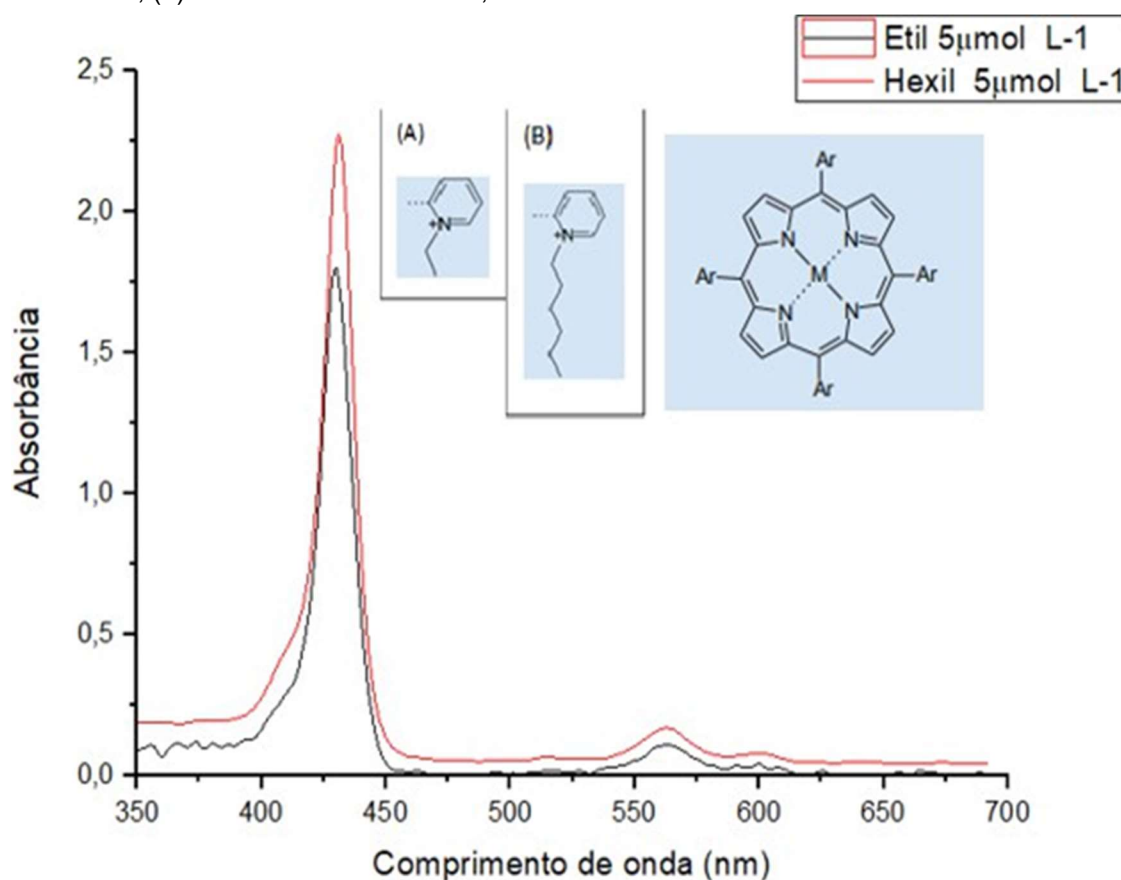
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção da zinco-porfirina do estudo

5.1.1 Caracterização físico-química

Inicialmente foi realizada uma comparação fotodinâmica entre as zinco-porfirinas, a ZnPEtil já testada pelo grupo para inativação de *S. aureus* ATCC (Viana *et al.*, 2015; Santos, 2016) e a ZnPHexil que foi recentemente utilizada para erradicação de *Leishmania amazonensis* na forma promastigota (Souza T.H.S *et al.*, 2021b) e de *Candida albicans* (Souza *et al.*, 2022), porém ainda não havia sido testada para as cepas *S. aureus* resistentes utilizadas no presente estudo. Na Figura 15 estão apresentados os espectros de absorção óptica e a estrutura química base da ZnP com a demonstração da diferença entre seus análogos testados, sendo ZnPEtil (a) e ZnPHexil (b).

Figura 15: Espectros de absorção e diferença da estrutura química das ZnPs utilizadas no estudo. (a) radical ZnPEtil; (b) radical ZnPHexil. *M=Zn; Ar= radical



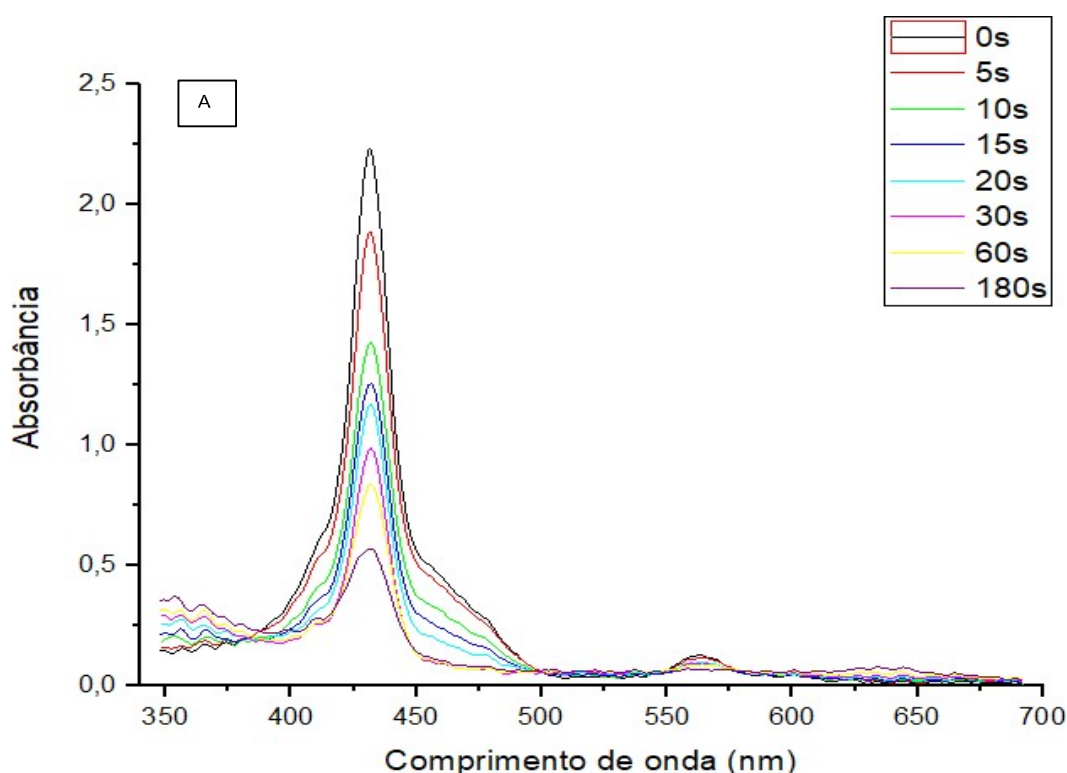
Fonte: espectros do estudo com estruturas químicas de Thomas *et al.* (2015).

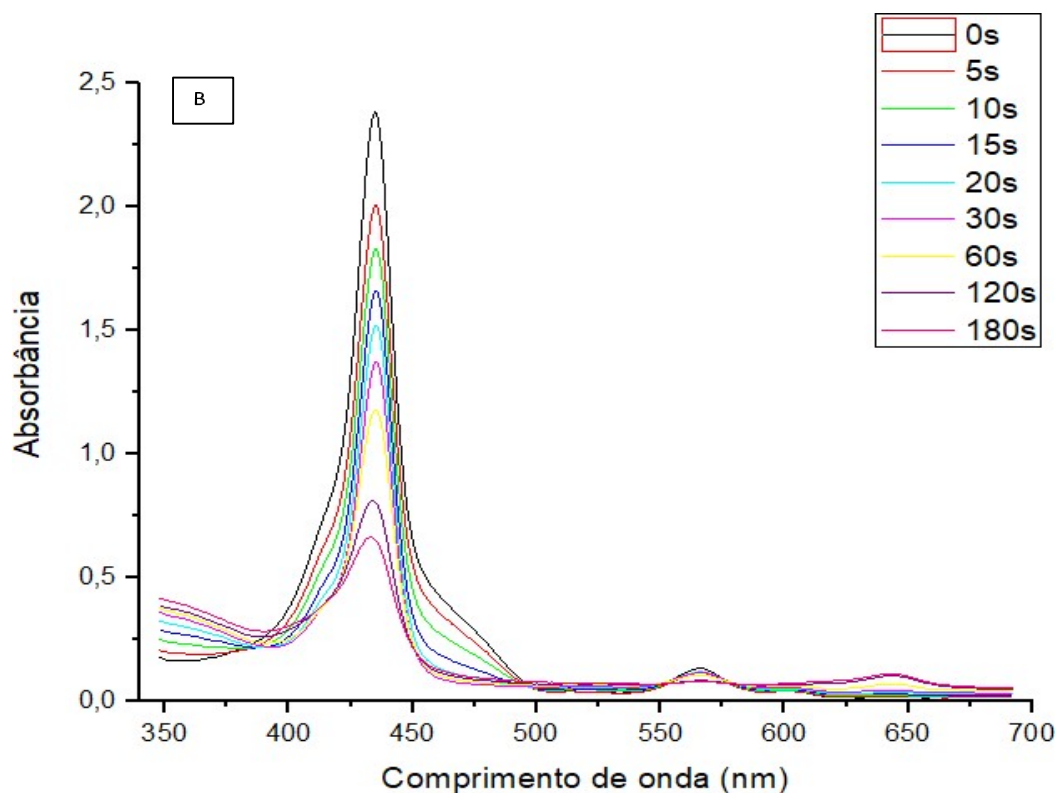
Como pode ser observado, o perfil espectral de absorbância das duas ZnP_s são muito semelhantes, como já era esperado, pela estrutura molecular de ambas. No entanto, já se foi estabelecido em estudos anteriores que a ZnP_{Hexil} tem maior lipofilicidade que a ZnP_{Etil}, o que se espera que levará a relativas mudanças na interação destes ativos com meio celular (Thomas *et al.*, 2015). Opticamente elas diferem discretamente com relação ao máximo de absorção do comprimento de onda da banda *Soret*, sendo de 425,5 nm para a ZnP_{Etil} e 427 nm para a ZnP_{Hexil}. Também já foi apresentado na literatura que ambas apresentam boa solubilidade em água e estabilidade quando conservadas à temperatura de 4°C e protegidas da luz (Souza T.H.S *et al.*, 2021a).

5.1.2 Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio por método RNO

Uma das formas de avaliar a eficácia de um fotossensibilizador na inativação fotodinâmica é a medida da geração de oxigênio singleto, superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (EROs). Os gráficos da Figura 16, apresentam alterações espectrais ocasionadas pela formação de EROs após a irradiação das amostras de zinco-porfirinas, detectadas indiretamente através da degradação de RNO utilizando para isso a L-histidina, de acordo com o método descrito na Seção 4.4.4.

Figura 16: Redução da absorbância do RNO em função da geração de espécies reativas de oxigênio por a) ZnP_{Etil} e b) ZnP_{Hexil} com irradiação LEDbox azul ($\lambda = 410 \text{ nm}$ / $47,61 \text{ mW/cm}^2$). $n=3$





Fonte: dados do estudo.

Como pode ser observado, as zinco-porfirinas avaliadas apresentaram produção de EROs muito semelhantes, 79,9% para ZnPEtil e 78,2% para ZnPHexil, o que pode ser confirmado com mais detalhes através dos dados expostos na Tabela 4.

Tabela 4: Comparação da leitura do espectro de absorção do método indireto RNO para quantificar as espécies reativas de oxigênio das zinco-porfirinas investigadas no estudo.

ZnP	Comprimento de onda (nm)	Absorbância (0s)	Absorbância (30s)	Degradação RNO
Etil	460	0,453	0,091	79,9%
Hexil	460	0,435	0,095	78,2%

Fonte: dados do estudo.

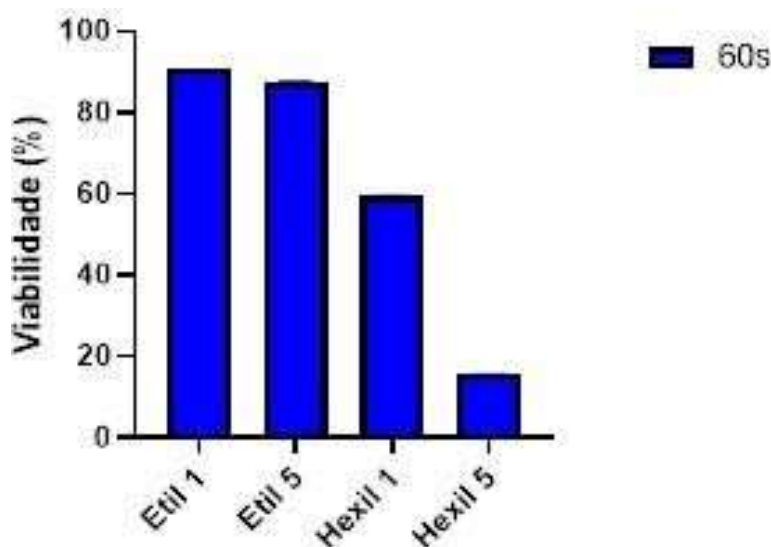
O mecanismo de degradação do RNO envolve a redução da absorbância deste composto em 440 nm, neste caso como ocorre sobreposição de banda com as amostras de ZnP, foi adotado o comprimento de onda de 460 nm para avaliação da

presença de EROs, especialmente de oxigênio singlete (Kraljic; Mohsni, 1986). Importante salientar que essa análise foi complementar para seleção da ZnP a ser utilizada nas próximas etapas do estudo, pois é conhecido que o teste com MO *in vitro* é primordial para avaliar a efetividade da inativação por envolver outros mecanismos de interação entre o MO e o FS (Souza T.H.S *et al.*, 2021a).

5.1.3 Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* de origem veterinária

A comparação da efetividade fotodinâmica das ZnPs para inativação de *S. aureus* isolada de um caso de mastite bubalina (método descrito na Seção 4.4.6) pode ser observada na Figura 17 através da viabilidade celular (%) após a exposição à luz (LEDbox azul $\lambda = 410$ nm) por um período de 1 min, com concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 17: Teste de viabilidade bacteriana da *Staphylococcus aureus* isolada de um caso de mastite bubalina irradiada por 1 min em contato com amostras dos fotossensibilizadores ZnPEtil e ZnPHexil com concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: dados do estudo.

Os resultados encontrados demonstraram que quando utilizada a ZnPEtil como FS não foi observada efetividade fotodinâmica significativa para inativação da *S. aureus* isolada da mastite, pois observou-se pouca diferença na viabilidade mesmo em duas concentrações, 91,8% (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 90,5% (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Porém, quando avaliados os resultados para ZnPHexil nas mesmas concentrações, mesmo sendo um método preliminar foi constatado resultados promissores, 59,5% (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 18,3% (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de viabilidade bacteriana.

Os dados aqui apresentados corroboram o estudo de Thomas *et al.* (2015) que testaram ambas ZnP_s para inativação de *Escherichia coli* (*E.coli*) e sugeriram que, apesar da produção de EROs ser semelhante entre elas, a maior lipofilicidade influenciou na efetividade fotodinâmica quando observado os testes *in vitro* com MO. De fato, espera-se que a lipofilicidade do FS melhore sua absorção e promova um acúmulo mais efetivo no invólucro celular que seu análogo mais hidrofílico, propiciando maior efetividade na inativação. Uma das estratégias para melhorar a efetividade fotodinâmica de compostos mais hidrofílicos é aumentar a concentração de utilização, como já demonstrado por estudos promissores do grupo com a ZnPEtil (10 µmol L⁻¹), voltados para aplicação contra *Leishmania amazonensis* (Viana *et al.*, 2015 ; Andrade *et al.*, 2018). Porém, como neste estudo o foco é um protocolo fotodinâmico mais efetivo para aplicação em bactérias com utilização de ZnP com menores concentrações, e pelo fato da ZnPHexil ainda ser pouco estudada e mesmo demonstrando grande eficácia não ter demonstrado toxicidade em células de mamíferos em concentrações previamente testadas (Seção 3.2.4.1.3) ela foi a ZnP selecionada para as próximas etapas do estudo.

5.2 Caracterização dos hidrogéis desenvolvidos

5.2.1 Caracterização dos hidrogéis desenvolvidos na Etapa 1

5.2.1.1 Análise organoléptica

Os hidrogéis produzidos na primeira fase do estudo para escolha do polímero, apresentaram no momento do preparo transparência, uniformidade e odor característico dos componentes utilizados. Com relação à coloração, todas as amostras apresentaram tonalidade entre o rosa e o amarelo.

A formulação com GelCBP apresentou uma maior dificuldade de escoamento e uma coloração entre o rosa e amarelo identificada como salmão, a amostra com GelALG um amarelo mais intenso e a amostra com GelHEC uma maior fluidez relacionada ao escoamento e a coloração sendo um amarelo mais claro. Além disso, a GELCBP apresentou uma leve separação de fase após ficar 3 dias em repouso. As características macroscópicas relacionadas à coloração e flouorescência podem ser observadas na Tabela 5.

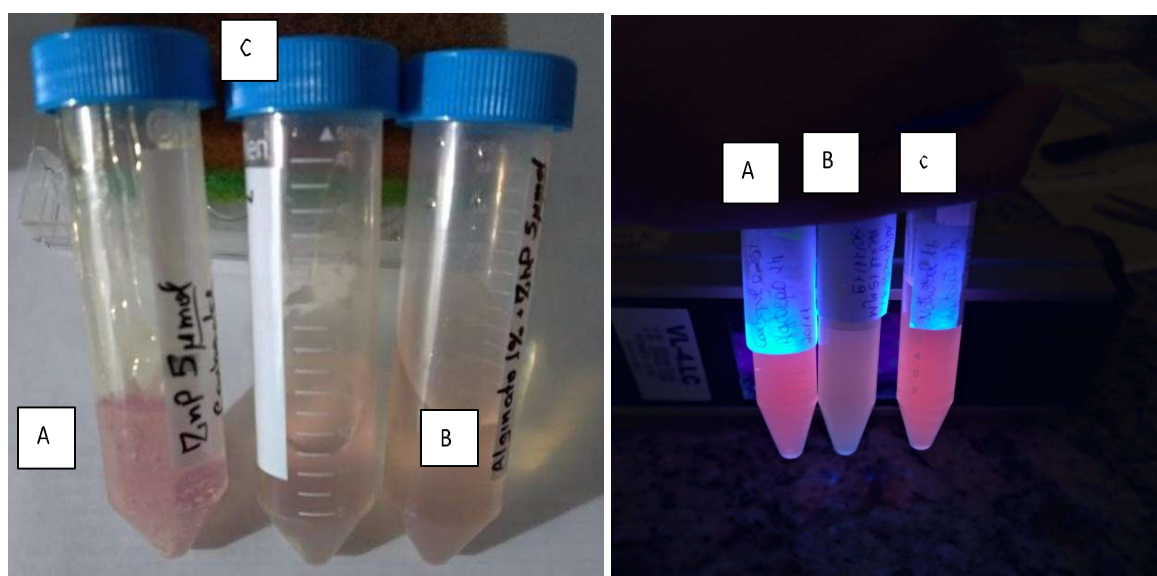
Tabela 5: Características macroscópicas do ativo e dos hidrogéis produzidos na etapa 1 do estudo para escolha do polímero para melhor veiculação da ZnPHexil.

Formulação	Coloração	Fluorescência
ZnPHexil solução	Rosa	Conforme
GelCBPZnPHexil	Salmão	Conforme
GelALGZnPHexil	Amarelo intenso	Supressão
GelHECZnPHexil	Amarelo claro	Conforme

Fonte: dados do estudo.

A ficha técnica do polímero relata incompatibilidades com substâncias catiônicas e na presença de zinco, o que pode explicar o comportamento final da formulação. Também foi avaliada a fluorescência das amostras e fica nítida a supressão da amostra que contém alginato (Figura 18). Nesse contexto, a formulação com HEC foi a que apresentou maior conformidade pela análise organoléptica.

Figura 18: Hidrogéis desenvolvidos na fase 1 do estudo para determinação do polímero a ser escolhido para incorporação da ZnPHexil. (A) GelCBP+ZnPHexil; (B) GelALG+ZnPHexil E (C) GelHEC+ZnPHexil.

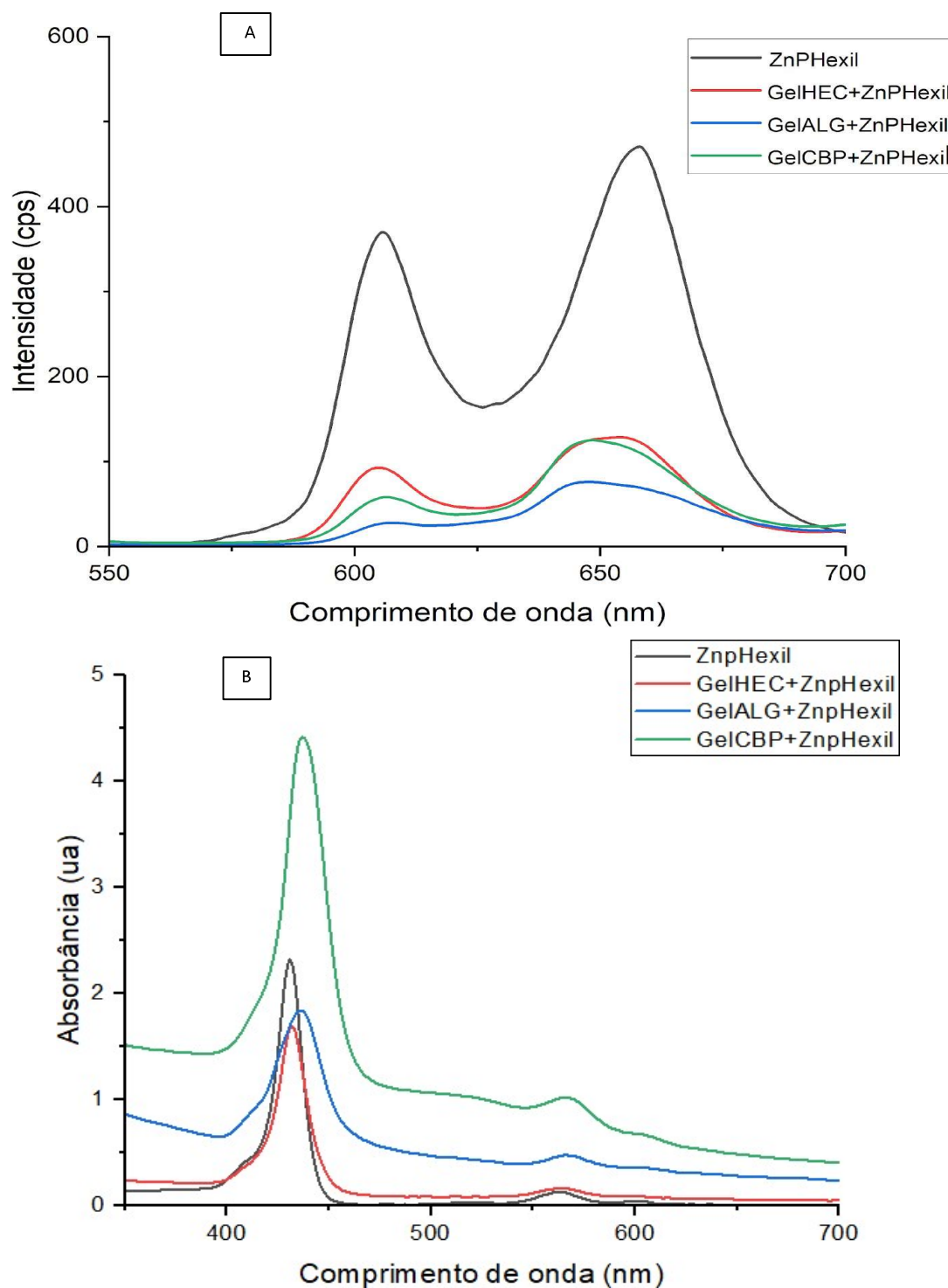


Fonte: própria autora.

5.2.1.2 Caracterização óptica das formulações

Foram realizados os espectros de emissão e absorção das amostras de hidrogéis produzidos que podem ser observados na Figura 19.

Figura 19: Espectros de emissão (a) e absorção (b) dos hidrogéis produzidos na fase 1 do estudo para escolha do polímero. Concentração final da ZnPHexil ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) Exc: 427 nm.



Fonte: dados do estudo.

Por meio dos espectros pode ser observado que as amostras com alginato e carbopol apresentaram espalhamento (evidenciado pelo aumento na linha de base do espectro) que pode ser gerado pela leitura do arranjo da rede polimérica, além de deslocamento espectral, ~5 nm e ~6 nm respectivamente da espécie ZnP, comparado ao espectro em solução. Este deslocamento também pode se referir à interação mais efetiva com a rede polimérica, alterando a configuração eletrônica das moléculas das porfirinas. Em contraste, o gel formulado com HEC1% mostrou-se mais semelhante aos resultados da ZnPHexil em solução (deslocamento do máximo ~1 nm), bem como com menor espalhamento de luz, podendo ser relacionado à menor interação da porfirina com a malha polimérica (dados na Tabela 6).

Mediante a análise dos espectros de emissão, pode ser observada similaridade do perfil espectral da ZnPHexil no gelHEC com o da solução de ZnPHexil, embora observou-se redução na intensidade de emissão, para a mesma concentração. A redução da intensidade pode estar associada a alguns fatores relacionados à supressão da emissão pela própria matriz polimérica, ou seja, dificuldade de transferência da radiação pela matriz, tornando menos eficiente o processo de excitação. Baseado no conjunto de dados ópticos observados para as formulações contendo ZnPHexil, o polímero HEC na concentração de 1% (m/v) foi selecionado para ser a matriz das formulações a serem testadas no presente estudo. Este comportamento também é respaldado pelo fato do polímero ser bem empregado na indústria farmacêutica por aumentar a viscosidade dos produtos sem alterar as características dos ativos (Monteiro, Tavares, Vasconcelos, 2020).

Tabela 6: Dados espectrais referentes à análise dos gráficos de absorção e emissão da Figura 19. Concentração da ZnPHexil em solução e formulações: 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Formulação	$\lambda_{\text{MÁX (ABS)}} \text{ (nm)}$	$\lambda_{\text{MÁX (EMIS)}} \text{ (nm)}$
ZnPHexil solução	431	606
GelCBPZnPHexil	437	607
GelALGZnPHexil	436	608
GelHECZnPHexil	432	605

Fonte: dados do estudo.

5.2.2 Caracterização dos hidrogéis desenvolvidos na Etapa 2

5.2.2.1 Análise organoléptica

Após seleção do HEC (1%) como polímero dos hidrogéis, na segunda etapa dos testes foram observados a ação dos excipientes propilenoglicol (5%) e ureia (10%)

como agentes de umectação para melhora da formulação. Todas as formulações apresentaram-se aparentemente estáveis e com coloração amarelada, as formulações com presença de propilenoglicol apresentaram-se aparentemente mais fluidas. Na visualização da fluorescência as amostras apresentaram tonalidade com intensidade proporcional à concentração de ZnPHexil nas amostras (1 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), conforme demonstrado na Figura 20.

Figura 20: Hidrogéis de HEC 1% m/v desenvolvidos na fase 2 do estudo com e sem ZnPHexil em diferentes concentrações para visualização da fluorescência. (A) G1: HEC1% (B) G2:HEC1%+ZnpHexil 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (C) G2:HEC1%+ZnpHexil 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: própria autora.

5.2.2.2 Caracterização físico-química

5.2.2.2.1 Determinação de pH e espalhabilidade

Os resultados de pH das formulações, como demonstrado na Tabela 7, apresentaram-se na faixa de 5 - 6,5, sendo considerados adequados para aplicação cutânea, pelo fato de que o pH normal da pele está entre 4,6 – 5,8 (Lopes *et al.*, 2018). Pode ser observado que nas amostras com adição de propilenoglicol ocorreu redução do pH, enquanto que nas amostras com adição da ureia ocorreu permanência do valor demonstrado quando comparado à solução da ZnPHexil (6,5). Um pH mais próximo do apresentado pelo FS pode ser preferível por ser compatível e auxiliar na permanência da solubilidade e estabilidade do ativo (Yamane, 2016).

Tabela 7: Potencial hidrogeniônico da ZnPHexil em solução e hidrogéis desenvolvidos com hidroxietilcelulose 1%, com e sem ZnPHexil, com e sem os agentes de umectação. *propilenoglicol 5% e ureia 10%.

Formulação	ZnPHexil solução	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
pH	6,5	6	6	5	5	6	6,5	5	6

Fonte: dados do estudo.

A capacidade que uma formulação tem de se espalhar, quando é submetida a uma determinada força, é determinada pelo teste de espalhabilidade, onde se busca reproduzir as condições de esforço necessárias para aplicação na pele. A determinação da espalhabilidade está relacionada com a viscosidade e com a eficácia de aplicação no local de absorção ou ação, ou seja, uma maior espalhabilidade é desejável para favorecer a distribuição e absorção do ativo pela pele (Corrêa *et al.*, 2005). Os valores médios da espalhabilidade (Ei) de todas as formulações estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Espalhabilidade dos hidrogéis desenvolvidos com hidroxietilcelulose 1%, com e sem ZnPHexil, com e sem os agentes umectantes. * propilenoglicol 5% e ureia 10%.

Formulação	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Ei (Y) médio (mm ²)	15.919	12.799	11.297	17.625	18.908	16.028	24.788	14.470

Fonte: dados do estudo.

Para exemplificar a determinação dos resultados, foram demonstrados na Tabela 9 os resultados de duas formulações: HEC 1% base (G1) e HEC1% base+ZnPHexil (G2), da primeira até a aplicação da última placa sobre os hidrogéis.

Tabela 9: Determinação da espalhabilidade do gel HEC 1% m/v com e sem a incorporação de ZnPHexil (15mol L⁻¹). G1:HEC1%; G2:HEC1%+ZnPHexil.

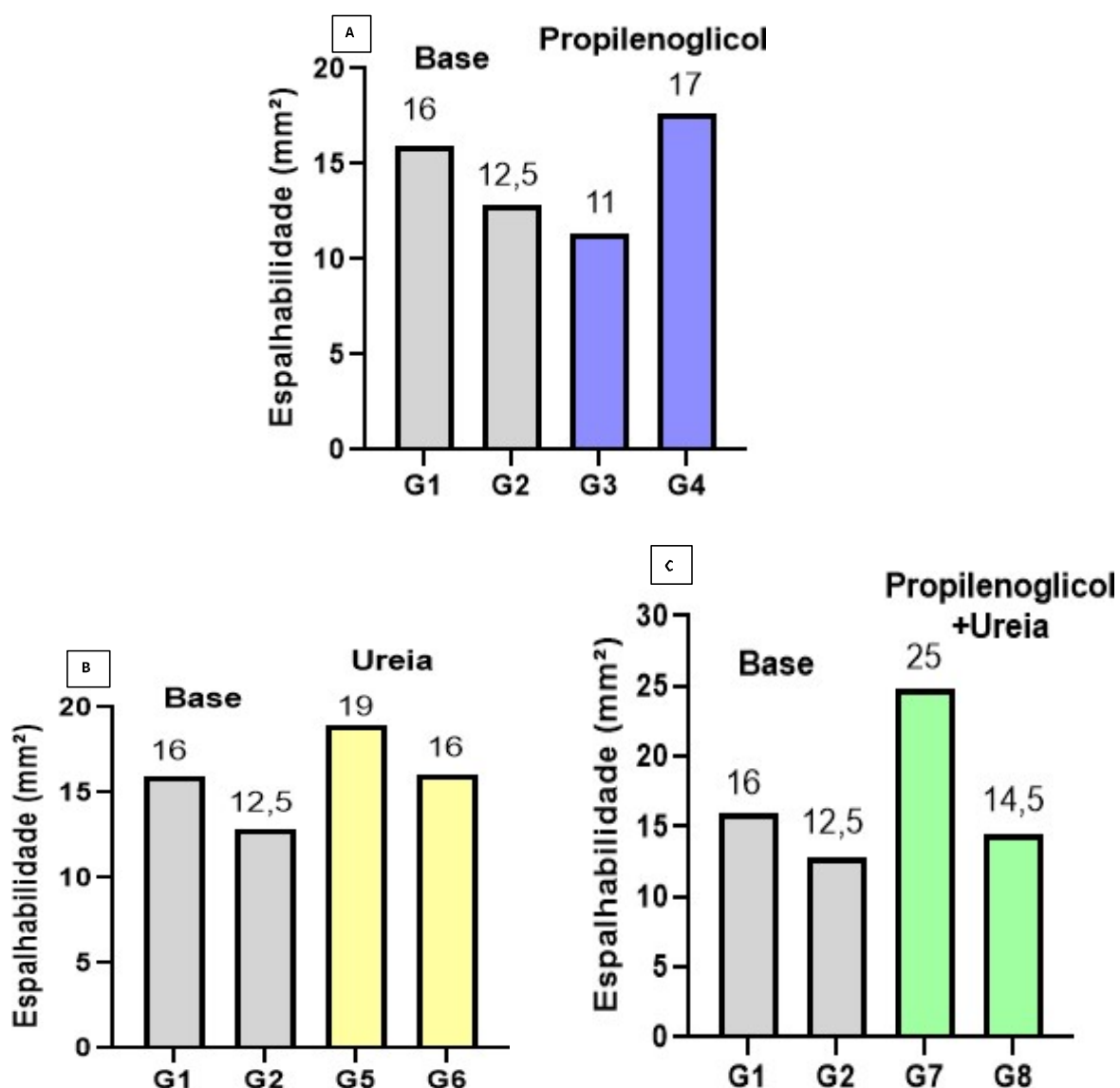
Número da placa	Massa da placa (g)	Massa total adicionada (g)	Área média (mm ²) (d ²) G1	Ei (Y) médio (mm ²) G1	Área média (mm ²) (d ²) G2	Ei (Y) médio (mm ²) G2
1	200	0	3.370	2.645,60	3.900	3.061,50
2	207,9	207,9	5.777	4.534,95	5.380,95	4.224
3	198,8	406,7	8.319,87	6.531,10	6.166,96	4.841
4	208,2	614,9	10.475,52	8.223,28	8.043,40	6.314
5	209,4	824,3	12.789,35	10.039,64	10.678,12	8.382,32

6	208,5	1032,8	14.468	11.357,44	10.936,98	8.585,53
7	210	1242,8	16.164,57	12.689,20	11.246,60	8.828,58
8	208,9	1451,7	17.189	13.493	12.396,60	9.731,33
9	209,1	1660,8	18.316	14.378	13.718,26	10.768,84
10	208,6	1869,4	20.279,66	15.919,53	16.304,74	12.799,22

Fonte: dados do estudo.

A Figura 21 demonstra por meio dos gráficos A/B/C a capacidade de extensão das formulações desenvolvidas com e sem ZnPHexil ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e com ou sem os agentes de umectação, propilenoglicol (5%) e ureia (10%).

Figura 21: Determinação da espalhabilidade do gel HEC 1% m/v com e sem a incorporação de ZnPHexil em solução ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e agentes umectantes. Os dados representam a média das análises (n=3). *G1:HEC1%;G2:HEC1%+ZnPHexil;G3:HEC1%+propilenoglicol5%;G4:HEC1%+ZnPHexil+propilenoglicol 5%;G5:HEC1%+ureia10%;G6:HEC1%+ZnPHexil+ureia10%;G7:HEC1%+propilenoglicol5%+ureia10%; G8:HEC1%+ZnPHexil+propilenoglicol5%+ureia10%.



Fonte: dados do estudo.

Os gráficos expostos na Figura 21 demonstram que ao adicionar ZnPHexil na formulação base ocorreu redução da espalhabilidade nas amostras sem agente umectante ($G1 = 15.919/G2 = 12.799 \text{ mm}^2$), com ureia (A) ($G5 = 18.908/G6 = 16.027 \text{ mm}^2$) e com propilenoglicol/ureia (C) ($G7 = 24.788/G8 = 14.470 \text{ mm}^2$). Apenas nas formulações com propilenoglicol (A) é observado um perfil inverso ($G3 = 11.297/G4 = 17.624 \text{ mm}^2$). Sugere-se que a ZnPHexil possa interagir físico-quimicamente com as cadeias poliméricas da hidróxi etil celulose do gel, ocasionando essa menor espalhabilidade. Porém, ao avaliar as formulações com incorporação de ZnPHexil com e sem agente umectante pode ser visualizado que em todas as formulações com o FS ($G4/G6/G8$), a presença do agente umectante foi favorável para o aumento da espalhabilidade. Em concordância com o observado, Vargas (2013); Da Silva Patias (2016) citam que agentes de permeação, como ureia e propilenoglicol, têm propriedades de aumentar a espalhabilidade de formulações tópicas, sendo essa característica adequada para facilitar a aplicação e a distribuição do produto sobre a pele. Por manter a estabilidade do pH e aumento da espalhabilidade a formulação com ureia (G6) foi identificada como a mais adequada nessa avaliação.

5.2.2.2.2 Teste de centrifugação

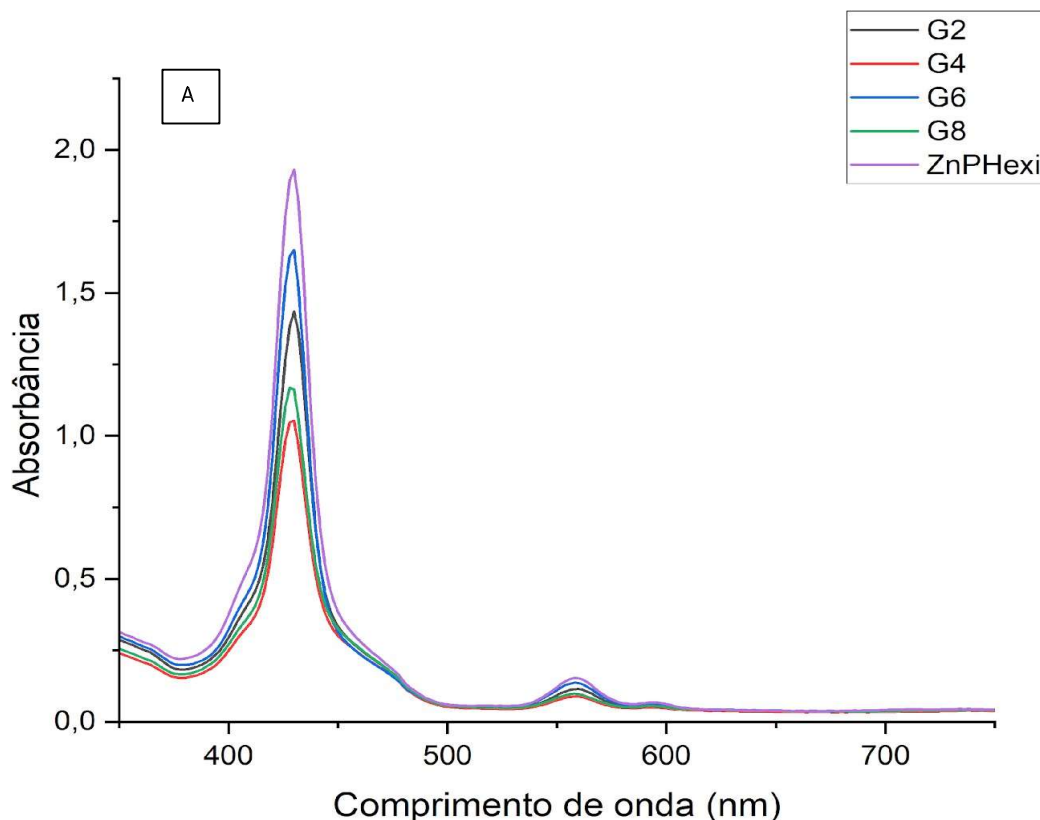
O teste de centrifugação deve ser realizado em formulações semissólidas antes da avaliação preliminar da estabilidade, pois provoca estresse nas amostras através da força da gravidade. Aumentando a mobilidade das partículas presentes nas formulações e antecipando possíveis sinais de instabilidade, entre eles estão: separação de fases, precipitação, sedimentação de partículas, coalescência, entre outros. Através da avaliação visual das amostras, não houve alteração nas propriedades coloidais das formulações de HEC 1% m/v tanto com ZnPHexil e agentes de umectação, quanto nas formulações placebo. Desta forma, o presente teste demonstrou estabilidade das formulações, não indicando a necessidade de reformulação (MELO; DOMINGUES; LIMA, 2018).

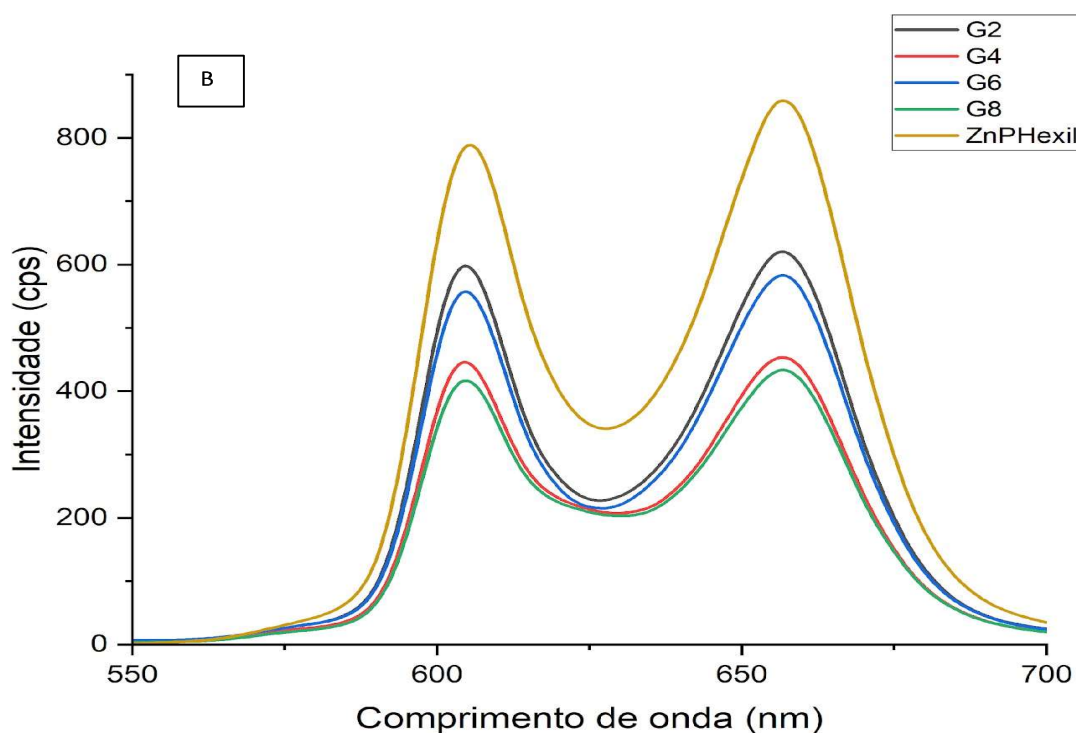
5.2.2.3 Caracterização óptica das formulações

Os espectros de absorção e emissão das soluções de ZnPHexil ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e dos hidrogéis desenvolvidos com HEC 1% m/v estão apresentados na Figura 22. O espectro de absorção da ZnP (a) é característico com uma banda *Soret* como já

demonstrado anteriormente em aproximadamente 430 nm e bandas Q, entre 560 e 590 nm. O espectro de emissão apresenta máximos em 596 e 657 nm, semelhante aos seus análogos (Thomas *et al.*, 2015). No mesmo gráfico, podem ser observados os espectros dos hidrogéis desenvolvidos com HEC 1% m/v e com incorporação da ZnPHexil ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) nas diferentes composições com ou sem agentes de umectação (G2/G4/G6/G8). Através dos espectros de emissão (b), pode ser observado que não houve variação espectral significativa nas amostras, porém ocorreu variações na intensidade da emissão. Uma maior supressão da emissão foi observada nos hidrogéis que continham propilenoglicol (G4:623 e G8:438), do que no que continha apenas ureia (G6:585) que teve maior similaridade ao gel base sem adjuvantes (G2:623) e à ZnPHexil em solução.

Figura 22: Caracterização óptica da ZnPHexil em solução ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e dos hidrogéis desenvolvidos do gel HEC 1% m/v com e sem a incorporação de ZnPHexil e agentes de umectação. Espectros de absorção óptica (a) e de emissão (b). *Exc: 427 nm. G2: HEC1%+ZnPHexil; G4: HEC1%+ZnPHexil+propilenoglicol5%; G6:HEC1%+ZnPHexil+ureia10%;G8:HEC1%+ZnPHexil+propilenoglicol5%+ureia10%.





Fonte: dados do estudo.

Segundo a equação de Stern Volmer (ITO, 1994), pode-se sugerir que o processo de supressão observado nos hidrogéis quando comparado à ZnPHexil isolada, seja originária da associação matriz polimérica-porfirina que pelo fato do FS estar incorporado na malha polimérica dificulta a movimentação das moléculas e consequentemente reduz sua fluorescência por perdas não radiativas. Para confirmação da hipótese e diferenças de supressão apresentadas pelas amostras analisadas, estudos mais aprofundados como medidas de tempo de decaimento e espectroscopia de Raman seriam necessários (Dias Junior; Novo 2014). Os dados obtidos por meio dos espectros estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Dados espectrais referentes à análise de absorvância e emissão da ZnPHexil solução e hidrogéis desenvolvidos com HEC 1% m/v. *concentração da ZnPHexil em solução e formulações: 5 mol L⁻¹.

Formulação	λ MÁX (ABS) (nm)	λ MÁX (EMIS) (nm)	MÁX (EMIS) intensidade
ZnPHexil solução	430	656,5	860
G2	430	656,5	623
G4	430	656,5	453
G6	430	657	585
G8	430	657	438

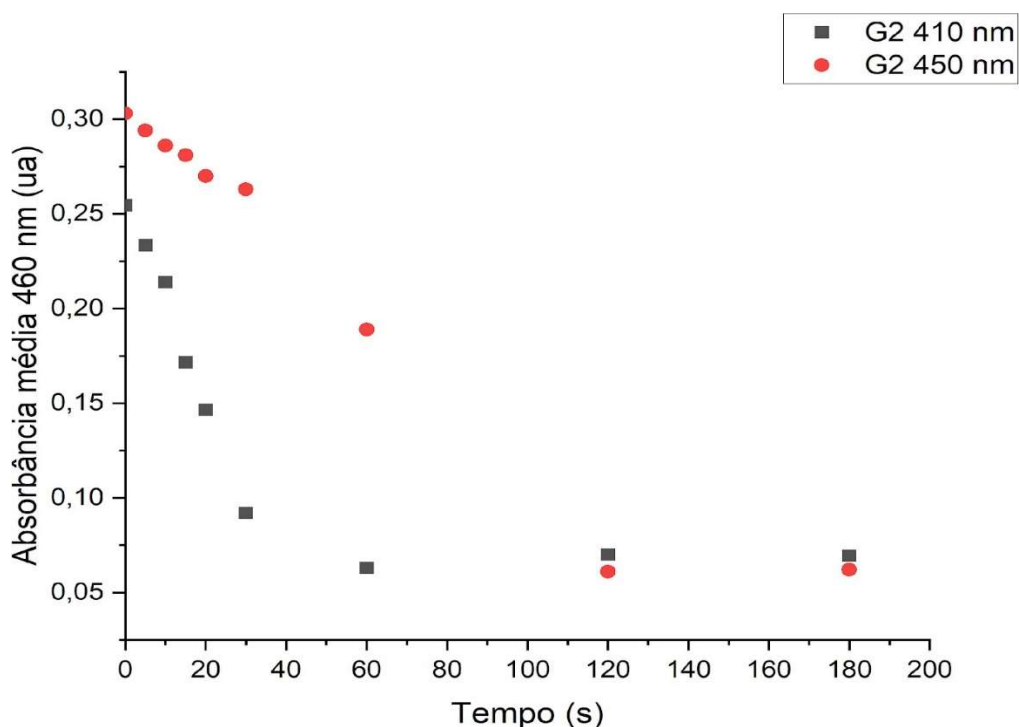
Fonte: dados do estudo.

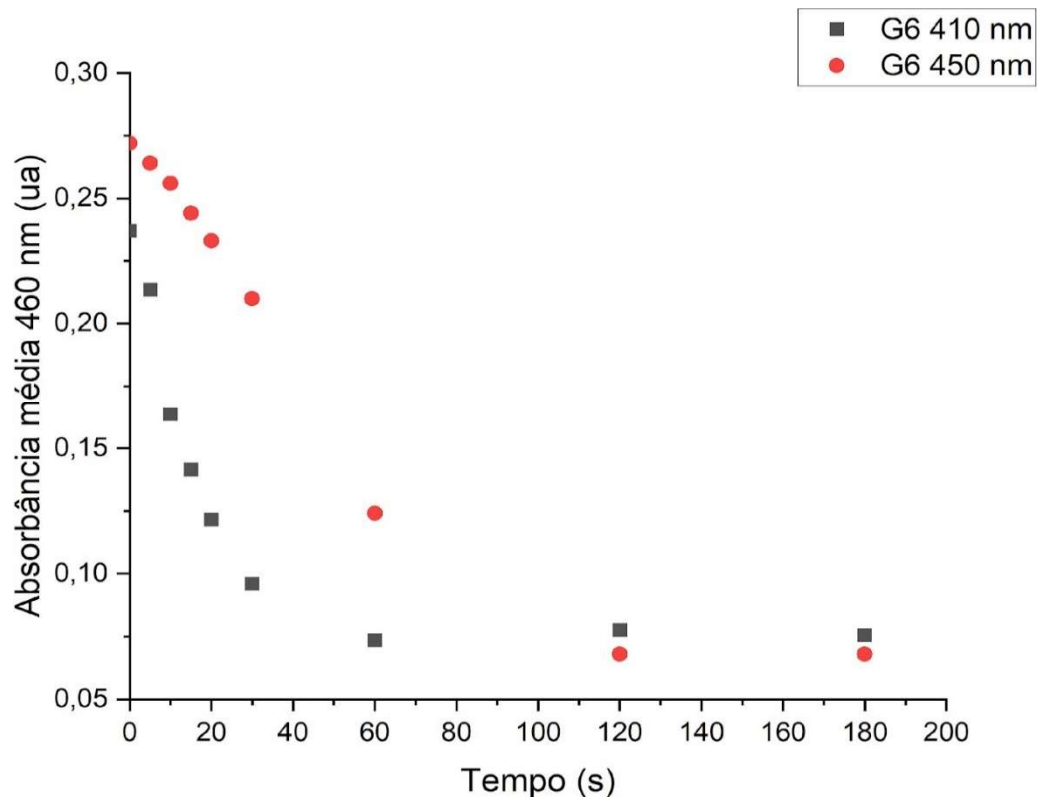
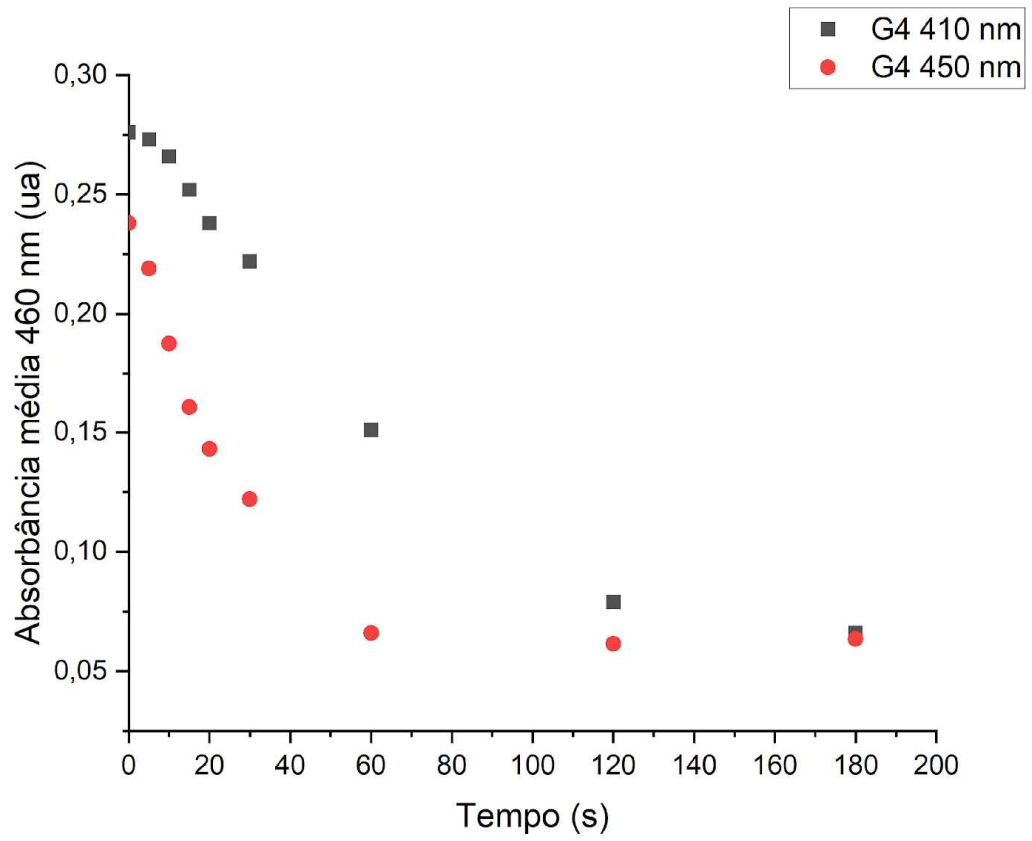
Na Tabela 10 estão expostos o comprimento máximo de absorção e de emissão eletrônica, e a intensidade máxima identificada das formulações avaliadas. Mediante os dados pode ser observada maior semelhança do perfil da ZnPHexil em solução, com as formulações G2 (ZnPHexil) e G6 (ZnPHexil+ureia).

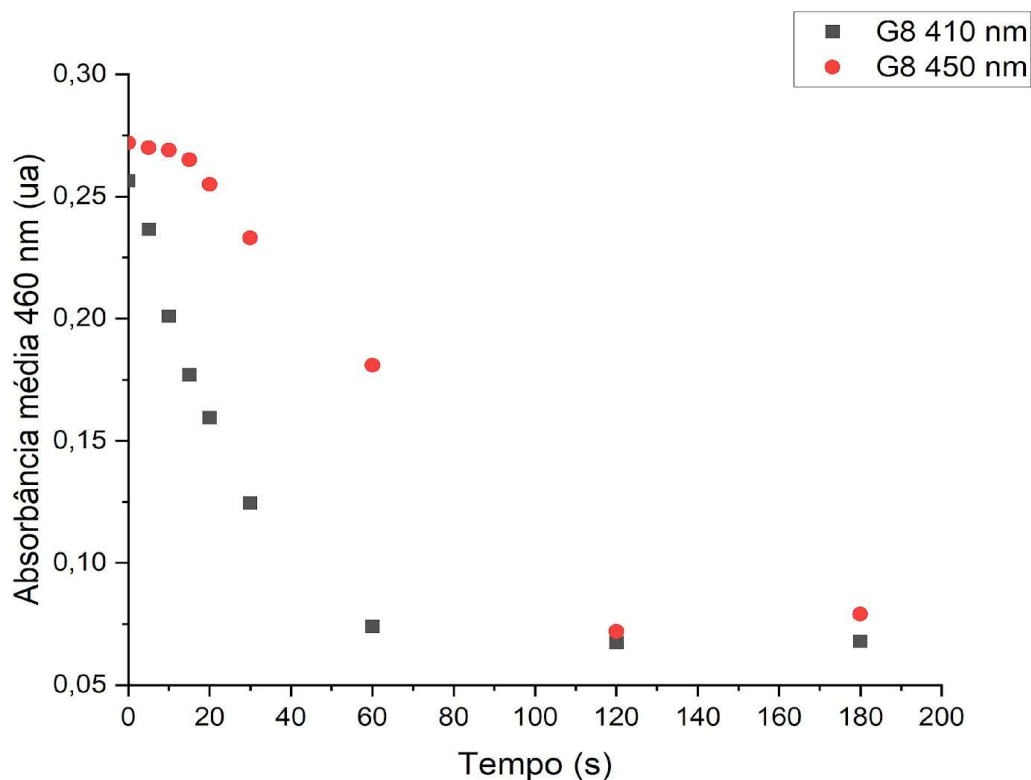
5.2.2.4 Detecção indireta de EROs por método RNO / L-histidina

As propriedades ópticas estão relacionadas à capacidade de produção de EROs de fotossensibilizadores. A determinação da produção de EROs pela ZnPHexil em meio aquoso está demonstrada na Figura 16. Observa-se, por este método, que a formação de radicais livres para ZnPHexil pode ser estimada através da redução do espectro de absorção característico do RNO com máximo em $\lambda = 460$ nm. Na presente análise foram testadas as formulações nas mesmas condições de concentrações e tempos de irradiação (0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 s), porém com comprimento de onda de emissão e potência do LEDbox azul diferentes, em $\lambda = 410$ nm (47,61 mW/cm²) e $\lambda = 450$ nm (48,7 mW/cm²), para posterior comparativo dos resultados. Além disso, o intuito foi avaliar se as diferentes composições dos géis impactam na geração de EROs. Os resultados podem ser observados na Figura 23.

Figura 23: Comparativo da variação da intensidade de absorção de RNO em $\lambda = 460$ nm em função do tempo de irradiação, usando LEDbox com emissão em $\lambda = 410$ nm e $\lambda = 450$ nm e os géis desenvolvidos com ZnPHexil (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$).







Fonte: dados do estudo.

Existe uma proporcionalidade entre a degradação do RNO e a geração de EROs e isto na aPDI está relacionado com o tempo de irradiação incidido nas amostras, assim como, com a absorbância detectada. Quanto maior for o tempo de irradiação, maior será a degradação de RNO e se espera que consequentemente mais eficiente será a geração de EROs indicando menor valor da absorbância (Araujo, 2021).

Quando observado a geração de EROs com irradiação de 30s (Tabela 11), a ZnPHexil apresentou 66,8% de produção de EROs quando a emissão do LED foi de $\lambda = 410$ nm (potência de 47.61 mW/cm²), resultado divergente do apresentado por Santos, 2016 que obteve apenas 36% de geração de EROs com a ZnPEtil como FS, a análoga da ZnPHexil testada no início do presente estudo, que apresentaram geração de EROs bem próximas na etapa inicial do estudo (5.1.2). Porém, a diferença empregada no estudo foi a emissão da fonte irradiadora, que foi realizada através de um fotopolimerizador emitindo em 450 ± 10 nm (potência nominal 900 mW/cm²). Divergência também observada nos resultados aqui relatados, através do comparativo das diferentes fontes de emissão, que pode ser detectada uma redução de 40,5% na produção de EROs da solução de ZnPHexil quando utilizado $\lambda = 450$ nm com irradiação de até 30s.

Tabela 11: Comparação da leitura do espectro de absorção do método indireto RNO com irradiação de 30s para quantificar as espécies reativas de oxigênio da solução e dos géis investigados no estudo com emissão em 410 e 450nm.

Formulação	Degradação RNO% (410 nm)	Degradação RNO% (450 nm)	Diferença %
ZnPHexil solução	66,8	26,3	40,5
G2	63,8	15,2	48,6
G4	48,7	19,6	29,1
G6	59,5	22,8	36,7
G8	51,5	14,3	37,2

Fonte: dados do estudo.

Porém, avaliando-se os resultados dos gráficos (Figura 23), pode ser observado que a emissão do LEDbox azul em $\lambda = 410$ nm apresenta melhor perfil de geração de EROs até o tempo de irradiação de 60 s, a partir de 120 s os dois dispositivos apresentam resultados na geração de EROs bem semelhantes, sendo ambos apropriados precisando ajustar apenas o tempo de irradiação a ser utilizado. O resultado pode ser justificado pelo fato de que variações na potência média empregada estão diretamente relacionadas ao tempo de irradiação (Issa; Manuela-Azulay, 2010; Santos, 2016).

Diantes dos resultados expostos como a proposta do estudo é ter maior efetividade com menor tempo aplicado na inativação fotodinâmica, a emissão com LEDbox azul em $\lambda = 410$ nm foi a adotada para os testes *in vitro* de inativação com *S. aureus*. Além disso, as formulações com ureia (G5 e G6) foram selecionadas para os ensaios de inativação por apresentarem maior produção de EROs, perfil óptico e um bom perfil de espalhabilidade. As formulações sem agente umectante (G1 e G2) também foram incluídas no teste para comparativo e avaliação de possíveis interações na presença do agente umectante.

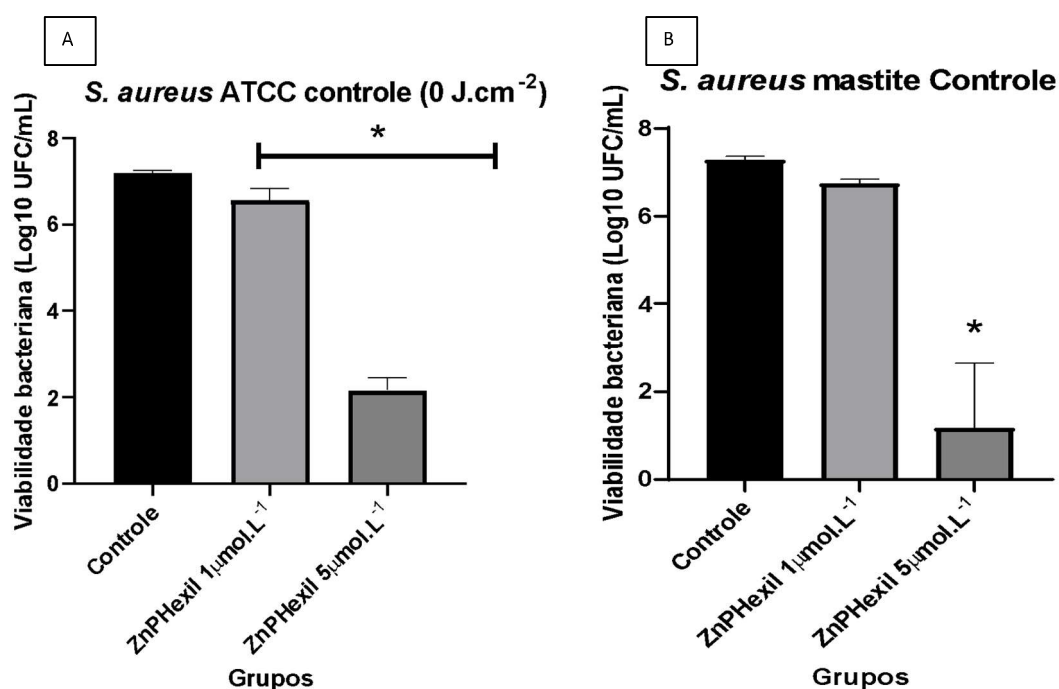
5.3 Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* utilizando ZnPHexil como fotossensibilizador

5.3.1 Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* isolada da mastite bubalina utilizando ZnPHexil como fotossensibilizador

A leitura de MO por microplaca (630 nm) quando comparada à contagem de UFC/mL não foi considerado um método reprodutível com os parâmetros aqui definidos para determinação da inativação fotodinâmica, o que tornou a contagem de UFC o método adotado para a continuidade dos testes com a ZnPHexil.

Através dos resultados com os testes da ZnPHexil em solução, foi observada uma redução significativa da viabilidade bacteriana para ambos os MO na ausência da irradiação quando utilizado $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do FS, como demonstrado na Figura 24.

Figura 24: Avaliação da viabilidade celular sem aplicação da irradiação para análise da toxicidade no escuro da ZnPHexil nas concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. (a) *S. aureus* ATCC (b) *S. aureus* mastite (n=3; *P<0.05)



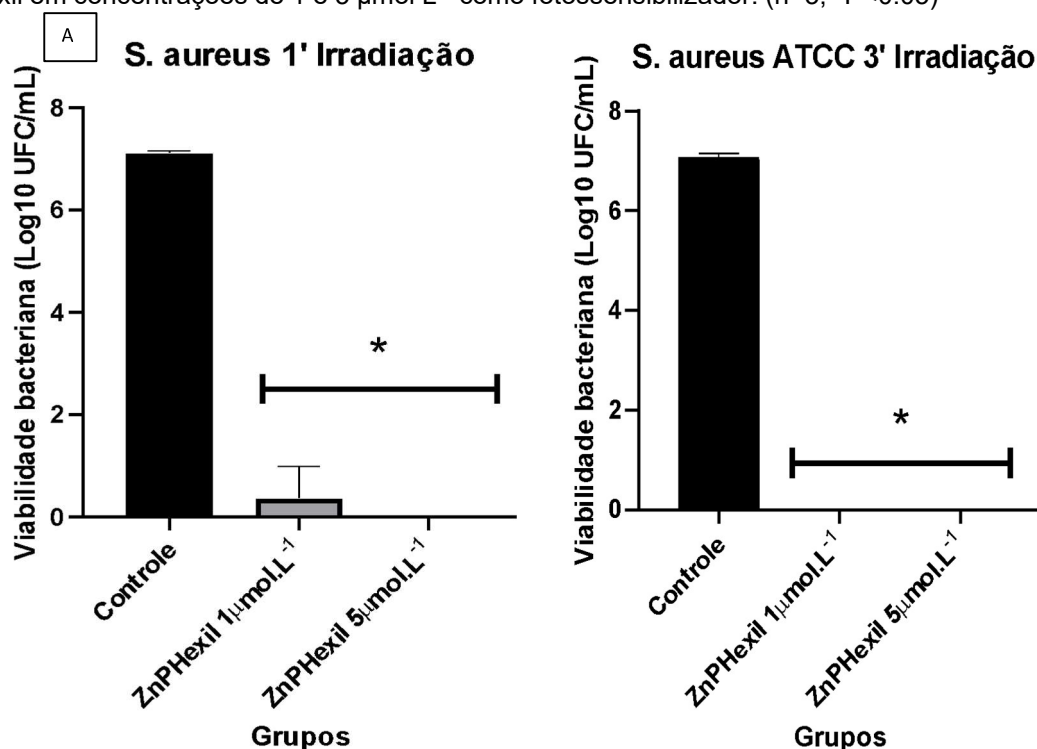
Fonte: dados do estudo.

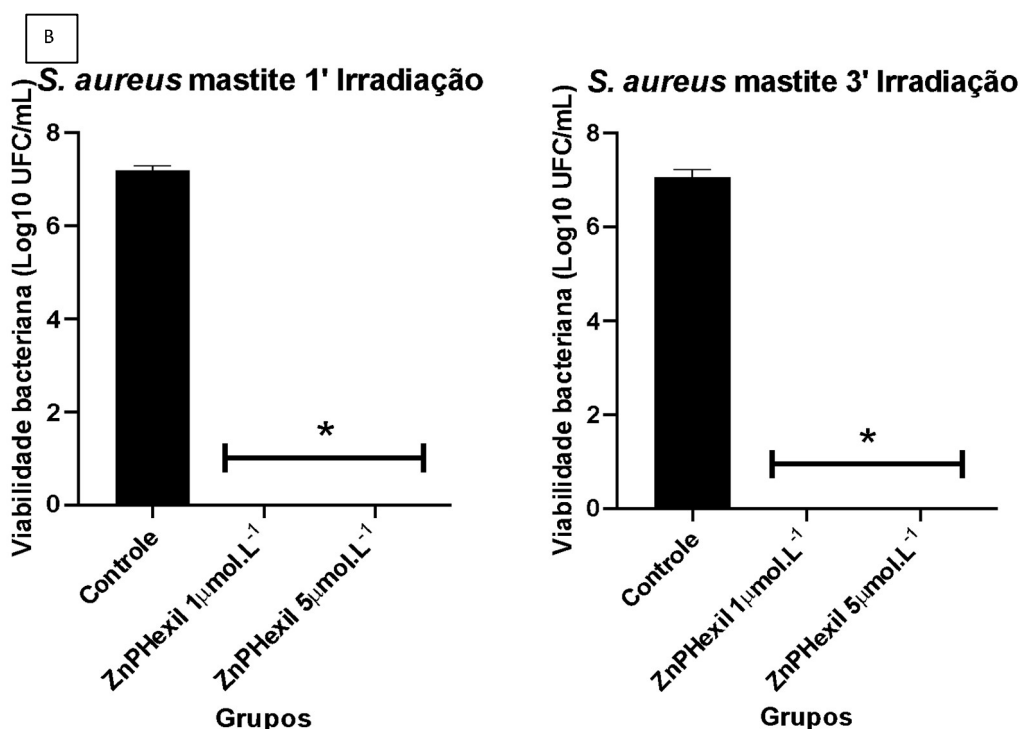
Para *S. aureus* ATCC uma redução de 5 logs foi observada, enquanto que para *S. aureus* isolado da mastite uma redução de 6 logs. Como citado anteriormente (tópico 5.1.4) a toxicidade no escuro nessa concentração diverge em diferentes estudos, provavelmente pela variabilidade dos parâmetros e cepas utilizadas. Thomas *et al.* (2015) com cepas de *E. coli* cita significativa toxicidade no escuro nessa concentração enquanto que Alenezi *et al.* (2017) não observa o mesmo perfil em seu estudo com o mesmo MO. Porém, quando avaliada a ZnPHexil na menor concentração ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) não foi observado significativa toxicidade no escuro (menos de 1 log) no presente estudo, resultado que corrobora estudos com outros

tipos de cepas testadas (Ezzedine *et al.*, 2013; Alenezi *et al.*, 2017), que demonstraram o mesmo perfil para o FS na menor concentração. Porém, se torna relevante destacar que apesar da toxicidade no escuro apresentada quando testadas maiores concentrações de ZnPs em cepas bacterianas, o mesmo resultado não é demonstrado em células de mamíferos, o que torna as metaloporfirinas uma alternativa eficaz e promissora aos antibióticos ou associados a eles nos casos de resistência (Apostolidou *et al.*, 2024).

Os dados dos experimentos com irradiação por LEDbox azul com $\lambda = 410$ nm de 1 e 3 min estão expostos na Figura 25, sendo (a) *S. aureus* ATCC e (b) *S. aureus* isolado da mastite. Quando irradiadas as amostras de *S. aureus* isolada da mastite apresentaram total inativação mesmo com menor tempo de irradiação (1 min) e menor concentração de FS ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), enquanto que para *S. aureus* ATCC ocorreu total inativação na concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no menor tempo de irradiação, e na dose de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ é possível observar a viabilidade de apenas 0,5 log do MO. Kossakowska-Zwierucho *et al.* (2020) utilizando ZnPMetil para inativar cepas de *S. aureus* conjugou o FS com o farnesol, um adjuvante bactericida, e obteve redução inferior ao do presente estudo (5 log) mesmo em uma concentração de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 25: Avaliação da viabilidade bacteriana da inativação da *S. aureus* ATCC (a) e *S. aureus* isolado da mastite (b) com irradiação de 1 e 3 minutos, utilizando o LED azul $\lambda = 410$ nm (47.61 mW/cm^2) e a ZnPHexil em concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ como fotossensibilizador. (n=3; *P<0.05)





Fonte: dados do estudo.

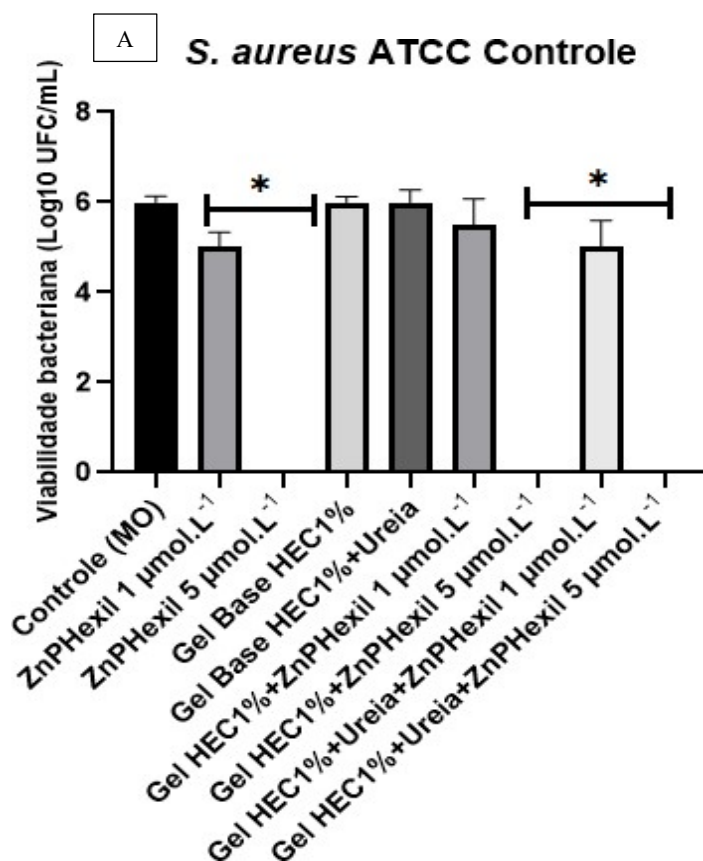
A alta efetividade da ZnPHexil mesmo em menores concentrações quando comparada a seus análogos pode ser justificada pelo seu caráter anfifílico e catiônico que consegue se ligar e aderir à bicamada lipídica de forma mais eficaz facilitando seu acúmulo no interior dos MO, principalmente em bactérias gram-positivas que possuem maior porosidade na superfície celular (Alves *et al.*, 2014). Após a iluminação o FS gera EROs, incluindo oxigênio singleto, e iniciam as reações em cadeia de peroxidação lipídica que causam danos na membrana microbiana e ampliam assim através da internalização o efeito fotodinâmico (Thomas *et al.*, 2015).

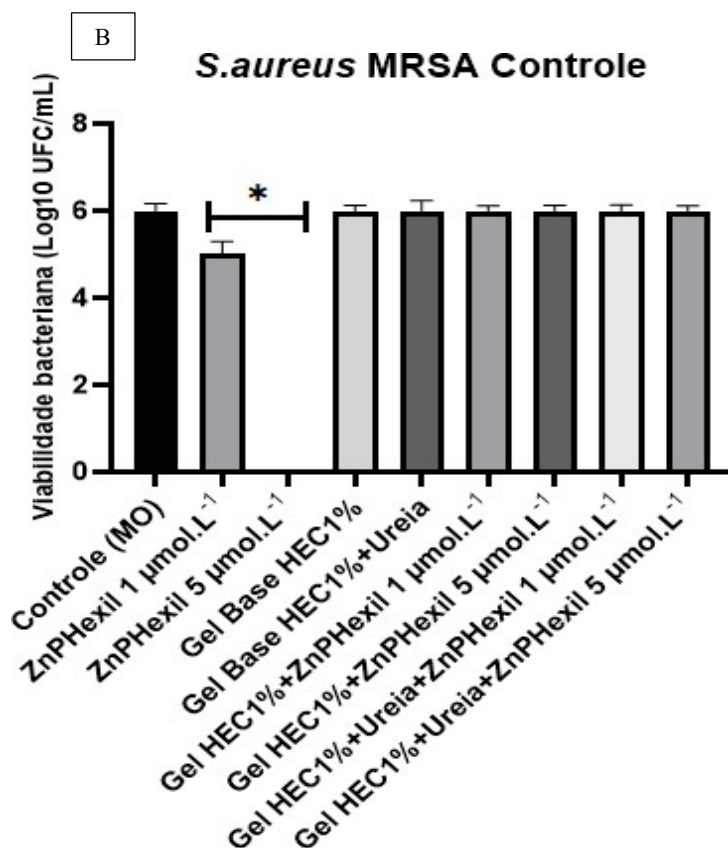
A cepa isolada da mastite utilizada neste estudo foi positiva para beta lactamase e negativa para a produção de coagulase. Também foi observada a resistência frente a diversos antibióticos, como ampicilina (85%), penicilina (93%), sulfonamidas (89%), novobiocina (89%), lincomicina (76%), kanamicina (79%), streptomycin (63%), eritromicina (61%) e oxacilina (81%) (Medeiros *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2021). O que demonstra através dos resultados a grande efetividade fotodinâmica da ZnPHexil para bactérias multirresistentes quando comparada a outros FSs. Os resultados até aqui obtidos demonstram que a ZnPHexil em baixa concentração e em pouco tempo de irradiação, pode ser amplamente estudada e incorporada em formulações.

5.3.2 Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* MRSA utilizando hidrogéis com ZnPHexil como fotossensibilizador

Após selecionadas as formulações de hidrogéis com melhor perfil para os testes *in vitro*, hidrogéis de ZnPHexil com e sem ureia, a efetividade da inativação fotodinâmica de *S.aureus* ATCC e MRSA01 foram testadas. Como nesta etapa da análise foram avaliadas amostras em soluções e hidrogéis, foi preconizado o tempo de irradiação de 3 minutos pelo fato de existir uma matriz polimérica para o contato entre o FS e as células bacterianas. No experimento sem irradiação (Figura 26) ao avaliar as amostras em solução foi observado que quando utilizada a concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do FS ocorreu total inativação de ambos MO, resultado que corrobora a toxicidade no escuro nessa mesma concentração já apresentada quando testada *S.aureus* isolada da mastite no tópico anterior. E quando avaliada a ZnPHexil em solução na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ o perfil permaneceu sem significativa toxicidade no escuro em ambas as cepas (redução de 1 log).

Figura 26: Avaliação da viabilidade celular quando testada ZnPHexil em solução e incorporada em hidrogéis de HEC1% m/v com e sem ureia, nas concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sem aplicação da irradiação. (a) *S. aureus* ATCC29213 (b) *S. aureus* MRSA01 (n=3; *P<0.05).

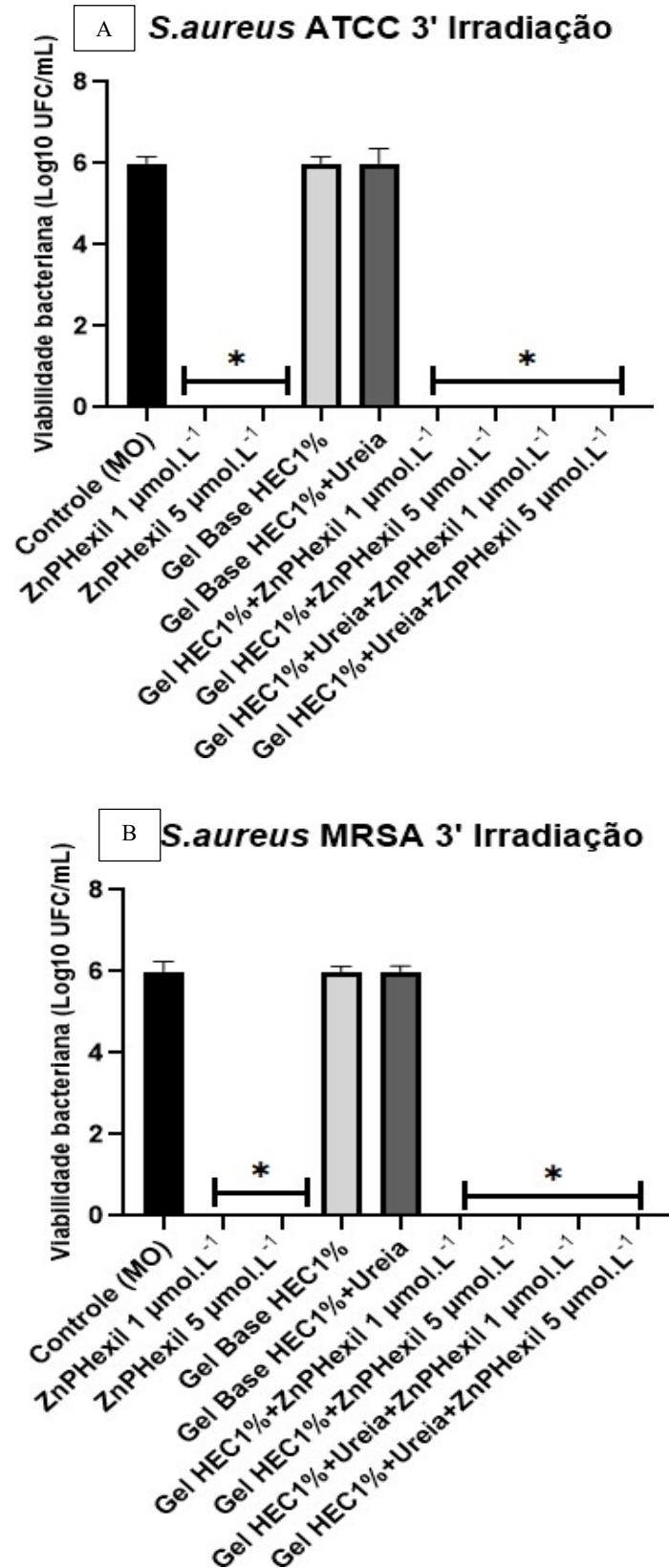




Fonte: dados do estudo.

A aplicação de FS incorporados em formulações semissólidas pode ser mais vantajosa que o utilizando diretamente em solução, pelo fato de uma melhor ligação do FS à parede celular das bactérias e por favorecer a sua penetração na membrana bacteriana (Rahimi; Fayyaz; Rassa, 2016). Nos hidrogéis, uma variedade de fatores como o tamanho da malha, a concentração do FS incorporado, o tamanho e a massa molecular são importantes para determinar a taxa de liberação do ativo. Além disso, são vantagens dos sistemas em forma de gel prolongar o tempo de permanência do FS no local da aplicação, o que permite um maior contato da formulação com a barreira biológica e uma melhor espalhabilidade do produto no local de ação (Smart *et al.*, 2003). Ao avaliar as amostras testadas na presença da irradiação (3 min) foi observado total inativação das cepas tanto quando a ZnPHexil em soluções quanto em hidrogéis (Figura 27). O que demonstra que a incorporação do FS na matriz polimérica e a presença do agente umectante ureia, mantiveram a efetividade fotodinâmica da ZnPHexil. Também pode ser observada uma interação diferente com a cepa MRSA, pois na concentração de 5 µmol L⁻¹ não foi observada a toxicidade no escuro presente na cepa ATCC deste ensaio e nas cepas de *S. aureus* do ensaio anterior.

Figura 27: Avaliação da viabilidade bacteriana da inativação da *S. aureus* ATCC29213 (a) e *S. aureus* MRSA01 (b) com irradiação de 3 min, utilizando o LED azul $\lambda = 410$ nm (47.61 mW/cm^2) e a ZnPHexil em solução nas concentrações de 1 e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e incorporada em hidrogéis de HEC1% m/v com e sem ureia. (n=3; *P<0.05)



Fonte: dados do estudo.

No presente estudo, ao avaliar as amostras testadas na presença da irradiação (3 min) foi observado total inativação das cepas tanto quando a ZnPHexil em soluções quanto em hidrogéis (Figura 27). O que demonstra que a incorporação do FS na matriz polimérica e a presença do agente umectante ureia, mantiveram a efetividade fotodinâmica da ZnPHexil. Também pode ser observada uma interação diferente com a cepa MRSA, pois na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ não foi observada a toxicidade no escuro presente na cepa ATCC deste ensaio e nas cepas de *S. aureus* do ensaio anterior. Al-Muitari *et al.* (2018) destacou em seu estudo que algumas cepas de *S. aureus* podem apresentar perfil diferenciado para aPDI. Apostolidou *et al.* (2024) testou a incorporação de porfirinas (H2-T(MePy)P(I4); Zn-T(MePy)P(I4); Zn-T(MePy)P(Cl4)) em hidrogéis peptídicos (dipeptídeo Fmoc- Phe- Phe) frente a cepas de *S. aureus* em que teve seu melhor resultado com a Zn-T(MePy)P(I4) que apresentou 35% de viabilidade celular com 60 min de irradiação (LED 10 mW/cm^2 , 36 J/cm^2). A base polimérica quando testada sem o FS também demonstrou inativação (50%), inclusive no escuro. No presente estudo (Figura 25 e 26), pode ser observado que a base polimérica tanto com e sem ureia ou com e sem irradiação não apresentou atividade, o que indica que o efeito fotodinâmico observado é totalmente da interação da formulação+ZnPHexil com as cepas.

Hanakova *et al.* (2014) demonstrou que ZnPMetil foi eficaz em cepas de *S. aureus* ATCC quando complexado a β -ciclodextrina em concentrações de 3,125 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ porém utilizando 45 min de pré-irradiação e 56 min de irradiação (LED $\lambda = 414 \text{ nm}$, 150 J/cm^2). Shabangu *et al.* (2020a) testou três porfirinas neutras de Zn (II) (ZnT-4-PyP; ZnT-2-ThP; ZnM4HPTri-2-ThP) combinadas com nanopartículas de prata (AgNPs) contra MRSA e a total inativação da cepa foi alcançada com 60 min de irradiação (LED, $\lambda = 595 \text{ nm}$, 40 J/cm^2).

Em outro estudo, Shabangu *et al.* (2020b) testou o conjugado de AgNPS com mono-carboxi-porfirinas (ZnMBATriPFPP; ZnMBATriPP; ZnMBATri-2-ThP) em concentração de $0,36 \mu\text{g/mL}$, porém utilizando pré irradiação de 30 min e o melhor resultado obteve redução de 6 logs para o sistema ZnMBATri-2-ThP-AgNPs, porém com 75 min de irradiação (LED, $\lambda = 595 \text{ nm}$, 40 J/cm^2). Desta forma, pode ser destacado que as formulações testadas no presente estudo obtiveram total inativação com apenas 3 min de irradiação, tempo muito inferior quando comparado aos estudos da literatura, o que se torna uma grande vantagem na adesão pelo menor tempo do tratamento e exposição do paciente. Além disso, o objetivo foi alcançado

com a menor concentração testada nos ensaios ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), uma vez que infecções cutâneas com *S.aureus* MRSA são frequentes no ambiente hospitalar e atualmente na comunidade e que se tem dificuldade nas alternativas terapêuticas, as formulações com incorporação de ZnPHexil desenvolvidas e testadas se tornam uma alternativa a ser mais explorada para compor outra opção de tratamento tópico, além da mupirocina pomada 2%, e em associação com outros agentes antimicrobianos orais ou intravenosos (Li ; Mooney, 2016; Apostolidou *et al.*, 2024).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A metaloporfirina ZnPHexil é mais efetiva em menor concentração que a ZnPEtil como fotossensibilizadora *in vitro*, mesmo com a produção de espécies reativas de oxigênio sendo semelhantes para ambos sistemas;
- Foram observados melhores resultados até 2 min para a fotoativação com 410 nm (47,61 mW/cm²) quando comparadas à irradiação em 450 nm (48,7 mW/cm²) para ZnPHexil no estudo para geração de EROs, mas ambas podem ser aplicadas desde que seja feito ajuste no tempo de irradiação;
- O polímero HEC se mostrou mais compatível com ZnPHexil que os polímeros ALG e CBP;
- Adição dos excipientes, propilenoglicol e ureia aumentaram a espalhabilidade dos géis de HEC, sendo a amostra com ureia a que demonstrou a maior produção de EROs e o pH mais próximo da solução;
- O método de leitura de microplaca não foi reprodutível, sendo a contagem de UFC o mais adequado para quantificar a aniquilação celular;
- As amostras tanto em solução quanto incorporadas em hidrogéis demonstraram total inativação fotodinâmica, sendo que no caso dos hidrogéis não ocorreu toxicidade no escuro na cepa MRSA na maior concentração testada;
- As formulações com ZnPHexil e com o agente umectante ureia, se mostraram adequadas e totalmente efetivas para aplicação em infecções de *S.aureus* resistentes na concentração de 1 µmol L⁻¹ e no tempo de 3 minutos.

Como perspectivas:

- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação das zinco-porfirinas;
- Realizar testes com menores concentrações de hidrogéis/ZnPHexil e no tempo de 1 minuto;
- Finalizar os testes de estabilidade preliminares dos hidrogéis: viscosidade e tempo de armazenamento;
- Realizar testes de citotoxicidade, permeação cutânea e sensibilidade térmica a partir das formulações selecionadas no estudo.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.
- ADLER, A. *et al.* Mechanistic investigations of porphyrin syntheses. I. Preliminary studies on ms-tetraphenylporphin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 15, p. 3145-3149, 1964.
- AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.
- ALENEZI, K. *et al.* Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 17, p. 154-159, 2017.
- AL-MUTAIRI, R. *et al.* Sublethal Photodynamic Treatment Does Not Lead to Development of Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. July, p. 1–9, 2018.
- ALÓS, J. I. Antibiotic resistance: A global crisis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692–699, 2015.
- ALVES, E. *et al.* An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 2, p. 141-164, 2014.
- AMOS-TAUTUA, B. M.; SONGCA, S. P.; OLUWAFEMI, O. S. Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. **Molecules**, v. 24, n. 13, 2019.
- ANDRADE, C. G. *et al.* Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*. **Photochemical ; Photobiological Sciences**, v. 17, n. 4, p. 482-490, 2018.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 1. Ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- APOSTOLIDOU, C. P. *et al.* Antimicrobial Potency of Fmoc-Phe-Phe Dipeptide Hydrogels with Encapsulated Porphyrin Chromophores Is a Promising Alternative in Antimicrobial Resistance. **Biomolecules**, v. 14, n. 2, p. 226, 2024.
- ARAUJO, E. A. **Inativação fotodinâmica de microrganismos utilizando azul de metileno em solução aquosa e formulação gel**. Tese. Doutorado, Centro de Materiais, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2021.
- BAPTISTA, M. S. *et al.* Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. **Photochemistry and photobiology**, v. 93, n. 4, p. 912-919, 2017.
- BAPTISTA, M. S. *et al.* Photosensitization reactions of biomolecules: definition, targets and mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 97, n. 6, p.1456-

1483, 2021.

BARBOSA, Á. P. C. **Biofilmes e resistência antibiótica nas infecções do trato respiratório superior**. 2015. 76 f. Projeto de pós-graduação da Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção de título de mestre em ciências farmacêuticas. Porto.

BASSETTI, Matteo et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in coronavirus disease 2019: how common?. **Current opinion in infectious diseases**, v. 35, n. 2, p. 149-162, 2022.

BATINIĆ-HABERLE, I. et al. Manganese (III) meso-tetrakis(ortho-N-alkylpyridyl) porphyrins. Synthesis, characterization, and catalysis of $Q^{\cdot-}$ dismutation. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v.13, p. 2689-2696, 2002.

BENOV, L. et al. Isomeric Nalkylpyridylporphyrins and their Zn (II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 402, n. 2, p. 159–165, 2002.

BENOV, L. Photodynamic therapy: current status and future directions. **Medical principles and practice**, v. 24, n. Suppl. 1, p. 14-28, 2015.

BRAGA, M.A.N. **Estudo comparativo de processo cicatricial cutâneo em ratos com uso de solução de papaína a 2% e laser algaínp de baixa potência**. 2017. Dissertação - Mestrado em Biociência Animal, Universidade de Cuiabá, UNIC, 2017.

BRASÍLIA: Ministério da Saúde, 2023. BRASIL. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único De Saúde (CONITEC).

BRETÓN-MARTÍNEZ, J. R. et al. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in children. **Revista Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia**, p. 22, 2024.

BRISTOW, R. et al. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis, **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 3, p. 162–167, 2006.

CABRAL FILHO, P. E. et al. Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatfrom to target transferrin receptors in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2788-2796, 2018.

CASTRO, P. M. et al. Hydrogels Containing Porphyrin-loaded Nanoparticles for Topical Photodynamic Applications. **International Journal of Pharmaceutics**, 2016.

CACURO, T. A.; WALDMAN, W. Alginate and its use as pH-sensitive polymer. **Revista Virtual de Quimica**, v. 10, n. 5, p. 1607–1617, 2018.

CASU, C.; FANULI, M.; VIGANÒ, L. Photodynamic therapy for oral candidosis: a

new option?. **J Photochem Photobiol B**, v. 158, p. 267-273, 2018.

CAVALCANTE, T. T. A. **Análise do potencial antimicrobiano de lectinas e outras substâncias naturais frente a bactérias orais**. 2012. Tese. Doutorado em bioquímica na Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012, 204 f.

CHARARA, M. *et al.* Post-illumination cellular effects of photodynamic treatment. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–19, 2017.

CHRISTAKI, E. *et al.* Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of molecular evolution**, v. 88, n. 1, p. 26-40, 2020.

CORREIA, N. M. *et al.* Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p.74-78 jan/mar. 2005.

COURVALIN, P. Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease?. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 405-407, 2016.

DARBY, E. M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280-295, 2023.

DA SILVA PATIAS, I. *et al.* Estabilidade e atividade antifúngica de nanoemulsão contendo óleo de gerânio incorporada em hidrogel. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 17, n. 2, p. 269-283, 2016.

DEHNE, H.; HECHT, F. M.; BAUSCH, A. R. The mechanical properties of polymer-colloid hybrid hydrogels. **Soft Matter**, v. 13, n. 27 :p. 4786–4790, Jun/2017.

DIAS JÚNIOR, L. C.; NOVO, J. B. M. Software para simulação de mecanismo de supressão da luminescência: modelo cinético de Stern-Volmer. **Química Nova**, v. 37, p. 361-366, 2014.

DE PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 5, p. 897-910, 2005.

DE QUEIROZ, G. M. *et al.* Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. São Paulo, v. 10, n. 2, p. 132-8, 2012.

EZZEDDINE, R. *et al.* Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn(2) N-Alkylpyridylporphyrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36579–36588, 2013.

FALCONE, M. *et al.* Considerations for the optimal management of antibiotic

therapy in elderly patients. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 22, p. 325-333, 2020.

FALCONE, M.; TISEO, G. Skin and soft tissue infections in the elderly. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 36, n. 2, p. 102-108, 2023.

FERNÁNDEZ, L; BREIDENSTEIN, E. B. M; HANCOCK, R. E. W. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2011.

FLORENCE, N; NAOREM, H. Dimerization of methylene blue in aqueous and mixed aqueous organic solvent: A spectroscopic study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 198, p. 255-258, 2014.

FONG, Wing-Ping *et al.* Photodynamic therapy. In: **Handbook of photonics for biomedical engineering**. Springer Science Business Media, p. 657-681, 2017.

FONTANA, C. R. *et al.* Evaluation of chitosan gel as antibiotic and photosensitizer delivery. **Drug Delivery**, v. 15, p. 417-422, 2015.

FOWLER, V. G. *et al.* Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. **Jama**, v. 293, n. 24, p. 3012-3021, 2005.

FRIEDERMANN, G. R. **Estudo de porfirinas base livre e seus derivados de manganês por eletroquímica e espectro-eletroquímica de RPE e UV-Vis**. Tese - Doutorado, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Curitiba, 2005. 224 p.

GARCEZ, A. S. *et al.* Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia. **Elsevier**, p.259, 2012.

GONZALEZ-DELGADO, Jose A. *et al.* Hydrogels containing porphyrin-loaded nanoparticles for topical photodynamic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 1, p. 221-231, 2016.

GNANASEKAR, S. *et al.* Recent advances in engineered polymeric materials for efficient photodynamic inactivation of bacterial pathogens. **Bioactive Materials**, v. 21, p. 157-174, 2023.

HAMBRIGHT, P. *et al.* **Porphyrin-Methylpyridinium-Indium(III) Complex**, *Inorganic Syntheses*, v. 23, 55-59, 1985.

HAMILTON, F.; MACGOWAN, A. A long history of β -lactams for MRSA. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1604-1605, 2019.

HANAKOVA, A. *et al.* The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. **Microbiological research**, v. 169, n. 2-3, p. 163-170, 2014.

HATLEN, T. J.; MILLER, L. G. *Staphylococcal* skin and soft tissue infections. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 1, p. 81-105, 2021.

HOLMES, A. H. *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2016.

ISSA, M. C. A.; MANUELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, Rio de Janeiro; July/Aug. 2010.

ITO, A. S. **Espectroscopia de fluorescência no estudo de sistemas de interesse biológico**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 1994.

JEFF, B. *et al.* Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v.23, p.648-650, 1997.

JUNQUEIRA, M. V. *et al.* Functional polymeric systems as delivery vehicles for methylene blue in photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 32, n. 1, p. 19-27, 2016.

KAMALY, N. *et al.* Development and in vivo efficacy of targeted polymeric inflammation-resolving nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6506-6511, 2013.

KOSSAKOWSKA-ZWIERUCHO, M. *et al.* Farnesol potentiates photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* with the use of red light-activated porphyrin TMPyP. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 206, p. 111863, 2020.

KNORST M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides***. 1991. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-RS. 1991. 257 f.

KRALJIĆ, I., MOHSNI, S. El. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, n. 4, p. 577–581, 1986.

LEUNG, B. *et al.* Development of thermosensitive hydrogel containing methylene blue for topical antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry ; Photobiology, B: Biology**, v. 203, n. June 2019, p. 111776, 2020.

LEE, J. H. Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. **Journal of Microbiology**, v. 57, p. 181-184, 2019.

LI, J.; MOONEY, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 12, p. 1-17, 2016.

LIANG, H. *et al.* Optimization of hydrogel containing toluidine blue O for photodynamic therapy by response surface methodology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 389-396, 2017.

LOPES, A. C. *et al.* Análise físico-química comparativa de sabonetes líquidos. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 2, 2018.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p. 793–796, 2011.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1891–1894, 2013.

MELO, C.A.S.; DOMINGUES, R.J.S.; LIMA, A.M. Elaboração de géis e análise de estabilidade de medicamentos. **EDUEPA**, Belém, 2018.

MEMAR, M. Y. *et al.* Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: Current insights. **Infection and drug resistance**, p. 567-576, 2018.

MERCHAT, M. *et al.* Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 3, p. 153-157, 1996.

METE, E. *et al.* Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* using tetraethylene glycol-substituted Zn (II) phthalocyanine. **Biotechnic ; Histochemistry**, v. 96, n. 4, p. 311-314, 2021.

MOGHNIE, S. *et al.* Cationic amphiphilic Zn-porphyrin with high antifungal photodynamic potency. **Photochemical ; Photobiological Sciences**, v. 16, p. 1709-1716, 2017.

MONTEIRO, F. R. B.; DE MELO TAVARES, R. C.; DE VASCONCELOS, T. C. L. Desenvolvimento de forma semissólida contendo blenda de polímeros com cafeína e extrato de semente de uva aplicando planejamento fatorial. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 47777-47790, 2020.

MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 30, n. 4, p. 619-635, 2020.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

NAGATA, J. Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 9, n. 2, p. 122-131, 2012.

NASCIMENTO, B. J.; CARSTENSEN, S. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina: uma análise da presença na microbiota nasal de estudantes de saúde em período de estágio. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, p. 411-417, 2021.

OLIVEIRA, K T. *et al.* Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, São Carlos, Sp, v. 1, n. 7, p.310-335, 2015.

PARMAR, N. Antibiotics in the non-surgical treatment of peri-implantitis. **Evidence-Based Dentistry**, v. 24, n. 2, p. 69-70, 2023.

PEÇANHA, M. P.; FERREIRA, J. J. C.; DINIZ, A. L. Investigação da ação antimicrobiana da luz azul contra diversos agentes de infecção hospitalar. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, 2018.

PRESTES, P. S. *et al.* Avaliação da estabilidade físico-química de emulsão acrescida de ureia dispersada, ou não, em propilenoglicol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, 2009.

QUEIROZ, H. A. *et al.* Synergistic activity of diclofenac sodium with oxacillin against planktonic cells and biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Future Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 375-387, 2021.

RAHIMI, R.; FAYYAZ, F.; RASSA, M. The study of cellulosic fabrics impregnated with porphyrin compounds for use as photo-bactericidal polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 661-668, 2016.

REBOUÇAS, J.S.; DE CARVALHO, M.E.M.D.; IDEMORI, Y.M. Perhalogenated 2-pyridylporphyrin complexes: synthesis, self-coordinating aggregation properties, and catalytic studies. **J Porphyr Phthalocya**, v.06, p.50-57, 2002.

RODRIGUES, C. H. *et al.* Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, p. 102315, 2021.

SANTOS, L. B. M. **Aplicação de zinco-porfirina e azul de metileno em gel e avaliação para uso em terapia fotodinâmica**. 2016. Dissertação. Mestrado do Programa em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016, 69 f.

SALAM, Md A. *et al.* Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. In: **Healthcare. MDPI**, 2023. p. 1946.

SALIMIYAN, R. K. *et al.* Application of bacterial shuttle vectors in designing new vaccines against infectious diseases: brief report. *Tehran University of Medical Sciences Journal*, v. 76, n. 9, p. 637-641, 2018.

SEBASTIAN, A. *et al.* Protolytic behavior of water-soluble zinc (II) porphyrin and the electrocatalytic two-electron water oxidation to form hydrogen peroxide. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 400, p. 112619,

2020.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H.P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 47, 2013.

SHABANGU, S. M. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy of asymmetric porphyrin-silver conjugates towards photoinactivation of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 593-608, 2020.

SHABANGU, S. M. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-silver nanoparticle mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Journal of Luminescence**, v. 222, p. 117158, 2020.

SIMÕES E SILVA, A. C.; OLIVEIRA, E. A. Update on the approach of urinary tract infection in childhood. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 6, p. S2–S10, nov. 2015.

SILVA, J. M. et al. Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus spp.* multirresistentes de mastite bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 805–810, 2016.

SMART, J. D. et al. The retention of C-labelled poly(acrylic acids) on gastric and esophageal mucosa: an in vitro study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.20, n.6, p.83-90, 2003.

SOUZA, S. O. et al. Photoinactivation of yeast and biofilm communities of *Candida albicans* mediated by ZnTnHex-2-PyP4⁺ porphyrin. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 556, 2022.

SOUZA, Tiago HS et al. Advances on antimicrobial photodynamic inactivation mediated by Zn (II) porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 49, p. 100454, 2021a.

SOUZA, Tiago HS et al. Efficient photodynamic inactivation of *Leishmania* parasites mediated by lipophilic water-soluble Zn (II) porphyrin ZnTnHex-2-PyP4⁺. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1865, n. 7, p. 129897, 2021b.

SORBELLINI, E.; RUCCO, M.; RINALDI, F. Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 7, p. 1431-1439, 2018.

SKWOR, T. A. et al. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: A metalloporphyrin comparison. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 165, p. 51-57, 2016.

TARASZKIEWICZ, A. *et al.* Innovative strategies to overcome biofilm resistance. **BioMed research international**, v. 2013, n. 1, p. 150653, 2013.

THOMAS, M. *et al.* Amphiphilic cationic Zn-porphyrins with high photodynamic antimicrobial activity. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 709–724, 2015.

TOFFOLI, D. J. **Caracterização espectroscópica de complexos Hipocrelina B: Lantanídeos para uso em terapia fotodinâmica**. Dissertação. Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TOVMASYAN, A. *et al.* Differential Coordination Demands in Fe versus Mn Water-Soluble Cationic Metalloporphyrins Translate into Remarkably Different Aqueous Redox Chemistry and Biology. **Inorg Chem**, v.52, p.5677-5691, 2013.

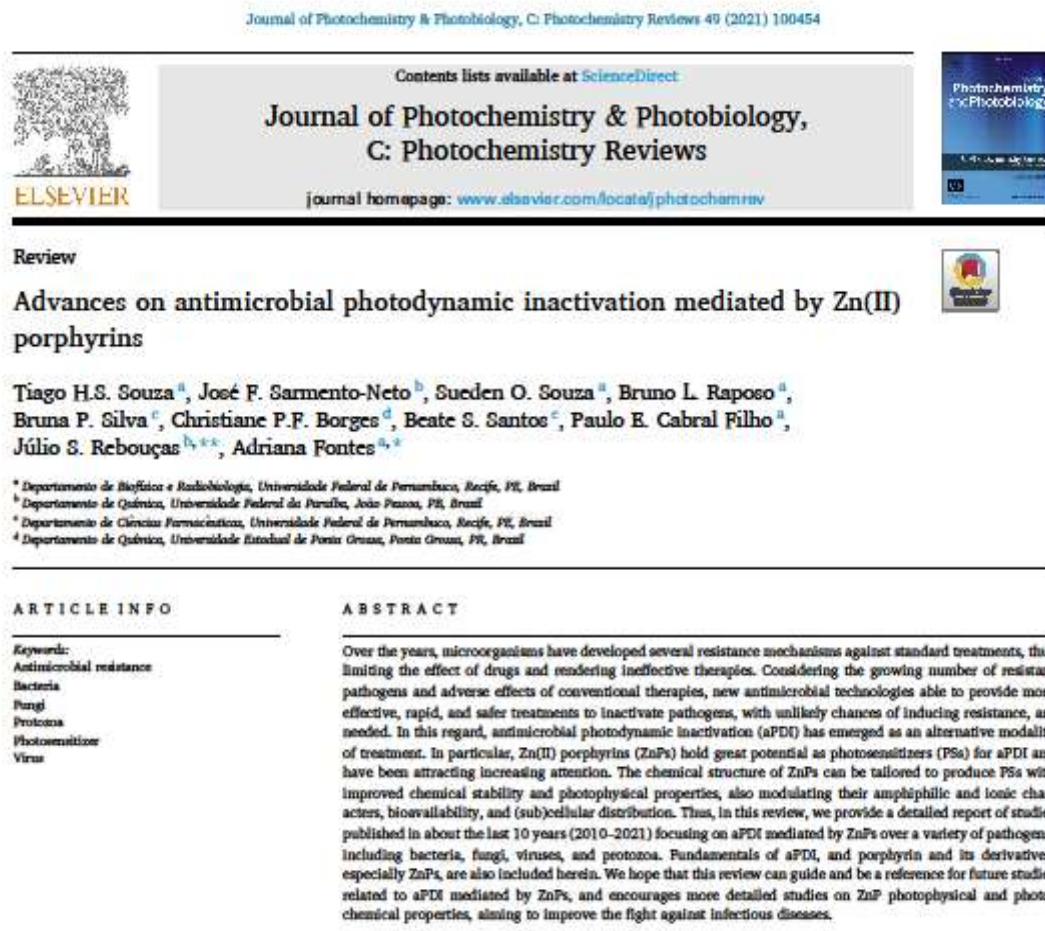
VARGAS, P. N. *et al.* Formulações semissólidas contendo meloxicam nanoencapsulado: estudos de liberação “in vitro”. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 14, n. 1, p. 35-44, 2013.

VIANA, O. S. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados à base de quantum dots livres e associados à porfirinas para aplicação em sistemas biológicos**. 2015. Tese. Doutorado, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2015.

VIANA, O.S. *et al.* Comparative study on the efficiency of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* using CdTe quantum dots, Zn(II) porphyrin and their conjugates as photosensitizers. **Molecules**, v. 20, p. 8893–8912, 2015.

YAMANE, L. T. **Avaliação de formulações tópicas contendo extrato etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (jambu), associado a óleo essencial de *Achyrocline satureioides* LAM (Macela)**. 2016. Dissertação. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. 2016. 81 f

APÊNDICE 1: artigo publicado no Journal of Photochemistry & Photobiology, C: Photochemistry Review. Fator de impacto: 13.6. Aceito em Setembro/2022.



1. Introduction

The development of the first natural and synthetic antimicrobials improved considerably the human quality of life, due to the possibility of effective control of several infectious diseases. Nevertheless, some factors, such as inadequate antimicrobial therapy, adaptive conditions, the indiscriminate use of available drugs, and climate variability, created evolutionary conditions for the arising of resistant populations of microorganisms that were previously sensitive [1–3]. Antimicrobial resistance is a global threat that is continually increasing, culminating in multidrug-resistant (MDR) microorganisms. According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), approximately 2.8 million antibiotic-resistant infections occur per year only in the USA, and more than 35,000 people die as a result [4]. These numbers are unknown in

other jurisdictions, but are likely to be substantially higher in African and Asian countries [4,5].

Besides the emergence of MDR microorganisms, the indiscriminate use of antibiotics can lead to side effects, including nephrotoxicity and hepatotoxicity, reproductive disorders, immunological changes, and deleterious effects on gut microbiota in humans [6]. Although antibiotics have been proven to be lifesaving medicines, it is worth noting that this class of antimicrobials is not harmless to the host. The ideal treatment should inactivate the maximum number of pathogenic microorganisms to eliminate or limit the growth of the surviving pathogens, seeking not to cause side effects on the host's tissue [7].

Antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI) appears as a promising alternative as it can offer fast and localized inactivation of the pathogenic microorganisms, without affecting the adjacent healthy

* Corresponding author at: Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

** Corresponding author at: Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil.

E-mail addresses: jreboucas@quimica.ufpb.br (J.S. Rebouças), adriana.fontes@ufpe.br (A. Fontes).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2021.100454>

Received 2 June 2021; Received in revised form 2 September 2021; Accepted 10 September 2021

Available online 11 September 2021

1389-5567/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

tissues, which often contributes to better cosmetic results than standard treatments in the vast majority of skin lesions [8]. The aPDI basic principle involves a photosensitizer (PS), which is activated through the use of a light source at a wavelength resonant with the PS absorption band. Activated PS generates reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen, superoxide, and its progeny, which induce the target microorganism to death [9–11]. aPDI effects are limited to the PS accumulation and irradiation sites. Given the high reactivity of ROS toward the cell components, ROS may impair multiple intracellular targets, which reduces the probability of the cell developing resistance mechanisms [9–13]. Thus, aPDI is a topical therapy that should be able to kill multiple classes of microbial cells applying relatively low PS concentrations and low light fluences [14–16].

In search of safer treatments to the host, aPDI takes advantage of a proper combination of (i) a local treatment, (ii) an effective (intra) extracellular antioxidant system in the healthy mammalian cells (as opposed to impaired or sensitive antioxidant systems in microorganisms or non-normal host cells), and (iii) the PS intracellular location.

For minimizing cytotoxicity to mammalian cells, it is important to choose the appropriate PS. The PS should be nontoxic in the dark and show reasonable selectivity by microbial cells when compared to host mammalian cells [14]. Over the years, several classes of new PSs have been studied. Many of PSs utilized for aPDI studies have the macrocyclic tetrapyrrole nucleus, such as porphyrins, phthalocyanines, chlorins, and bacteriochlorins. Other PSs include texaphyrins, phenothiazines (methylene blue class), nanoparticles, fullerenes, among others. However, porphyrins are one of the most widely used [17–21].

Porphyrins have interesting features and advantages for aPDI, such as (i) low *in vitro* or *in vivo* dark toxicity, (ii) high-efficiency for intracellular ROS generation and especially high quantum yields (Φ) for $^1\text{O}_2$ generation, and (iii) structural versatility allowing the modulation of their amphiphilicity and ionic characters, facilitating the bioavailability and interactions with cellular structures [22–24]. Metalloporphyrin complexes with Zn(II) have the potential to show improved characteristics, being PSs even more effective than its free base analogues. The metal complexation increases the porphyrin chemical stability and may enhance their interaction with cell membranes. Besides, complexes with Zn(II) have higher $\Phi^1\text{O}_2$, since diamagnetic metals promote intersystem

crossing and have a long triplet lifetime. Another advantage of employing Zn(II) porphyrins (ZnPs) in aPDI is that Zn(II) is a natural component of human physiology [24–26].

Therefore, the present review aims to provide a comprehensive report on aPDI-related studies mediated by different ZnPs as PSs, published in the literature in the last ten years (2010–2021), offering a background to future research directions.

1. Photodynamic fundamentals

aPDI therapy is strictly dependent on the close interaction of three components: (i) an appropriate PS, (ii) oxygen, and (iii) a light source resonating with the PS absorbance. This technology involves two steps: first, the administered PS is accumulated in or near the target cell/tissue; and in a second moment, the system is illuminated by a light source suitable for the chosen PS [27].

Fig. 1 illustrates the reactions involved in aPDI. The process is based, initially, on the activation of the PS ground singlet state (^1PS) by a light source. After absorption of photons, electrons are promoted to a higher energy level, resulting in a PS excited singlet state ($^1\text{PS}^*$) that has a short lifetime. When electrons return to the original state, $^1\text{PS}^*$ loses energy in the form of fluorescence ($^1\text{PS}^* \rightarrow ^1\text{PS}$, fluorescence). Electrons (e^-), however, can also perform intersystem crossing through spin change, moving to a PS excited triplet state ($^3\text{PS}^*$). $^3\text{PS}^*$ is less energetic than $^1\text{PS}^*$, however, it has a longer lifetime (microseconds range), in contrast with the nanosecond order associated with $^1\text{PS}^*$. Thus, the return of these molecules to ^1PS involves loss of energy by a process named as phosphorescence ($^3\text{PS}^* \rightarrow ^1\text{PS}$ + phosphorescence). This longer lifetime allows $^3\text{PS}^*$ to eventually react with nearby molecular oxygen or surrounding molecules by two photochemical pathways, known as Type I and Type II pathways [11,27].

The Type I reaction pathway involves charge transfer between $^3\text{PS}^*$ and surrounding molecules. If $^3\text{PS}^*$ receives electrons from surrounding molecules, for example from NADH, the reduced form of PS (PS^-) can donate an electron to $^3\text{O}_2$ (called here as O_2), generating the ROS superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and restoring PS [28]. Alternatively, $^3\text{PS}^*$ may transfer electrons to O_2 , generating directly $\text{O}_2^{\cdot-}$ along with PS^+ that may be regenerated by oxidizing a nearby biomolecule [17,28–30].

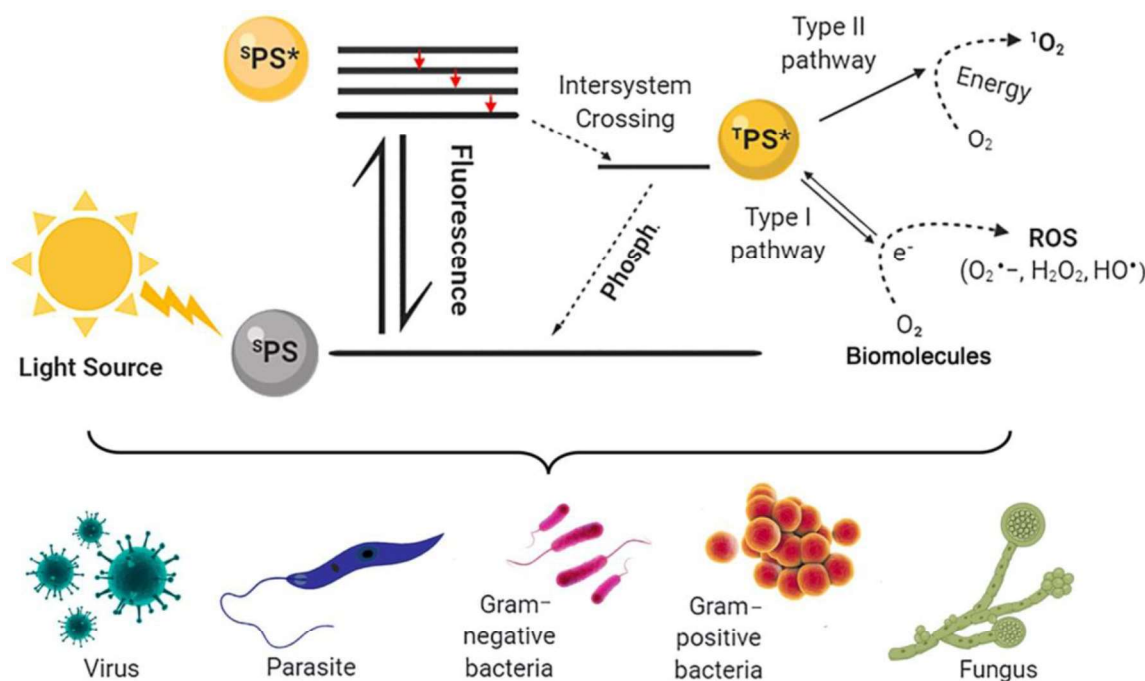


Fig. 1. General mechanism involved in aPDI to generate reactive oxygen species-mediated upon light absorption. PS – photosensitizer, Phosph. – phosphorescence.

Once formed, $O_2^{\cdot -}$ may suffer dismutation catalyzed by superoxide dismutase (SOD) giving rise to hydrogen peroxide (H_2O_2) and O_2 . H_2O_2 , in turn, may be transformed into H_2O and O_2 by the catalase enzyme or scavenged by the peroxidase systems. If accumulated H_2O_2 is subjected to homolytic breakdown *via* the Fenton reaction, the hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) is generated, which reacts at high diffusion rates with any cellular component, such as membrane lipids and proteins, without any defense mechanism [31,32]. In addition to the Fenton reaction, $HO^{\cdot}$ can be generated from the interaction of reduced PS ($PS^{\cdot -}$) with H_2O_2 [30]. If the catalytic antioxidant systems of the photosensitized cell are either impaired or unable to cope with the concentration of superoxide or hydrogen peroxide, any of these ROS species or their progenies may lead to cell damage and/or death [10].

On the other hand, in the Type II reaction pathway, $^1PS^*$ transfers energy directly to triplet state molecular oxygen to form singlet oxygen (1O_2), an excited oxygen form. 1O_2 is a powerful oxidant capable of damaging almost all types of biomolecules. Due to 1O_2 short lifespan of approximately 10–320 nanoseconds, their reactivity is controlled by diffusion and is limited to approximately the distance of 10–55 nm from its generation site. Thus, the action of 1O_2 is restricted to the site of PS accumulation within the cell. Both Type I and Type II reactions can occur simultaneously, and the distribution between these processes depends, for example, (i) on the type of PS used and (ii) on the concentrations of substrate (biomolecules) and molecular oxygen [9,11,31].

In general, regardless of the type of ROS formed, intracellularly generated ROS in target cells are extremely unstable. They are capable, however, of damaging several biological components, such as proteins, lipids, and nucleic acids, in a wide range of microorganisms regardless of their structure or resistance to drugs, likely resulting in functional defects and eventually culminating in the death of the microorganisms [27, 33]. Another factor responsible for improving the efficacy of photodynamic treatment is the appropriate choice of the light source with respect to the PS photophysical requirements.

1.1. Light sources and application parameters

The literature presents three main classes of light sources for aPDI/PDT: laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), LED (*Light Emitting Diodes*), and halogen lamps [34]. The optimization of the treatment with the different light sources is related to the application parameters, such as; (i) average power, (ii) wavelength range, (iii) irradiance, (iv) continuous or pulsed irradiation, and (v) time of irradiation/treatment [35].

The knowledge about light dosimetry of photodynamic treatment with the definition of physical parameters is relevant for a successful application of aPDI. It is important to know the average power of the light source used to calculate the irradiance to be administered. Fluence rate or irradiance refers to the ratio between the light output power per area, expressed usually as mW/cm^2 . The control of irradiance is also important to avoid thermal damage in *in vitro* and *in vivo* treatments [35–39].

Radiant exposure or dose (light) are definitions also applied and refer to the amount of energy applied to the sample per area (J/cm^2). The energy is calculated using the average power (in Watts) $\times$ time of irradiation (in seconds). Frequently, light dose or dose are terms more often used in clinical studies than in *in vitro* studies [37–39].

Once the application parameters have been established, another factor responsible for the efficacy of photodynamic treatment is the appropriate choice of PS. In this regard, it is important to consider the PS physicochemical characteristics, such as; charge, amphiphilicity, and ROS generation efficiency.

1.2. Porphyrins as photosensitizers

Porphyrins and their derivatives have been the most widely studied PSs. They are a tetrapyrrolic macrocycle connected by four methine

($-CH=$) groups [23]. The four central nitrogen atoms are appropriate to chelate a chemical element, usually a metal, resulting in a metalloporphyrin. Porphyrins can be obtained naturally, but have an enormous structural diversity compatible with synthetic designs [40,41].

The spectroscopic properties of porphyrins are very characteristic, with well-defined bands of intense electronic absorption in the visible region (vis), due to the high π conjugation of the ring [42,43]. The most intense band (molar absorptivity of $\sim 10^5 L mol^{-1} cm^{-1}$) is known as the Soret band, usually located around 420 nm. The other smaller bands, between 500 and 800 nm, are known as Q bands, represented in Roman numerals in order of increasing energy (Fig. 2A). The total number of bands and their relative intensity ratio are influenced by factors such as the chemical nature of the substitution groups, solvent, pH, concentration, and interaction between porphyrins in solution (aggregation). In the case of metalloporphyrins, its formation from the corresponding free-base ligand is followed by an increase in the local symmetry of the porphyrin ring from D_{2h} to D_{4h} , leading to a decrease in the number of electronic transitions and, thus, a reduction in the number of bands. Whereas metallation is usually accompanied by some shift in the Soret band, the most characteristic spectral feature is the disappearance of the Q bands, which are generally replaced with two bands, named α and β , as in ZnPs (Fig. 2B). The overall electronic spectrum profile reflects characteristics of the central metal cation: size, location in the periodic table, coordination number, and oxidation state [42,43].

Porphyrin photophysical properties, such as a long lifetime of triplet state ($^1PS^*$) and high quantum yield in ROS generation, make them suitable PS for photodynamic processes [23,40,41]. Macrocyclic structural changes can be designed in order to: (i) modulate the lipophilic or ionic character of porphyrin [11,17,18], (ii) bring greater uptake selectivity to the target tissue [11,23], and (iii) facilitate the excretion from organism in photodynamic post-treatment, minimizing side effects [11,17,47–55,18,23,39–41,44–46]. The first porphyrin-based PS approved for clinical use in the 90s was Photofrin, a semi-synthetic polymer derived from the natural-origin compound hematoporphyrin. Photofrin is used in countries as USA, Japan, Canada, and Russia for PDT treatment of bronchial, esophageal cancer, squamous cell carcinoma of the head and neck, intrathoracic and intraperitoneal tumors [45–50]. Nevertheless, this PS has some limitations, such as high molecular weight, high anionic character, and low photostability. Synthetic porphyrins derived from *meso*-tetraphenylporphyrins have emerged as a second generation of PSs to correct some of the limitations of Photofrin and other first-generation analogues. Their properties usually optimized by the introduction of electron withdrawing groups close to porphyrin macrocycle [40,41], facilitating intersystem crossing [11,17,18], increasing triplet state time and ROS production [11,17,47–55,18,23, 39–41,44–46]. Some of these porphyrin-based compounds include neutral, anionic, and cationic molecules [44,45,57,46,50–56]. Natural and synthetic porphyrins have been used as potent PSs in topical diseases, such as hypertrophic actinic keratosis, candidiasis, acne vulgaris, and cold sores [58–60].

The influence of charge, size, shape, accessibility, and spatial orientation of the PS affects photophysical properties as well as the uptake and cell distribution [11,18,40]. The presence of charges in porphyrins not only provides better solubility in water but can also broaden their action spectrum [11,17,18,40]. In general, the surface of cells is negatively charged, which would imply in a higher cell uptake of cationic PSs [11,18,40]. Although not yet fully understood, the mechanism of interaction of PS with external cellular barriers and uptake seems to occur through a combination of electrostatic attraction and hydrophobic interactions [61].

In some cases, such as in bacteria, there are additional factors. Anionic PSs are known to have activity against Gram-positive bacteria but not against Gram-negative bacteria [49]. The explanation for these phenomena is associated with the difference on cell surface compositions between the two types of bacteria. Gram-positive bacteria have cell surfaces composed by thick layers of peptidoglycan with the presence of

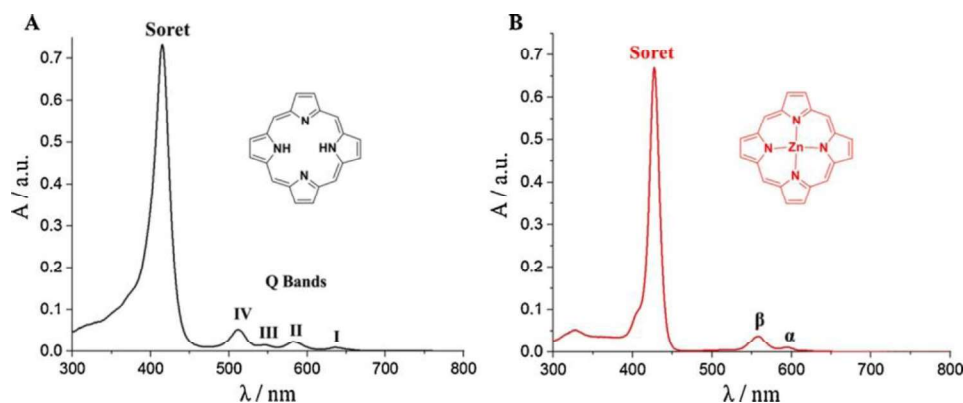


Fig. 2. Chemical structures and electronic absorption spectra of (A) a representative free-base porphyrin and (B) a representative metalloporphyrin, chelation with Zn(II).

lipoteichoic and teichoic acids arranged throughout these layers (Fig. 3A), rendering porosity that facilitates PS internalization in the cell. In its turn, the outer membrane of Gram-negative cells contains lipopolysaccharides (LPS) and sialic acid (Fig. 3B), resulting in a surface of more anionic character than that on Gram-positive bacteria membrane, and consequently of significant electrostatic repulsion to anionic PSs [11,48,49]. Merchat et al. [62] observed in a comparative study that the cationic porphyrins *meso*-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrin ($H_2TM-4-PyP^{4+}$) and *meso*-tetrakis(*N,N,N*-trimethylanilinium-4-yl)porphyrin (H_2TMAP^{4+}) inhibited the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Conversely, the anionic porphyrin *meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin ($H_2TPPS_4^{4-}$) inhibited only Gram-positive bacteria. Of note, some protozoa genera, such as *Leishmania*, *Colpoda*, and *Acanthamoeba*, have LPS in their membrane composition, a feature that resembles Gram-negative bacteria. Remarkably, *Colpoda inflata* cysts and *Leishmania major* promastigotes were also sensitive to tetracationic porphyrins [63–65].

Allied to charges, lipophilicity control improves interaction and uptake of PSs. Using $H_2TM-4-PyP^{4+}$ (Fig. 4) and its *meta* isomer $H_2TM-3-PyP^{4+}$ (Fig. 4) as models, Engelmann et al. [66] investigated how lipophilicity modulation through substitution of methyl-pyridinium groups by phenyl groups affects their interaction with liposomes, mitochondria, and photodynamic efficiency in erythrocytes. It was observed that lipophilicity alone was not sufficiently crucial. The *cis*-dicationic porphyrins $H_2DiPhDiM-X-PyP^{2+}$ ($X = 3, 4$; Fig. 4) showed the best interaction with the simulated mitochondrial membrane, which was ascribed to a combination of hydrophobic interactions by two *N*-methylpyridinium-*X*-yl groups and hydrophilic ones by the two phenyl groups [66]. Despite that, the degree of lipophilicity alone is not a guarantee of high uptake. Ricchelli et al. [67] observed, in fibrosarcoma cells (HT-1080 cells), that the uptake increases with the size of the alkyl chain in $H_2TR-4-PyP^{4+}$ ($R = CH_3, n-C_6H_{13}, n-C_{14}H_{29}$). However, the porphyrin representative with $R = n-C_{22}H_{45}$ presented a decrease in the uptake in relation to that with $R = n-C_{14}H_{29}$; aggregation in solution and size of

alkyl chains (or volume of the resulting compound) may be an important factor for these results [67].

The cell uptake distribution of the porphyrins affects not only the efficacy to kill target cells, but also influence the type of cell death [68]. When porphyrins accumulate in lysosomes, important apoptosis initiators as lysosomal cathepsins may be damaged, which predisposes cells to necrosis [67,69]. When damage takes place in the endoplasmic reticulum, SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) is damaged, Ca^{2+} dynamic is affected, and apoptosis is hindered. Golgi apparatus also leads to necrosis [70]. In the plasma membrane, minor damage induces apoptosis, but extensive damage leads to loss of membrane integrity and, consequently, necrosis. If PS is preferentially accumulated in the mitochondria, photodynamic processes may induce apoptosis depending on the level of oxidative stress, irradiation time, and light intensity [71,72].

Merchat et al. [73] evaluated the effect of free-base porphyrin increased lipophilicity on aPDI of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Cationic *N*-methylpyridinium-4-yl groups of $H_2TM-4-PyP^{4+}$ were substituted by one or two phenyl groups, reducing the total charge of the resulting compounds to +3 or +2. These PSs were more effective than $H_2TM-4-PyP^{4+}$ in both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Alves et al. [74] also observed a better activity of a tricationic porphyrin containing a *meso*-pentafluorophenyl group and three *N*-methylpyridinium-4-yl moieties ($H_2PFPhTriM-4-PyP^{3+}$; Fig. 4) when compared to $H_2TM-4-PyP^{4+}$.

Maisch's group [75] developed a *trans*- A_2B_2 -type *meso*-porphyrin-based PSs very potent against sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and *E. coli*. The design of these porphyrins consisted in two positive charges from *meta* or *para* (3-*N,N,N*-trimethylammoniumpropoxy)phenyl groups (XF70 and XF73, respectively; Fig. 4). The propyl chains render conformational flexibility to the positively charged moieties and facilitate hydrophobic interactions with the bacterial cell wall components.

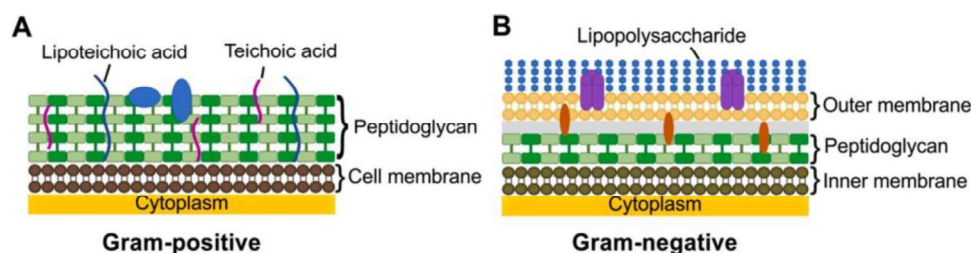


Fig. 3. Illustration of different cell surface structures and composition of bacteria. (A) Gram-positive bacteria have a thick layer of peptidoglycan external to its plasma membrane, while (B) Gram-negative bacteria have an outer lipidic membrane involving their thin layer of peptidoglycan. This outer membrane is covered by lipopolysaccharides, which enhances the negative charge of the cell wall of Gram-negative bacteria.

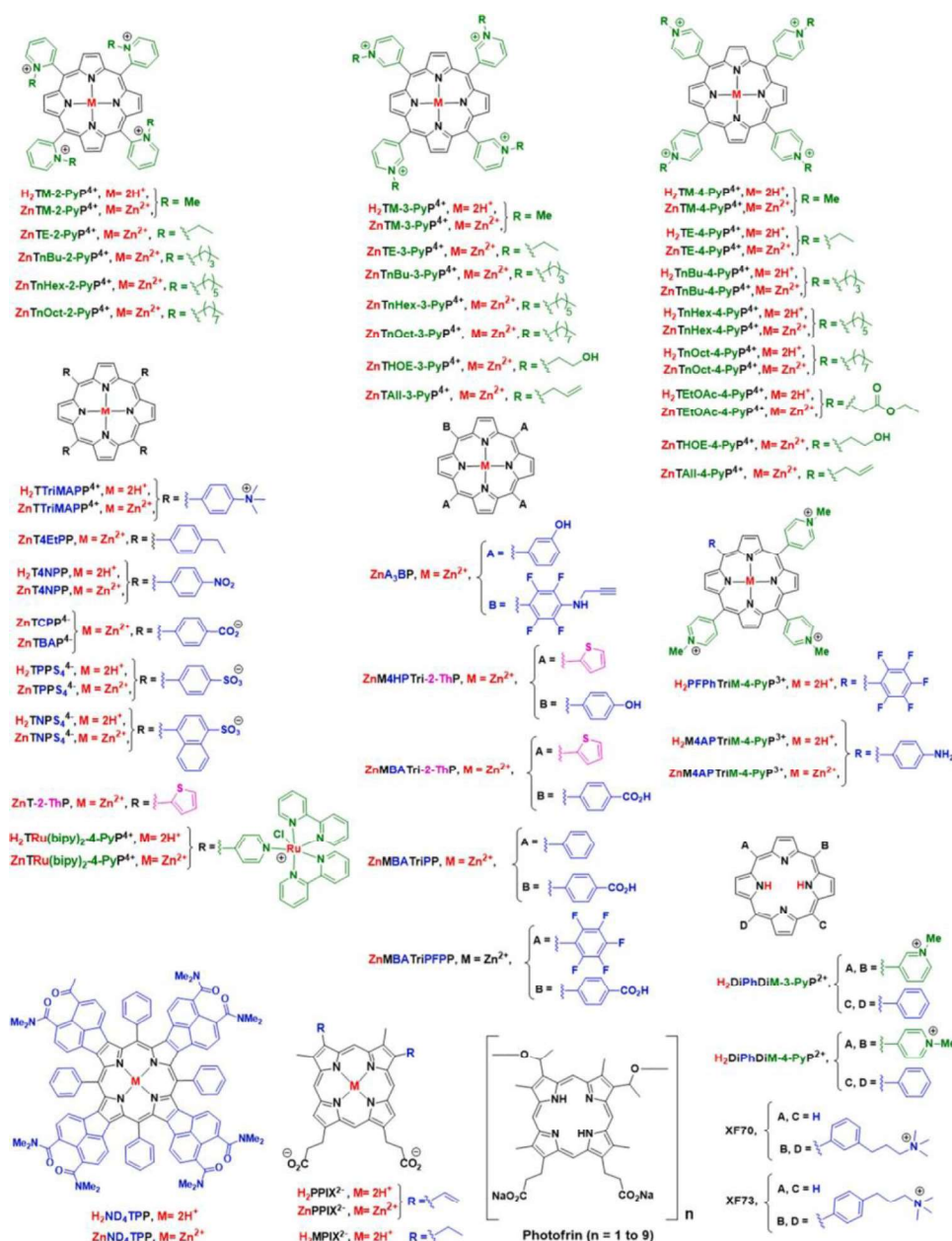


Fig. 4. Porphyrin and Zn(II)-porphyrin-based photosensitizers with corresponding acronyms.

The chelation of a diamagnetic element such as Zn(II) by the porphyrin core, to yield ZnP_s, generally results in the improvement of spectroscopic and photophysical properties, as well as the stability of porphyrin derivatives [57,76,77]. Some of the most recent studies point to Zn(II), Pd(II) and In(III) porphyrins as efficient ROS generators and better PSs against bacteria compared to their respective free-base analogues [76,78].

The methylation of the pyridyl moieties and Zn(II) insertion into the *ortho*, *meta* and *para* isomers of *meso*-tetrakis(*N*-pyridyl)porphyrins resulted in water-soluble Zn(II) *N*-methylpyridylporphyrins (ZnTM-2-PyP²⁺, ZnTM-3-PyP²⁺, and ZnTM-4-PyP²⁺; Fig. 4) of improved lifetime of triplet excited state (¹TPS*) [77]. Marydasan et al. [57] prepared two *meso*-tetraphenylporphyrin derivatives conjugated with (2,2'-dipicolylamino)methyl moieties as model systems and observed that porphyrin metallation with Zn(II) resulted in a significant enhancement of ¹TPS* lifetime and Φ¹O₂. Inserting Zn(II) in the macrocycle core as well as in

Pavani et al. [25] compared the free-base porphyrins H₂TR-4-PyP⁴⁺ (R = CH₃ or n-C₈H₁₇) with the corresponding Zn(II) complexes with respect to membrane binding to negatively-charged vesicles of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and phosphatidylglycerol (PG) (PG:DOPC ratio of 30:70 w/w), mitochondrial uptake, and photooxidation of human cervical adenocarcinoma cells (HeLa cells). The lipophilic free-base H₂TOct-4-PyP⁴⁺ had the better mitochondrial uptake, but this was not a determining factor for the better photooxidation of HeLa cells. ZnTOct-4-PyP⁴⁺ had the higher global uptake, plasmatic/mitochondrial membrane binding and ZnTOct-4-PyP⁴⁺ was the more lethal compound against HeLa cells. Cell death mediated by ZnTOct-4-PyP⁴⁺ had apoptosis features, whereas H₂TOct-4-PyP⁴⁺ led mainly to necrosis [60].

In cationic water-soluble 2-*N*-alkylpyridylporphyrins, Zn(II) metalation is often accompanied by improved lipophilicity [79,80]. Ezzeddine et al. [24] made a systematic study with *ortho*, *meta* and *para* Zn(II)

meso-tetrakis(*N*-alkylpyridinium-*X*-yl)porphyrins (*X* = 2, 3 or 4) against human colon adenocarcinoma cells. The aliphatic alkyl chains ranged from 1 to 6 carbons and showed an increasing trend between uptake and alkyl side-chain length [24]. The *ortho* hydrophilic analogue ZnTM-2-PyP⁴⁺ has cytoplasmic distribution and strong lysosomal uptake. The *meta* isomer ZnTM-3-PyP⁴⁺ was found in the nucleus and cytoplasm. The accumulation of the *para* analogue ZnTM-4-PyP⁴⁺ is predominantly nuclear [24]. Ethyl analogues ZnTE-*X*-PyP⁴⁺ (*X* = 2, 3 or 4) were found preferentially in the lysosome/cytosol, whereas the more lipophilic, hexyl analogues, ZnTnHex-*X*-PyP⁴⁺ (*X* = 2, 3 or 4), were located predominantly in mitochondria in this order of accumulation *ortho* < *meta* < *para* [24].

Benov [30] presented in his review spatial projections of these porphyrin structures explaining the 3D behavior of ZnP hexyl isomers. ZnTnHex-2-PyP⁴⁺, as it occurs with its more hydrophilic shorter side-chain analogues, is a mixture of four atropisomers and each has a specific spatial arrangement. This may result in different uptake for each atropisomer, depending on whether access to positive charges is hindered by the alkyl chains or not. ZnTnHex-3-PyP⁴⁺ does not show atropisomerism, but the access to positive charges is hampered by alkyl chains. ZnTnHex-4-PyP⁴⁺ is flatter and more flexible, with positive charges and alkyl chains rapidly accessible, resulting in higher cell uptake [24,30,79]. It is also noteworthy that the Zn(II) porphyrins with longer alkyl chains are of remarkable chemical stability against acid solvolysis in aqueous solutions, which is a relevant feature to guide storage and handling protocols, formulation strategies, and PS administration routes [81].

As mentioned before, both Type I and Type II mechanisms may occur simultaneously in aPDI, and this is not different for Zn(II) porphyrin-based PSs. The relative contributions of each process depend, among others, on the type of PS used, its concentrations and subcellular distribution/location, the surrounding biomolecules, levels of O₂ dissolved in the medium, tissue dielectric constant, and pH [9,11,31]. The most direct way to assess the competition between these pathways is to measure the quantum yields of singlet oxygen ($\Phi^1\text{O}_2$) and the production of superoxide ion independently of each other. For a comprehensive review on the design of porphyrin-based PSs and their photoinduced reactions with molecular oxygen, the reader is referred to an account by Arnaout [82].

In general, there have been very few studies dedicated to unambiguously assign the relative contributions of Type I or Type II pathways in the Zn(II) porphyrin-based aPDI processes described in the following Sections. Nonetheless, Zn(II) porphyrin-based PSs are often classified according to the $\Phi^1\text{O}_2$ formation and/or electron paramagnetic resonance (EPR) O₂^{•−} spin trapping experiments. For example, Zoltan et al. [83] reported that ZnTPPS₄^{4−} and ZnTEtOAc-4-PyP⁴⁺ porphyrins (see aPDI results in Section 3) resulted in low $\Phi^1\text{O}_2$ values and were classified as Type I PS with greater efficiency to produce free radicals. On the other hand, Pavani et al. [84] reported that ZnTM-4-PyP⁴⁺ is characterized as a Type II PS, due to the high $\Phi^1\text{O}_2$ values.

Up to now, there seem to be no clear-cut structural features to provide a single classification of ZnPs in general as Type I or Type II PSs. It is known, however, that the ability to induce the production of ROS is correlated with longer mean lifetimes of the triplet state, characteristic of porphyrin complexes with diamagnetic metals, e.g., Zn(II) [26]. Kalyanasundaram [77] reported that the triplet state lifetimes for the metal-free *N*-methylpyridylporphyrins are in the range of 1.16, 0.39, and 0.17 ms for the *ortho*, *meta*, and *para* isomers respectively, and the incorporation of Zn(II) in the tetrapyrrole ring enhances the triplet state lifetimes of the *ortho* isomer (ZnTM-2-PyP⁴⁺, Fig. 4) to 1.4 ms and to 2.0 ms for both *meta* and *para* isomers (ZnTM-3-PyP⁴⁺ and ZnTM-4-PyP⁴⁺, respectively, Fig. 4). When the metal complex porphyrin shows a high $\Phi^1\text{O}_2$ in respect to the fluorescence quantum yield (Φ_F), it may indicate that there is an increase in the efficiency of intersystem crossing [83]. It is often expected that in the Type II pathway the singlet–triplet energy gaps (ΔE_{S-T}) of the PS should be higher than 0.98 eV, which is the energy

required to produce the cytotoxic agent ($^1\text{O}_2$) in Type II photoreactions [85].

Type I pathways with ZnPs as PSs are photochemically complex and much work is still needed to fully unravel the nuances of the corresponding electron-transfer reactions on a molecular basis. In principle, the Type I reactions leading to oxygen-based radicals or biomolecule-based radicals may involve the oxidation or the reduction of the ZnP to yield ZnP^{•+} or ZnP^{•−}, respectively. Accordingly, the feasibility of such reactions depends on the redox potentials of ZnP relative to O₂ and surrounding biomolecules. The one-electron electrochemical processes of typical aPDI water-soluble ZnPs, such as ZnTM-4-PyP⁴⁺ and ZnTPPS₄^{4−}, are porphyrin ring-centered, yielding ZnP π -cation or π -anion radicals [86,87]. Concerning neutral ZnPs, such as ZnTPP, the anionic ZnPs are easier to oxidize, whereas the cationic ZnPs are more difficult to oxidize, which is consistent with the overall ionic charge of the compounds [88]. The reduction potential of the ZnP^{•+}/ZnP and ZnP/ZnP^{•−} couples (overall ionic charge of the ZnP representation is omitted) for ZnTM-4-PyP⁴⁺ are +1.18 V and −0.85 V vs. the normal hydrogen electrode (NHE), respectively; the corresponding potentials for ZnTPPS₄^{4−} are +0.87 V and −1.16 V vs. NHE, respectively [86,88]. Considering the singlet and triplet excited state energies of ZnTM-4-PyP⁴⁺ (1.98 eV and 1.63 eV, respectively) and those of ZnTPPS₄^{4−} (2.05 eV and 1.61 eV, respectively) along with the ground state redox properties, Kalyanasundaram and Neumann-Spallart [86] estimated the excited-state redox properties of these typical water-soluble ZnPs. Thus, the one-electron reduction potentials of ZnTM-4-PyP⁴⁺ for the photoredox ZnP^{•+}/ZnP* and ZnP*/ZnP^{•−} couples were −0.45 V and +0.78 V, respectively, and the corresponding values for these couples on ZnTPPS₄^{4−} were −0.75 and +0.45 V, respectively. Latimer-type diagrams summarizing these ground-state and excited-state redox processes are presented in Fig. 5. The ZnP*/ZnP^{•−} values for these ZnPs, particularly the anionic ones, imply that (i) they do not have enough driving force to abstract an electron from most biological targets (whose one-electron pseudoreduction potentials usually range from 0.5 to 2.1 V), and (ii) they are, thus, unlikely photochemical oxidants [28]. It is worth noting, however, that based on the excited reduction couple ZnP*/ZnP^{•−} for ZnTM-4-PyP⁴⁺, the possibility of this cationic ZnPs acting as photochemical oxidant of efficient biological reductants, such as ascorbate polyunsaturated fats (PUFAs) and α -tocopherol, cannot be fully ruled out at this point. The excited-state reduction couple ZnP^{•+}/ZnP* of both cationic and anionic ZnPs makes them suitable sensitizers for the photoreduction of O₂ to yield O₂^{•−} and the corresponding ZnP π -cation; the high ground-state reduction potential of ZnP^{•+} (+0.87 – +1.18 V) implies that this species may abstract an electron from most biological targets, leading to organic-based radical-chain reactions along with those related to O₂^{•−} and its progeny. It is particularly worth noting a general lack of studies investigating the fate of ZnPs after (photo)oxidation. Despite the favorable thermodynamics for the photoproduction of O₂^{•−} by PS oxidation, Baptista et al. [28] have pointed out that it is unlikely that this accounts for the most prevalent interaction between the PS and O₂. Intersystem crossing of the PS to the triplet excited state followed by energy transfer to O₂ to form $^1\text{O}_2$ (Type II pathway) is usually much more probable [28]; on this regard, the Zn(II) 4-*N*-alkylpyridylporphyrins have been generally coined as Type II photosensitizers [84].

Although there has been plenty of studies on the biological applications of ZnPs as aPDI and PDT PSs, the literature on the ZnP photochemical properties and photochemical mechanisms is still limited and nowhere near the volume of data available on the free-metal porphyrins. A more complete characterization of the photophysics and photochemistry of ZnPs is surely needed to design improved PSs for aPDI and shed some light on the mechanistic aspects of ZnP-based photosensitizer actions in biological systems.

It is also worth noting that the PS biological efficiency depends not only on the ZnP ability to photogenerate $^1\text{O}_2$ or other types of ROS but also on the effective cell uptake, subcellular distribution, and overall

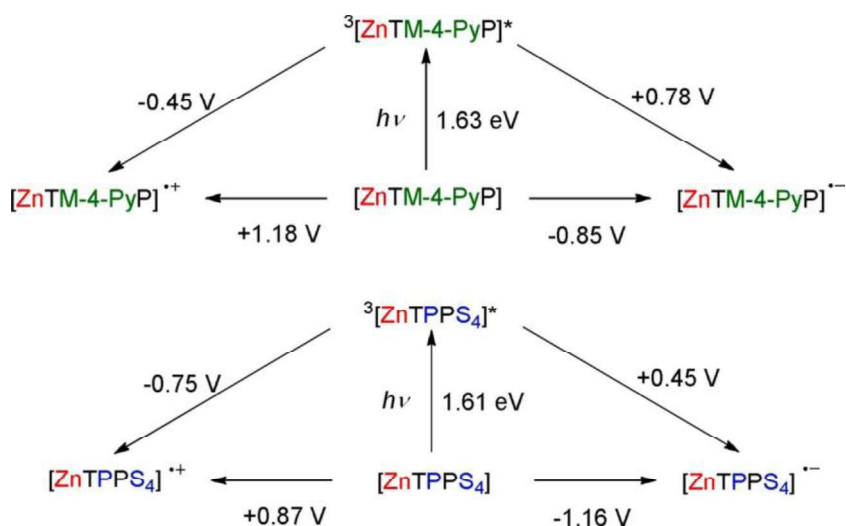


Fig. 5. Latimer-type diagrams depicting the ground-state and excited-state redox processes of representative cationic (ZnTM-4-PyP⁴⁺) and anionic (ZnTPPS₄⁴⁻) water-soluble Zn(II) porphyrins often used as photosensitizers in aPDI. The cationic (4+) and anionic (4-) charges associated with the porphyrin ring substituents were omitted for clarity. All potential values are vs. NHE (normal hydrogen electrode). Singlet state energies are 1.98 eV and 2.05 eV for ZnTM-4-PyP⁴⁺ and ZnTPPS₄⁴⁻, respectively. Diagram designed based on data reported by Neumann-Spallart and Kalyanasundaram [86,88].

interaction with the biological systems, which can be achieved by modulating the lipophilicity and the porphyrin ionic charge [9,83,89]. These aspects will be further explored in the next Sections. Table 1 presents a compilation of the photophysical and photochemical characteristics of the ZnP_s used in the different antimicrobial studies presented in the following Sections of this review. The reader is encouraged to check the original reference for full details on the experiments/measurements.

2. Zn(II) porphyrin-mediated aPDI of bacteria

2.1. Zn(II) porphyrins in solution

Bacterial resistance to antibiotics has become a pressing issue in medicine and has been mobilizing major efforts by researchers and funding agencies worldwide [118–120]. In general, Gram-negative strains are more prone to develop resistance to antibacterial treatments than Gram-positive bacteria [121]. Gram-positive bacteria are surrounded by a thick layer of peptidoglycan, while Gram-negative strains present extra protection in the form of a LPS envelop surrounding their thin peptidoglycan cell wall, as previously illustrated in Fig. 3 [122]. A standard representative model of Gram-negative bacteria is *E. coli*, while *S. aureus* is often exploited as a Gram-positive model. Among the technologies proposed to overcome the antibiotic resistance, aPDI represents a promising approach [121]. In this Section, studies applying antibacterial aPDI mediated by ZnP (and a few non-Zn(II) metallo derivatives) are described. Light source parameters, and incubation and irradiation times were included in Table 2, when informed in the original article. Table 2 also presents a compilation of the main results regarding aPDI mediated by Zn(II) porphyrins reported in this review.

Thomas and coworkers [7] tested a set of ZnP_s of tailored charge and lipophilicity as PSs for aPDI of antibiotic-sensitive and resistant strains of *E. coli*. The PS compounds included one anionic ZnP, Zn(II) *meso*-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin (ZnTCPP⁴⁻) [also known as Zn(II) *meso*-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin (ZnTBAP⁴⁻)] and five structurally related cationic ZnP_s of the Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alkylpyridinium-2-yl)porphyrin class, in which *N*-alkyl moieties were: methyl (ZnTM-2-PyP⁴⁺), ethyl (ZnTE-2-PyP⁴⁺), *n*-butyl (ZnTnBu-2-PyP⁴⁺), *n*-hexyl (ZnTnHex-2-PyP⁴⁺), and *n*-octyl (ZnTnOct-2-PyP⁴⁺). Bacterial cells were preincubated with porphyrins for 30 min and subsequently irradiated (incandescent lamp, 35 mW/cm², 42 J/cm²) for 20 min. After this, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was employed to assess cell viability. At 0.5 μmol/L, the two ZnP_s with longer alkyl *meso*-substituents decreased cell viability to less

than 40%, with the amphiphilic ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ PS showing slightly higher efficiency than that of the more lipophilic ZnTnOct-2-PyP⁴⁺. With a less lipophilic compound, such as ZnTnBu-2-PyP⁴⁺, comparable results were achieved at a 10-fold higher PS concentration of 5 μmol/L. At this concentration, bacterial viability with ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ and ZnTnOct-2-PyP⁴⁺ as PSs was completely abolished. The hydrophilic cationic ZnP_s, ZnTM-2-PyP⁴⁺ and ZnTE-2-PyP⁴⁺, and the anionic ZnP, ZnTBAP⁴⁻, all failed to promote a significant decrease in bacterial viability. The study observed a tendency of higher aPDI efficiency for cationic ZnP_s with longer lipophilic alkyl chains. All tested antibiotic-resistant *E. coli* strains were susceptible to aPDI mediated by ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ and ZnTnOct-2-PyP⁴⁺ at 1 μmol/L. At 5 μmol/L, both ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ and ZnTnOct-2-PyP⁴⁺ decreased the number of bacteria colonies by more than 6 log₁₀, while ZnTE-2-PyP⁴⁺ and ZnTnBu-2-PyP⁴⁺ reduced it by 2 log₁₀ and 3 log₁₀, respectively. There was no noteworthy decrease in cell viability for controls in the dark.

In a subsequent work [94], the aforementioned group reported another study in which they employed cationic ZnTM-2-PyP⁴⁺ and ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ for aPDI of *E. coli*. ZnP_s were added to a suspension of bacterial cells to a final concentration of 5 μmol/L and then irradiated (white fluorescent light tubes, 2.7 mW/cm², 19.44 J/cm²) for 2 h. While ZnTM-2-PyP⁴⁺ was unable to promote a significant decrease of colony numbers, ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ reduced the cell number by 3 log₁₀, and MTT metabolism by approximately 60%. In the same study, the subcellular targets of ZnTM-2-PyP⁴⁺ and ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ aPDI were investigated. According to the authors, no DNA fragmentation was detected after aPDI with porphyrins, even when DNA was extracted from unimpaired cells and directly exposed to ZnP_s under illumination. On the other hand, plasma membrane and anchored proteins were oxidized, and leakage of intracellular metabolites and ATP were observed at the early stages of ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ aPDI (Fig. 6A). The activity of cytosolic enzymes, such as glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH), and isocitrate dehydrogenase (IDH), was significantly decreased and the bacterial cells were overall unable to recover from oxidative stress.

Rahimi and co-workers [123] synthesized and tested the PS effect of neutral *meso*-tetrakis(4-nitrophenyl)porphyrin (H₂T4NPP) and its Zn(II) porphyrin derivative (ZnT4NPP) for aPDI of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. The PS was loaded into the center of an agar plate seeded with bacteria. The plate was incubated for 20 min in the dark, followed by irradiation (100 W tungsten lamp, λ_{350–800} nm) for 30 min. The authors first evaluated the formation of inhibition zones on the plates treated with different porphyrin concentrations (3–60 μg/mL), considering the strain as sensitive for inhibition zones larger than 10 mm. *P. aeruginosa* was inhibited by the PS effect of both compounds, whereas

Table 1
Summary of the photophysical properties and lipophilicity of ZnPs used in the biological applications presented in this review.

Photosensitizer	Relative fluorescence quantum yield (Φ_f)	Lipophilicity	Lifetime triplet state	Singlet Oxygen Analysis	PS Reference	Soret band (λ_{max} /nm)	Molar extinction coefficients (ϵ /L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Ref.
ZnTPPS ⁴⁻	0.103 (H ₂ O)	$-2.9 \pm 0.2 \log P_{ow}$	NI	0.142 Φ^1O_2	Rose Bengal	421 (H ₂ O)	174,000	[83,90,91]
ZnTETOAc-4-PyP ⁴⁺	0.044 (H ₂ O)	NI	NI	0.033 Φ^1O_2	Rose Bengal	437 (H ₂ O)	153,000	[83]
ZnTBAP ⁴⁺	0.10 $\pm$ 0.02 (H ₂ O)	NI	278 $\pm$ 6 μ s	0.93 Φ^1O_2 (DPBF)	H ₂ TPP	422 (H ₂ O)	257,000	[7,92,93]
ZnTM-2-PyP ⁴⁺	0.028 (H ₂ O)	$-9.93 \log P_{ow}$	1.4 ms	NI	NI	425 (H ₂ O)	324,000	[7,77,94,95]
ZnTE-2-PyP ⁴⁺	NI	$-8.71 \log P_{ow}$	NI	NI	NI	426 (H ₂ O)	288,000	[7,96,97]
ZnTnBu-2-PyP ⁴⁺	NI	$-6.38 \log P_{ow}$	NI	NI	NI	426 (H ₂ O)	437,000	[7,95]
ZnTnHex-2-PyP ⁴⁺	NI	$-3.65 \log P_{ow}$	NI	0.105 $\Delta\Delta 415$ /min	NI	427 (H ₂ O)	437,000	[7,24,79,81,94,95,98,99]
ZnTnOct-2-PyP ⁴⁺	NI	$> -2.0 \log P_{ow} \#$ 0.493 R _f	NI	(DMF)	NI	428 (H ₂ O)	389,000	[7,95,98]
ZnTnHex-3-PyP ⁴⁺	NI	$\sim -1.55 \log P_{ow} \#$ 0.527 R _f	NI	0.094 $\Delta\Delta 415$ /min	NI	429 (H ₂ O)	269,000	[7,24,98]
ZnTnOct-3-PyP ⁴⁺	NI	0.548 R _f	NI	0.095 (DMF)	NI	430 (H ₂ O)	363,000	[98]
ZnTM-4-PyP ⁴⁺	0.025 (H ₂ O) 0.012 (MeOH)	$-3.0 \pm 0.1 \log P_{ow}$	2.0 ms and 0.9 Φ_{trip} (H ₂ O)	0.78 Φ^1O_2 (MeOH)	H ₂ TPPS ₄ ⁴⁻	436 (H ₂ O) 440 (MeOH)	219,000 (H ₂ O) 120,000 (MeOH)	[7,25,77,78,91,100–102]
ZnND ₄ TPP	NI	0.32 $\log P_{ow}$	77 $\pm$ 1 μ s	0.57 Φ^1O_2 (DCM) 0.07 Φ^1O_2 (H ₂ O)	Methylene blue	581 (DCM) 594 (H ₂ O)	229,000 (DCM) 110,000 (H ₂ O)	[103]
ZnTRu(bipy)2-4-PyP ⁴⁺	0.0008 (DMSO)	NI	NI	0.36 Φ^1O_2 (DMSO)	H ₂ TPP	430 (DMSO)	102,000	[104]
ZnTM-3-PyP ⁴⁺	0.017 (H ₂ O)	NI	2 ms	NI	NI	428 (H ₂ O)	339,000	[77,105]
ZnM4APTnM-4-PyP ³⁺	NI	NI	NI	0.156 Φ^1O_2 (D ₂ O)	H ₂ TM-4-PyP ⁴⁺	437 (H ₂ O)	93,000	[106]
ZnPPIX ²⁻	0.042 (MeCN) 0.034 (EtOH)	NI	0.17 ms (MeCN) 0.28 ms (EtOH)	0.91 Φ^1O_2 (PB/TX100)	Methylene blue	421 (Zn-hemoglobin and Zn-mioglobin monomers) 426 (PB/TX100)	122,000 (Zn-hemoglobin and Zn-mioglobin monomers)	[107–110]
ZnT4EtPP	0.11 $\pm$ 0.03 (EtOAc)	NI	5.5:4.5, v/v)	0.90 Φ^1O_2 (DMF)	H ₂ TPPS ₄ ⁴⁻	422 (AcOEt)	25,000	[26]
ZnMBATr-2-ThP	< 0.01 (DMF)	NI	NI	0.61 Φ^1O_2 (DMF)	ZnTPP	430 (DMF)	NI	[111]
ZnM4HPTn-2-ThP	< 0.01 (DMF)	NI	NI	0.66 Φ^1O_2 (DMF)	ZnTPP	430 (DMF)	NI	[112]
ZnP (DP5)	0.017 $\pm$ 0.002 (DMF)	NI	NI	0.27 Φ^1O_2 (DMF)	ZnT4MeOPP	423 (DMF)	NI	[113]
ZnTOEt-4-PyP ⁴⁺	0.0359 (H ₂ O)	NI	2.8 μ s (H ₂ O)	0.85 Φ^1O_2 (H ₂ O)	H ₂ TM-4-PyP ⁴⁺	439 (H ₂ O)	143,000	[114–116]
ZnTnBu-4-PyP ⁴⁺	0.0346 (H ₂ O)	NI	2.9 μ s (H ₂ O)	0.97 Φ^1O_2 (H ₂ O)	H ₂ TM-4-PyP ⁴⁺	438 (H ₂ O)	193,000	[114–116]
ZnTnBu-3-PyP ⁴⁺	NI	NI	3.0 μ s (H ₂ O)	97% Φ^1O_2 (H ₂ O)	H ₂ TM-4-PyP ⁴⁺	430 (H ₂ O)	196,000	[115–117]

Abbreviations - NI: not informed; (#): Estimated by the authors of this review based on the original reference; DPBF: 1,3-diphenylisobenzofuran; PB/TX100: buffer plus 1% Triton X-100; DMF: N,N-dimethylformamide; DCM: dichloromethane; DMSO: Dimethyl sulfoxide; MeOH: methanol; D₂O: Heavy water; MeCN: Acetonitrile; EtOH: ethanol; AcOEt: ethyl acetate; THF: tetrahydrofuran; R_f: retention factor, determined on silica gel plates using 1:1:8 KNO₃(sat):H₂O:acetonitrile as a mobile phase; $\log P_{ow}$: partition coefficient, determined as partition coefficient between n-octanol and water; Φ_{trip} : quantum yield for triplet state.

Table 2 (continued)

Microorganisms	Photosensitizer	Light parameters			Cell survival	Ref.
		[ZnP]	PIT	Light source λ (nm)	Irradiance (mW/cm ²)	Radiant exposure (J/cm ²)
Fungi	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ZnTM-4-PyP ⁴⁺	NI	White light	50	270
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	ZnTM-4-PyP ⁴⁺	NI	White light	50	270
	<i>M. smegmatis</i>	ZnTM-4-PyP ⁴⁺	NI	White light	50	270
	<i>C. albicans</i>	ZnTE-2-PyP ⁴⁺	10 min	460 $\pm$ 20	150	NI
	<i>S. cerevisiae</i>	ZnTM-2-PyP ⁴⁺	90 min	White light	78	NI
Viruses	Dengue-1	ZnTnBu-2-PyP ⁴⁺	90 min	White light	78	NI
	VSV	ZnTnHex-2-PyP ⁴⁺	90 min	White light	78	NI
	BoHV-1	ZnTnOct-2-PyP ⁴⁺	90 min	White light	78	NI
	<i>L. panamensis</i>	ZnM4APTnM-4-PyP ³⁺ -NFC	NA	400–700	65 $\pm$ 5	NI
	<i>L. panamensis</i>	ZnM4APTnM-4-PyP ³⁺ -NFC	NA	400–700	65 $\pm$ 5	NI
Parasites	<i>L. panamensis</i>	ZnPPH ²⁻	60 min	White light	NI	NI
	<i>L. panamensis</i>	ZnTPPS ₄ ⁴⁻	60 min	400–900	130	NI
	<i>L. panamensis</i>	ZnTM-4-PyP ⁴⁺	60 min	400–900	130	NI
	<i>L. panamensis</i>	ZnT4EPP	24 h	420–450	NI	80
	<i>L. panamensis</i>	ZnTBAp ⁴⁻	24 h	420–450	NI	80
Parasites	<i>L. panamensis</i>	ZnT4EPP	24 h	420–450	NI	80
	<i>L. panamensis</i>	ZnTE-2-PyP ⁴⁺	10 min	455 $\pm$ 20	300	90
	<i>L. panamensis</i>	ZnTnHex-2-PyP ⁴⁺	5 min	410 $\pm$ 10	19.1	3.4
	<i>L. panamensis</i>	ZnTBAp ⁴⁻	NI	420–450	NI	80
	<i>L. panamensis</i>	ZnTnHex-2-PyP ⁴⁺	5 min	410 $\pm$ 10	19.1	3.4

Abbreviations - AR: antibiotic-resistant; IR: irradiation; NI: not informed; PIT: preincubation time; (*): Calculated by the authors of this review; (#): Estimated by the authors of this review based on the original reference.

some colonies of *B. subtilis* were able to grow near the porphyrin site in all samples. Experiments of colony-forming unit (CFU) were conducted with ZnT4NPP concentrations of 10, 30, and 60 μ g/mL (considering a molar weight of $\sim$ 858 g/mol, we estimate these concentrations as about 12, 35, and 70 μ mol/L, respectively). At the highest concentration, ZnT4NPP and H₂T4NPP decreased the colonies of Gram-negative *P. aeruginosa* by 1 log₁₀ and 2 log₁₀, respectively, while both porphyrins decreased Gram-positive *B. subtilis* colonies by 0.7 log₁₀ approximately.

Guterres et al. [101] evaluated the activity of different porphyrins in the aPDI of bacteria of the genus *Mycobacterium*. The tetracationic porphyrin H₂TM-4-PyP⁴⁺ and its metalloporphyrin derivatives containing central ions Zn(II), Cu(II), Ni(II), Mn(III), and Fe(III) were tested in the inactivation of *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus*, *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense*, and *Mycobacterium smegmatis*. Porphyrins were exposed to white light (λ = 370–800 nm; 50 mW/cm² and light dose of 270 J/cm²) for 90 min in three periods, with 24 h intervals between each plate, totaling 72 h of incubation at 30 °C. ZnP had the greatest efficiency in reducing the viability of bacteria, followed by the free-base porphyrin. ZnTM-4-PyP⁴⁺ showed the greatest activity compared to all porphyrins tested as total inactivation of *M. abscessus* and *M. massiliense* growth needed irradiation using only a concentration corresponding to the minimum inhibitory concentration (MIC) determined for this Zn(II)-porphyrin, while H₂TM-4-PyP⁴⁺ required more than one irradiation cycle for complete inactivation using its MIC. *M. smegmatis* required three irradiation cycles for inactivation for both Zn(II)- and free-base porphyrins. The other metalloporphyrins showed low efficiency in mycobacterial photo-inactivation. According to the authors, this result can be attributed to the low capacity of ROS generation by these derivatives. The test to detect the possible ROS involved in the antimycobacterial activity of H₂TM-4-PyP⁴⁺ and ZnTM-4-PyP⁴⁺ indicated singlet oxygen as the main ROS present, which was responsible to the antimicrobial effect of these porphyrins.

Skwor and colleagues [78] investigated the PS efficiency of H₂TM-4-PyP⁴⁺ and its Cu(II), Pd(II), and Zn(II) derivatives for aPDI of *E. coli* and MRSA strains. Whereas the authors [78] claim to have studied also the Fe(II) analogue, it is likely that the iron compound isolated and, thus, investigated had been the Fe(III) complex, FeTM-4-PyP⁵⁺, given that the Fe(II) oxidation state in the claimed FeTM-4-PyP⁴⁺ complex is air-unstable, being the compound readily oxidized by O₂ to yield the Fe(III) counterpart, FeTM-4-PyP⁵⁺, during synthesis and handling under aerobic conditions [124,125]. Cells were preincubated with porphyrins (3, 10, and 30 μ mol/L) for 5 min and irradiated for 44 s (LED, λ = 405 nm, 2.5 J/cm²). Initially, the bacterial growth was estimated through absorbance readings of cell suspensions at 570 nm, 7 h after aPDI. Only Zn(II), Pd(II), and free-base porphyrins displayed PS antibacterial activity for MRSA. ZnTM-4-PyP⁴⁺ mediated aPDI resulted in over 90% decrease in absorbance at 10 μ mol/L and was further efficient at 30 μ mol/L. Experiments with CFU counting showed expressive results at a concentration of 10 μ mol/L, in which H₂TM-4-PyP⁴⁺, ZnTM-4-PyP⁴⁺, and PdTM-4-PyP⁴⁺ decreased CFU/mL by 2.4 log₁₀, 2.6 log₁₀, and 5.9 log₁₀, respectively. Singlet oxygen production corroborated the antibacterial results, with values for H₂TM-4-PyP⁴⁺ and ZnTM-4-PyP⁴⁺ being similar and ¹O₂ production being greater with PdTM-4-PyP⁴⁺. For *E. coli*, the authors only reported PdTM-4-PyP⁴⁺ mediated aPDI. It is worth mentioning, however, that Pd(II) may induce, in certain cases, a higher photocytotoxicity to mammalian cells. Malina et al. [126] exploring metalloporphyrins for photodynamic treatment showed that the ZnTPPS₄⁴⁻ exhibited the highest IC₅₀ for a non-tumor cell line (mouse fibroblast cell lines), followed by MgTPPS₄⁴⁻ and finally PdTPPS₄⁴⁻. These results corroborate with Guney et al. [127] utilizing the Chinese hamster ovary cell line.

Galstyan et al. [103] investigated the action of a novel π -extended meso-tetraphenylporphyrin containing β -pyrrole-fused naphthalenediamide units to yield the free base (H₂ND₄TPP) and its

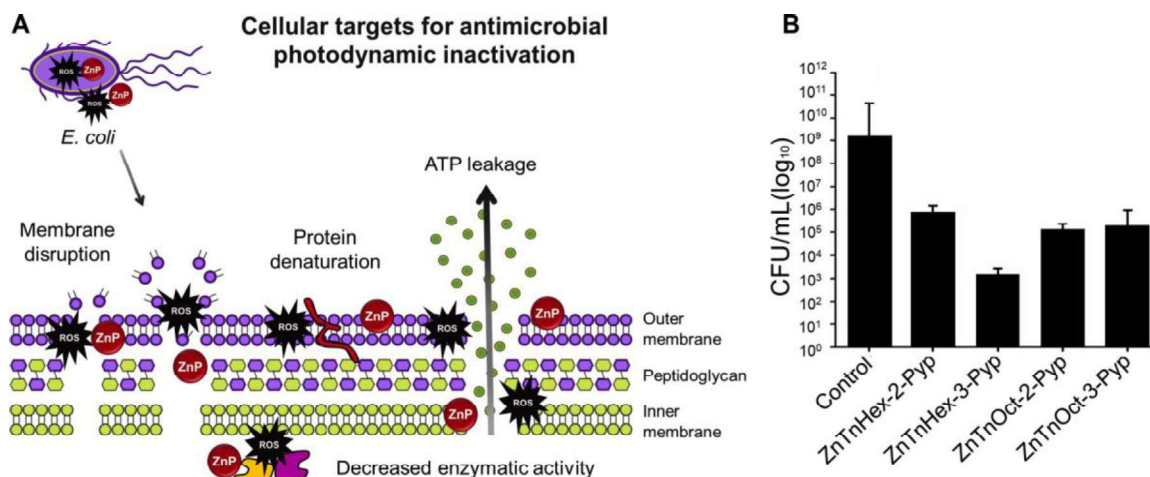


Fig. 6. (A) Scheme of the effect of ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ mediated aPDI of *E. coli* on cellular components. Following aPDI, a series of assays detected (i) decreased enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), and isocitrate dehydrogenase (IDH); (ii) leakage of ATP to the supernatant, due to membrane disruption, and (iii) oxidative damage of membrane-anchored proteins. Illustration based on results described by Awad et al. [94]. From a different study: (B) Bactericidal efficiency of *ortho* (2) and *meta* (3) ZnTnHex-2(3)-PyP⁴⁺ and ZnTnOct-2(3)-PyP⁴⁺. Cell suspensions were incubated with 1 $\mu\text{mol/L}$ of ZnP for 5 min and irradiated at 19.8 J/cm², for 5 min. Adapted from Alenezi et al. [98], Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, © (2017), with permission from Elsevier.

complexes with Zn(II) (ZnND₄TPP) and Pd(II) (PdND₄TPP) as PSs on Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *B. subtilis*). For the aPDI assays, bacterial cells ($\sim 10^8$ CFU/mL) were preincubated 15 min with PS (10 $\mu\text{mol/L}$) and irradiated (xenon lamp, $\lambda = 515$ nm, 5 mW/cm²) for 30, 60 and 90 min (9, 18 and 27 J/cm², respectively). Under identical conditions, the viability of both strains showed significant dependence on the porphyrin derivative used. PdND₄TPP was found to be the most potent against both tested bacteria. No colony was found on the agar plate when *S. aureus* was irradiated for 60 min. For *B. subtilis* the bactericidal effect ($> 3 \log_{10}$ steps reduction) and disinfecting effect ($> 5 \log_{10}$ steps reduction) could be achieved after 60 min and 90 min irradiation, respectively. H₂ND₄TPP reduced 3.15 $\log_{10}$ for *S. aureus* and 4.47 $\log_{10}$ for *B. subtilis* when irradiated for 90 min. ZnND₄TPP under identical irradiation conditions resulted in a reduction of less than 3 $\log_{10}$ approximately, for both bacterial strain. The authors attribute the best result of PdND₄TPP to the higher ROS quantum yields and the higher lipophilic character, which could contribute to a better cellular PS uptake and efficient damage to the bacterial cell. However, other characteristics also govern the binding and uptake of PS in bacterial cells, such as charge, asymmetry, lipophilicity, targeting unit, and the aPDI efficiency of MetalND₄TPP-based PS can be tuned by metal coordination. It is worth noting that photophysical properties of π -extended porphyrin may be highly susceptible to π -stacking aggregation, which affects also bioavailability and overall PS efficiency [103].

Korchenova et al. [116] investigated free-base porphyrins and ZnPs derived from *N*-substituted 3- and 4-*N*-pyridylporphyrins. *Meso*-tetrakis [*N*-(2-hydroxyethyl)pyridinium-4-yl]porphyrin (H₂THOE-4-PyP), its Zn (II) complex (ZnTHOE-4-PyP⁴⁺) and the *N*-*n*-butyl analogues ZnTnBu-4-PyP⁴⁺ and ZnTnBu-3-PyP⁴⁺ were synthesized. The antibacterial activities of these compounds were evaluated in methicillin-sensitive strains of *S. aureus* (MSSA), MRSA, *E. coli*, and *S. simulans* with porphyrin concentrations between 0.01 and 0.1 $\mu\text{g/mL}$. The light source used for irradiation was an LED (λ 405 $\pm$ 15 nm, 47 mW/cm²), with an incubation time of 15 min and exposure times of 5, 10, 15, and 30 min. The study showed no significant differences between controls and compounds in the dark at concentrations of 0.001, 0.01, and 0.1%. In this study, the authors reported a reduction in the viability of bacterial strains only with light source irradiation. It was observed a reduction of up to 49% in the number of CFU for MSSA (30 min irradiation), and a similar effect was observed for MRSA. For *E. coli*, a 40% of CFU reduction was achieved with exposure time of 30 min. For

S. simulans, a significant reduction of CFU of 33% was observed with 5 min of irradiation; the bacterial growth was almost totally suppressed with exposure time of 15 min. Concerning aPDI, the reduction in the number of bacteria in all cases was dose-dependent. The greatest bacterial suppression for all porphyrins was observed at porphyrin concentration of 0.1% and exposure time of 30 min, being the best results found: MSSA (99.6%), MRSA (99.7%), *E. coli* (98.9%), and *S. simulans* (100%) of bacterial inactivation. In summary, the authors concluded that ZnTnBu-3-PyP⁴⁺ led to the greatest reduction of both gram-negative and gram-positive bacteria, followed by ZnTHOE-4-PyP⁴⁺. They ascribed this more effective reduction to the higher $\Phi^1\text{O}_2$ of ZnPs compared with the free-base porphyrin, but they did not rule out that ZnP-cell binding efficiency may play an important role.

Alenezi et al. [98] used *E. coli* as Gram-negative bacteria model to investigate and compare the uptake and PS efficiency of cationic *ortho* ($X = 2$) and *meta* ($X = 3$) isomers of Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alkylpyridinium-*X*-yl) porphyrins, with alkyl being *n*-hexyl (ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ and ZnTnHex-3-PyP⁴⁺) or *n*-octyl (ZnTnOct-2-PyP⁴⁺ and ZnTnOct-3-PyP⁴⁺) peripheral groups. Uptake assays revealed the highest cell internalization or surface binding for ZnTnOct-3-PyP⁴⁺ and the lowest for ZnTnHex-2-PyP⁴⁺. Cells were preincubated for 5 min with 1 $\mu\text{mol/L}$ of PS and irradiated (incandescent lamp, 66 mW/cm², 19.8 J/cm²) for 5 min to assess the ZnPs bactericidal activity. All compounds studied showed expressive PS efficiency, with the *meta* isomers being the most active. For example, ZnTnHex-2-PyP decreased the number of colonies by 3 $\log_{10}$ (Fig. 6B), whereas ZnTnOct-2-PyP⁴⁺ and ZnTnOct-3-PyP⁴⁺ were similarly effective showing reduction of CFU by 4 $\log_{10}$. Among the compounds, ZnTnHex-3-PyP⁴⁺ was the most efficient PS, resulting in a decrease of 6 $\log_{10}$ in cell viability. The authors showed that *meta* isomers tend to have a higher uptake by *E. coli* and better performance as PSs. Regarding the lipophilicity, the improved uptake found for the more lipophilic analogue ZnTnOct-3-PyP⁴⁺ had a limited influence on the final bactericidal activity, as the amphiphilic ZnTnHex-3-PyP⁴⁺ had the best PS antibacterial activity. Singlet oxygen measurements showed similar results for all porphyrins, which emphasizes the importance of cellular internalization for efficient bactericidal performance.

In a posterior study, Al-Mutairi et al. [99], investigated if aPDI with sublethal conditions using cationic ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ could induce bacterial resistance. The following parameters were considered

sublethal: 1 $\mu\text{mol/L}$ of ZnP, 30 min of preincubation, and 20 min of irradiation (overhead projector OHP-3100p with an incandescent 300 W bulb, $\lambda = 400\text{ nm}$, 37 mW/cm^2). When previously submitted to 10 cycles of sublethal aPDI and regrowth, antibiotic-sensitive *E. coli* still showed the same susceptibility to aPDI as their untreated counterparts (not submitted to previous cycles of sublethal aPDI). MTT assays showed that both groups had their metabolism reduced to less than 20%, and CFU counts decreased by approximately 3 $\log_{10}$. Similar results were found when antibiotic-resistant *E. coli* and *S. aureus* underwent aPDI after 10 cycles of sublethal treatment (3 $\log_{10}$ and 4 $\log_{10}$, respectively). In a different set of experiments, antibiotic-sensitive *E. coli* was cultivated for 48 h, while continuously exposed to low concentrations of ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (1–2 $\mu\text{mol/L}$) and low light intensity (0.5 mW/cm^2 , 86.4 J/cm^2) and even after 10 cycles of sublethal aPDI it remained as susceptible to aPDI as the untreated cell group. According to the authors, no resistance to aPDI was found after either continuous exposure to low levels of PS and light dose, repeated cycles of sublethal treatment, or the combination of the two.

Gonçalves et al. [104] explored the cationic free-base and Zn(II) porphyrins derived from the *meso*-tetra(4-pyridyl)porphyrin modified with peripheral Ru(II)-bipyridyl complexes, H₂TRu(bipy)₂-4-PyP⁴⁺ and ZnTRu(bipy)₂-4-PyP⁴⁺, for aPDI of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Bacterial cells were preincubated with 25 $\mu\text{mol/L}$ of H₂P or ZnP for 2 h and irradiated (halogen lamp, $\lambda = 400\text{--}900\text{ nm}$, 200 mW/cm^2) for 0, 15, 30, 60 and 90 min. For 15 min irradiation time (180 J/cm^2), H₂TRu(bipy)₂-4-PyP⁴⁺ decreased cell counts by ~75% and ZnTRu(bipy)₂-4-PyP⁴⁺ almost completely abolished cell viability. Until 30 min of irradiation (360 J/cm^2) both porphyrins were efficient in eliminating this bacterial (> 99.99%). Singlet oxygen generation studies revealed a much higher $\Phi^1\text{O}_2$ value for ZnTRu(bipy)₂-4-PyP⁴⁺ than that of its free-base (0.36 and 0.02, respectively).

In 2015, the same group [83] compared the PS performance of the anionic porphyrins *meso*-tetraphenylporphyrin tetrasulfonate (H₂TPPS₄⁴⁻) and *meso*-tetranaphthylporphyrin tetrasulfonate (H₂TNPS₄⁴⁻) and the cationic tetrapiridyl ethylacetate porphyrin (H₂TetOAc-4-PyP⁴⁺) and their respective Zn(II) porphyrin for aPDI of *E. coli*. Among the free-base porphyrins, H₂TetOAc-4-PyP⁴⁺ presented the highest $\Phi^1\text{O}_2$ of ~0.768, while all three ZnPs had very discrete $\Phi^1\text{O}_2$, the highest one being that of 0.142 for ZnTPPS₄⁴⁻. Nevertheless, two ZnPs, ZnTPPS₄⁴⁻ and ZnTetOAc-4-PyP⁴⁺, assessed by a chemiluminescence assay, promoted the highest generation of H₂O₂, $330 \pm 20 \times 10^{-4}$ and $62 \pm 1 \times 10^{-4}\text{ M}$, respectively. Antibacterial assays were performed using an *E. coli* model (Gram-negative) with 30 min of irradiation (photoreactor LuzChem LZC 4 V, $\lambda = 320\text{--}400\text{ nm}$, 3.3 mW/cm^2) and cell viability was estimated through ATP quantification. aPDI mediated by TPPS₄⁴⁻ (250 $\mu\text{mol/L}$) resulted in the lowest cell viability (< 15%), whereas the corresponding Zn(II) complex, ZnTPPS₄⁴⁻, was a slightly less efficient as a PS. At the same concentration, ZnTPPS₄⁴⁻ and ZnTetOAc-4-PyP⁴⁺ reduced the cell viability to approximately 33% and 37%, respectively. The high production of Type I ROS by ZnTPPS₄⁴⁻ and ZnTetOAc-4-PyP⁴⁺ corroborate these antibacterial results. The authors suggested that planar molecules should be able to interact better with microbial cells as opposed to molecules with high structural deformation, due to steric hindrance. According to their study, ZnTPPS₄⁴⁻ shows high production of ROS and may adopt a planar structure, while ZnTetOAc-4-PyP⁴⁺ overcomes its structural deformation with high ROS production. In that sense, they correlate the antimicrobial efficiency of these PSs with both ROS production and structural deformity.

Zoltan et al. [83] also explain that although many aPDI studies have established that negatively charged porphyrins have limited interaction with and negligible activity against Gram-negative bacteria, such as *E. coli* [128], in most protocols bacterial washes are performed before irradiation, thereby eliminating the PS not attached to the bacteria. Given that in large-scale applications, such as in wastewater treatment, these pre-washings are not regularly performed. Thus, their study showed that negatively charged porphyrin compounds may be useful for

efficient ROS production and bacterial photoinactivation under wastewater treatment operating conditions [83].

2.2. Zn(II) porphyrin-containing formulations and materials for aPDI of bacteria

In most aPDI studies, PSs are applied as homogeneous solutions or suspensions [129]. Whereas direct uses of ZnP-based PSs in aPDI were described in the previous topic, this Section will focus on alternatives strategies for PS formulation or encapsulation in different delivery systems, such as nanocarriers, hydrogels, polymeric supports or films [90, 106, 130, 131]. Delivery systems are alternative ways to improve the binding of PS to the cell wall of bacteria and favor its penetration into the cells, which may thus improve photodynamic effects [132].

Hanakova et al. [90] showed that cationic H₂TM-4-PyP⁴⁺ was more effective for aPDI when compared to anionic ZnTPPS₄⁴⁻, both compounds were complexed with hp- β -cyclodextrin (CD) in various proportions. After 45 min of preincubation, the microplates were irradiated for 56 min by a light source (LED, $\lambda = 414\text{ nm}$, 150 J/cm^2) at 37 °C. The absorbance of the samples was measured at 630 nm hourly for a total of 24 h to evaluate the cell survival. For *S. aureus*, all samples with H₂TM-4-PyP⁴⁺ from 3.125 to 100 $\mu\text{mol/L}$, with or without hp- β -cyclodextrin (H₂TM-4-PyP⁴⁺:CD molar ratio of 1:4 and 1:1) were effective. For ZnTPPS₄⁴⁻, inactivation was observed only at a concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ of ZnP and with a ZnTPPS₄⁴⁻:CD molar ratio of 1:4. On *E. coli*, less effectiveness was observed for ZnTPPS₄⁴⁻, no experimental condition was sufficiently efficient, with or without CD. While H₂TM-4-PyP⁴⁺ was effective only at a concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ (with a H₂TM-4-PyP⁴⁺:CD molar ratio of 2:1).

Shabangu et al. [112] tested three neutral Zn(II) porphyrins combined with silver nanoparticles (AgNPs) against MRSA to produce a combined photodynamic effect. The ZnPs tested were: Zn(II) *meso*-tetrakis(4-pyridyl)porphyrin (ZnT-4-PyP), Zn(II) *meso*-tetrakis(2-thienyl)porphyrin (ZnT-2-ThP), and Zn(II) 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-tris(2-thienyl)porphyrin (ZnM4HPTri-2-ThP) conjugated with AgNPs via self-assembly. The best results were achieved with ZnM4HPTri-2-ThP/AgNP conjugate with 60 min irradiation (LED, $\lambda = 595\text{ nm}$, 40 J/cm^2), leading to 0% bacterial viability in CFU. The results indicated an enhancement of the photodynamic effect when AgNPs were used since the susceptibility of *S. aureus* was greater when conjugates were employed than with the Zn(II) porphyrins alone. The authors reported that *meso*-thienyl substituents offered better photo-physicochemical properties, which resulted in greater photoinactivation capacity.

In another study, Shabangu et al. [111] evaluated the activity of different ZnPs and their conjugates with AgNPs against *S. aureus*. The ZnPs used were: A₃B-type mono-carboxy-porphyrins, 5-(4-carboxyphenyl)10,15,20-tris(pentafluorophenyl)porphyrinato Zn(II) (ZnMBA-TriPFPF), 5-(4-carboxyphenyl)10,15,20-triphenylporphyrinato Zn(II) (ZnMBATriPP), and 5-(4-carboxyphenyl)10,15,20-tris(2-thienyl)porphyrinato Zn(II) (ZnMBATri-2-ThP). The complexes were conjugated with AgNPs through amide bonds (AgNPs-amide) and self-assembly only to ZnMBATri-2-ThP (AgNPs-SA). *S. aureus* was treated with all ZnPs and their conjugates as PS (with concentrations of 0.36 $\mu\text{g/mL}$), preincubated for 30 min, and then irradiated (LED, $\lambda = 595\text{ nm}$, 40 J/cm^2) for 15, 30, 45, 60, and 75 min. aPDI activity was found to increase with increasing time of irradiation. Non-conjugated ZnPs had log reductions with no statistical significance ($p > 0.05$). On the other hand, the ZnP-conjugates achieved significant log reduction ($p < 0.05$) as compared to the control. The ZnMBATri-2-ThP-AgNPs-SA system gave the largest log reduction of 6.46 $\log_{10}$, followed by the ZnMBATri-2-ThP-AgNPs-amide system with a reduction of 2.45 $\log_{10}$, showing an improved performance of the conjugate prepared by self-assembly. The authors attributed this result to an higher $\Phi^1\text{O}_2$ for this system associated with the presence of sulfur groups and AgNPs, which enhanced the conjugate interaction with the bacterial membrane. This type of study stimulates the development of nanomaterials for

nanomedicine, since the association of ZnP with NPs may have advantages.

Photoactive cellulosic fabrics have been explored for aPDI. The materials were prepared by soaking the fabrics in 10 g/L Na_2CO_3 aqueous solutions, which were then impregnated with solutions of cationic porphyrin-based PSs, namely, *meso*-tetrakis(4-*N,N,N*-trimethylanilinium)porphyrin ($\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$) and its Zn(II) derivative (ZnTTrMAPP^{4+}) [132]. The strains tested were *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. All experiments were carried out in a water-jacked irradiated reactor (100 W tungsten lamp, 1250 lm, $\sim 0.36 \text{ mW/cm}^2$), the plates with samples were first incubated for 20 min in the dark, followed illumination for 30, 60, and 90 min, and incubated overnight at a 37 °C. Next, CFU/mL values were counted and the percentage of photoinactivation was determined. For *S. aureus*, cellulose treated with either $\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$ or ZnTTrMAPP^{4+} at low concentrations (100 $\mu\text{mol/L}$) and irradiated for 30 min had photobactericidal activity. ZnTTrMAPP^{4+} (100 $\mu\text{mol/L}$) irradiated for 90 min exhibited 100% photoinactivation against *P. aeruginosa*, whereas $\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$ exhibited 52.4% photoinactivation. After 30, 60 and 90 min of illumination at a concentration of 10^{-5} mol/L , the percentages of photoinactivation for *E. coli* were, respectively, 19%, 21.6%, and 58.5% for $\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$ and 20.7%, 30%, and 41.3% for ZnTTrMAPP^{4+} . Overall, the photoinactivation percentage of these strains increased when higher PS concentration and irradiation time were used. Additionally, the authors suggested that Zn(II) in ZnTTrMAPP^{4+} played a synergistic inhibitory role on bacterial growth.

Fayyaz et al. [105] also investigated the photodynamic activity of *meso*-tetrakis(*N*-methylpyridinium-3-yl)porphyrin chloride ($\text{H}_2\text{TM-3-PyP}^{4+}$), *meso*-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrin chloride ($\text{H}_2\text{TM-4-PyP}^{4+}$), *meso*-tetrakis(4-*N,N,N*-trimethylanilinium)porphyrin chloride ($\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$), and their Zn(II) compounds as tetracationic porphyrins either free or immobilized on cellulosic surfaces to inactivate *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* *in vitro*. The samples were incubated with free porphyrins for 20 min in the dark (at various concentrations; 10–60 $\mu\text{g/mL}$), followed by 30 min illumination for assays with PSs in solution, and for 30, 60, and 90 min in experiments with PSs conjugated onto cellulosic fabric surfaces (100 W tungsten lamp, $\sim 0.36 \text{ mW/cm}^2$). Next, samples were incubated overnight at a 37 °C. According to the results with PSs in solution, only $\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$ at a concentration of 15 $\mu\text{g/mL}$, $\text{H}_2\text{TM-4-PyP}^{4+}$ and ZnTTrMAPP^{4+} at a concentration of 60 $\mu\text{g/mL}$ exhibited minimum bactericidal concentration effect against *S. aureus* (99.99%). The other PSs, however, exhibited an efficient aPDI on the Gram-negative bacteria, with the highest levels of aPDI inactivation of about 45% being observed with ZnTM-3-PyP^{4+} and ZnTTrMAPP^{4+} against *P. aeruginosa* and *E. coli*. Also, viability assays against the bacteria under dark conditions were performed, the maximum inactivation was achieved with $\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$, followed by the Zn(II) analogue ZnTTrMAPP^{4+} , against *S. aureus*. No significant dark toxicity on Gram-negative strains was observed. Photostability of the porphyrins was determined in distilled water and nutrient broth at pH = 7.4 upon illumination after 10, 20, and 30 min. All PSs displayed approximately the same photostability in nutrient broth, but the ZnTM-3-PyP^{4+} was the more stable in distilled water. The thermal stability of the porphyrin compounds on the cellulosic fabric was investigated by thermogravimetric analysis. $\text{H}_2\text{TM-3-PyP}^{4+}$ and ZnTTrMAPP^{4+} cellulose conjugates showed the highest thermal stability. The researchers conclude that cellulosic fabrics may be efficiently used in biomedical and textile fields and as surface coatings to prevent microbial infections. Regarding the cellulosic fabric photo-bactericidal activities, the highest aPDI was achieved (i) using $\text{H}_2\text{TM-3-PyP}^{4+}$, $\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$, and ZnTTrMAPP^{4+} against *S. aureus* with 30 min irradiation; (ii) with $\text{H}_2\text{TM-3-PyP}^{4+}$, ZnTM-3-PyP^{4+} , $\text{H}_2\text{TM-4-PyP}^{4+}$, and ZnTM-4-PyP^{4+} against *P. aeruginosa* and 60 min illumination, and (iii) using $\text{H}_2\text{TM-3-PyP}^{4+}$, ZnTM-3-PyP^{4+} , $\text{H}_2\text{TM-4-PyP}^{4+}$, and ZnTM-4-PyP^{4+} against *E. coli* also employing 60 min irradiation. Only $\text{H}_2\text{TTrMAPP}^{4+}$ showed activity against *P. aeruginosa* with 90 min

illumination. The authors noted that the effect of increasing the concentration and irradiation time were two important parameters to improve the aPDI of these strains of bacteria.

George et al. [100] compared the PS antibacterial activity of cationic Zn(II) tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrin (ZnTM-4-PyP^{4+}) and Zn(II) tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)phthalocyanine (ZnTM-4-PyPh^{4+}) impregnated on a filter paper substrate for aPDI of Gram-negative species *E. coli* and *Acinetobacter baylyi*. Cell suspensions were placed into 5 mm dyed cellulosic discs (80 mg/m^2 of PS) and irradiated (LED, $\lambda_{\text{400-750 nm}}$, 594 nm maximum, 1.4 mW/cm^2 , 5.04 J/cm^2) for 1 h. In the conditions described, ZnTM-4-PyPh^{4+} decreased *E. coli* and *A. baylyi* colony numbers by 3.72 $\log_{10}$ and 4.01 $\log_{10}$, respectively, while ZnTM-4-PyP^{4+} reduced cell counts by 1.66 $\log_{10}$ and 2.01 $\log_{10}$, for *E. coli* and *A. baylyi*, respectively. It might be worth noting that the porphyrin and the phthalocyanine PSs had absorption maxima at different wavelengths ($\lambda_{\text{430 nm}}$ and 696 nm, respectively) and the light source profile itself was uneven throughout the wavelength spectrum. To overcome these differences, the authors calculated the actual light intensity that each PS would absorb and set the LED to reach the same final light dose for each PS.

Alvarado et al. [106] developed self-disinfecting materials through the covalent bonding of porphyrin-based photosensitizers to nanofibrillated cellulose (NFC) and paper (Pap). Two cationic porphyrins were used: 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tris-(4-*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrin free-base ($\text{H}_2\text{M4APTriM-4-PyP}^{3+}$) and its corresponding Zn(II) complex 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tris-(4-*N*-methylpyridinium)porphyrinato ($\text{ZnM4APTriM-4-PyP}^{3+}$). Gram-positive MRSA strains and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), and Gram-negative multi-resistant strains of *A. baumannii* (MDRAB) and *Klebsiella pneumoniae* multiresistant producer of carbapenemase (NDM) were targeted. The CFU results demonstrated effective aPDI at 20 $\mu\text{mol/L}$ in NFC for all strains studied after irradiation of 60 min (non-coherent light LumaCare™, $\lambda = 400\text{--}700 \text{ nm}$, $65 \pm 5 \text{ mW/cm}^2$) reaching at a minimum of 99.99% photoinactivation. The concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ was chosen for comparing the materials. Against two Gram-positive MRSA and VRE bacteria, both $\text{H}_2\text{M4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -NFC and $\text{ZnM4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -NFC reached inactivation detection limit of (99.9999%), and against the Gram-negative MDRAB bacteria, reached 99.994% and the limit of 99.9999%, respectively. $\text{ZnM4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -NFC inactivated NDM cells by $\sim 66\%$, while no statistically significant inactivation was reached by its free-base counterpart. The authors attributed the remarkable activity of the ZnP (*versus* the analogue free-base porphyrin) to the higher $\Phi^1\text{O}_2$ for ZnP (*i.e.*, 0.156 for $\text{ZnM4APTriM-4-PyP}^{3+}$ *versus* 0.044 for $\text{H}_2\text{M4APTriM-4-PyP}^{3+}$). In an attempt to improve the photodynamic effect for NDM bacteria, longer preincubation times in the dark (up to 60 min) with both PSs were examined. For $\text{H}_2\text{M4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -NFC, the NDM cell viability decreased to 98.8% with 60 min of preincubation, while for $\text{ZnM4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -NFC the decrease was 99.91% with only 5 min of preincubation. When the PSs were conjugated to paper, $\text{H}_2\text{M4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -Pap and $\text{ZnM4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -Pap showed similar results (99.9999%) for the inactivation of VRE, MRSA, and MDRAB bacteria. On NDM cells, however, inactivation differed between these paper-based materials, being 99.9994% and 99.47% for the free-base porphyrin and Zn(II) complex, respectively. The authors suggested that this decrease in inactivation with the ZnP-containing paper material was more likely attributable to the lower PS loading in $\text{ZnM4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -Pap as compared with $\text{H}_2\text{M4APTriM-4-PyP}^{3+}$ -Pap.

The aPDI activity of hyperbranched polyglycerol (hPG) NP loaded with about 15 molecules of ZnP and 20–110 mannose units was investigated [131]. The ZnP complexes derived from 5,10,15-tris(3-hydroxyphenyl)-20-[4-(prop-2-yn-1-ylamino)tetrafluorophenyl]porphyrin (ZnA_3BP). Samples of 7 different ZnP conjugates and 1 free-base porphyrin conjugate were incubated with *S. aureus* for 30 min in the absence of light and then irradiated (50 J/cm^2) with white light (for ZnP conjugates) or laser at 652 nm (for the free-base porphyrin conjugate). The antibacterial phototoxicity of these conjugates was investigated by

counting CFU/mL in cultures of *S. aureus* (10 and 100 $\mu\text{mol/L}$ ZnP concentration) in phosphate-buffered saline (PBS) and in the presence of 10% sterile horse blood serum. In PBS alone, a significant increase of antibacterial activity was observed for conjugates with mannose content of 69 mannose units. According to the authors, these results are indicative of multivalent binding to the bacterial surface supporting the concept of increasing antibacterial aPDI efficacy by multivalent bacterial targeting. However, upon the addition of serum to PBS, quenching of the antibacterial photoeffect was observed. Fluorescence experiments and literature findings suggest protein/NP interactions as one of the main causes for this loss of activity [130].

aPDI was also mediated by a novel dendrimeric Zn(II) porphyrin-based film [113]. In this material, Zn(II) *meso*-tetra(pentafluorophenyl)porphyrin was derivatized *via* click chemistry to incorporate the biscarbazol triphenylamine end-capped dendrimeric motifs. In this structure, the dendrimeric arms act as light-harvesting antennas, increasing the absorption of blue light, and as electroactive moieties. Electrochemical oxidation of the carbazole moieties yields stable, fully π -conjugated, ZnP-containing photoactive polymeric films (FDP5) produced by the electrodeposition technique (Fig. 7A and B). The aPDI assays on *S. aureus* and *E. coli* were carried out after incubation for 24 h, with the PS in a medium containing 10% fetal calf serum. When the cell suspension was deposited on the FDP5 photoactive film surface, complete eradication of *S. aureus* and a 99% reduction in *E. coli* survival was found after 15 and 30 min of irradiation, respectively, using white light or a 652 nm laser (50 J/cm²). The FDP5 film was an effective PS to inactivate *S. aureus* and *E. coli*, even using white light of low fluence rate (0.5 mW/cm²). FDP5 film also eliminated efficiently individual bacteria attached to the surface. The aPDI mediated by FDP5 film-induced >99.99% bacterial killing in biofilms formed on the surface after 60 min of irradiation. Although of elaborate architecture, FDP5 film represented a novel photodynamic active material able to eradicate bacteria as planktonic cells, individually attached microorganisms, or biofilms [113].

3. Zn(II) porphyrins-mediated aPDI of fungi

Fungi are eukaryotic organisms, which have led to significant difficulties in the development of new antifungal drugs [133]. This characteristic combined with the increase in antifungal resistance has made the arsenal of antifungal drugs obsolete, highlighting the need for alternative therapies that avoid the likelihood of resistance [134]. Fungal infections are a major health problem worldwide, causing infections ranging from topical mycoses and skin infections to serious systemic diseases, affecting mainly immunocompromised individuals. Topical infections are more suitable to be treated with aPDI since they are more accessible to light sources and the administration of PS [135,136].

Unlike bacteria, fungi have more complex targets such as their outer wall, made up of a mixture of β -glucan, mannan, chitin, and lipoproteins (Fig. 8A). Thus, these structures can both restrict the penetration of PS and reduce the efficiency of the photodamage in the intracellular organelles. These structures also confer negative charges to cell surface. Thus, the use of cationic PSs for aPDI can be promising because they can offer better uptake when compared with anionic PS [137,138].

Few studies were found using ZnP as PS for aPDI of fungi. The study by Viana et al. [96] evaluated the activity of cationic ZnTE-2-PyP⁴⁺ and quantum dots of cadmium telluride stabilized by mercaptosuccinic acid (MSA-coated CdTe QDs), individually or combined, to mediate aPDI of *Candida albicans*. ZnTE-2-PyP⁴⁺ (10 $\mu\text{mol/L}$) proved to be a promising PS on its own to inactivate *C. albicans*, utilizing 10 min of preincubation time followed by irradiation (LED, $\lambda = 460 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$, and 150 mW/cm²) for 9 min. This led to a reduction of 3 log₁₀ CFU in cell viability, showing the potential of ZnTE-2-PyP⁴⁺ as PS for antifungal aPDI (Fig. 8B). Although the combination of ZnP and QDs increased ROS production, when compared to ZnP alone, there was no improvement on aPDI of *C. albicans* when the combined QDs-ZnP system was used. The authors theorized that the electrostatic conjugation of ZnTE-2-PyP⁴⁺ with QDs prevented the transmembrane cellular uptake of the ZnP molecules, reducing their fungicidal photoeffect. Low toxicity of the

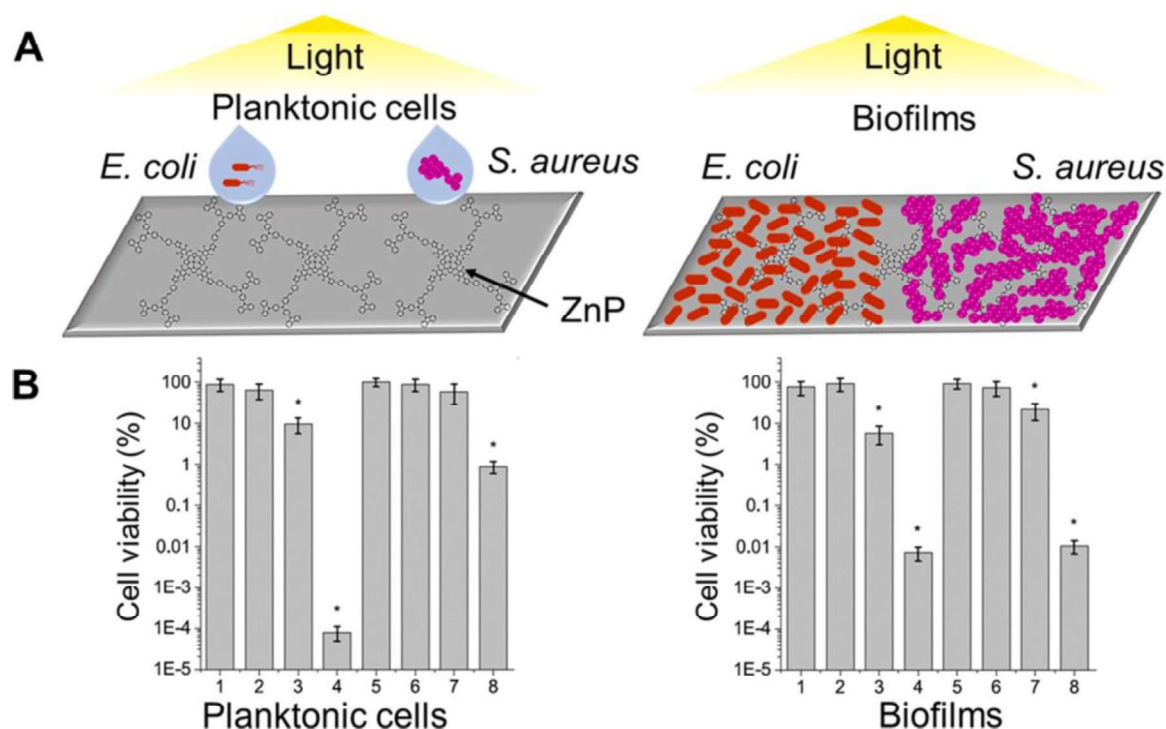


Fig. 7. (A) Schematic representation of aPDI of planktonic cells and biofilm of *E. coli* and *S. aureus* on FDP5 polymeric film. (B) Cell viability of *S. aureus* (1-4) and *E. coli* (5-8) submitted to aPDI: (1 and 5) FDP5-free substrate dark control; (2 and 6) FDP5 dark control; (3 and 7) FDP5-free substrate under irradiation; (4 and 8) FDP5 under irradiation. Irradiation time using visible light: 15 min for *S. aureus*; 30 min for *E. coli*; 60 min for both biofilms. Adapted with permission from Heredia et al. [113], ACS Appl. Mater. Interfaces. © 2019, American Chemical Society.

three systems (QDs, ZnP, QDs-ZnP) in dark conditions was observed using murine fibroblasts (ATCC CRL 163). Phototoxicity, however, with either free ZnP or ZnP-QD conjugates was more pronounced than that observed with QDs alone, where cell viability varied from 60% to 40% depending on the concentration of QDs.

In a more recent study by Moghnie et al. [95], the effect of hydrophobicity of cationic ZnPs was evaluated as a potential factor in aPDI of *S. cerevisiae* yeasts, as assessed by Awad et al. [94] for *E. coli* bacteria (previously reported in Section 3). This study evaluated the PS efficacy of structurally related cationic Zn(II) 2-*N*-alkylpyridylporphyrins, in which ZnP lipophilicity was modulated by the choice of the peripheral alkyl side-chains, i.e., methyl (ZnTM-2-PyP⁴⁺), n-butyl (ZnTnBu-2-PyP⁴⁺), n-hexyl (ZnTnHex-2-PyP⁴⁺), and n-octyl (ZnTnOct-2-PyP⁴⁺); chlorine e6 was evaluated as a positive control. *S. cerevisiae* cells were incubated for 90 min with PS and then irradiated (300 W white light, 78 mW/cm²) for 60 min. The cell viability was evaluated by the MTT assay. Results showed that the ZnPs bearing alkyl side-chains up to four carbons in length exhibited the least photo-efficiency; these shorter side-chain ZnPs comprise the most hydrophilic compounds among the series. The most lipophilic compound, ZnTnOct-2-PyP⁴⁺, have an accentuated effect in yeast photo-inactivation, but displayed high dark toxicity. The six-carbon alkyl side-chain ZnP (ZnTnHex-2-PyP⁴⁺) produced an amphiphilic PS, which completely suppressed yeast metabolism. ZnTnHex-2-PyP⁴⁺-mediated aPDI caused enzymatic inactivation of lactate dehydrogenase (LDH) and IDH, together with significant damage to the plasma membrane. Moreover, this study demonstrated that yeasts internalized ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ more efficiently than the hydrophilic analogue (ZnTM-2-PyP⁴⁺), which contributed to the effective photodynamic effect of ZnTnHex-2-PyP⁴⁺. Finally, ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ at low concentrations of 0.5–5 μmol/L proved to be more powerful a PS for yeast inactivation than the commercial chlorin e6.

4. Zn(II) porphyrin-mediated aPDI of viruses

Viral envelopes are promising targets in the development of broad-spectrum antivirals against enveloped viruses. The targeting of the envelope by the antiviral causes changes in fluidity or dysfunction in the fusion process between the virus and the host cell membrane (Fig. 9A), which is an essential step in the infection process [139,140]. ZnPs have great potential for aPDI of viruses, due to their charge and adjustable hydrophilicity, which can allow better interactions with the viral envelope [141]. This may ultimately accentuate oxidative damage of

important viral glycoproteins necessary for infection [142] and/or lead to overall membrane damage [143]. In this Section, we will review some studies on ZnP-based aPDI as a promising antiviral alternative.

Cruz-Oliveira et al. [110] evaluated the antiviral activities and mechanisms of action of three porphyrins, anionic protoporphyrin IX (H₂PPIX²⁻), anionic Zn(II) protoporphyrin IX (ZnPPPIX²⁻), and anionic mesoporphyrin IX (H₂MPIX²⁻) using the vesicular stomatitis virus (VSV) in suspension in culture medium as a biological model. The anionic character of these natural porphyrin derivatives arises from the deprotonation of their propionic acid side-chain under physiological pH. Different concentrations of PSs were applied for 1 h, in the dark or under illumination, using a 30 W fluorescent lamp with a light emission of 2,000 lux to promote photoactivation. At a concentration of 5 μmol/L, all porphyrins tested were able to completely suppress VSV infectivity, without photoactivation. When photoactivated, they enhanced the antiviral activity eliminating the infectivity with ZnPPPIX²⁻ at 0.1 μmol/L, H₂PPIX²⁻ at 0.01 μmol/L, and H₂MPIX²⁻ at 0.1 μmol/L. Furthermore, the study proved that these porphyrins caused protein damage in VSV. This effect was also increased when the porphyrins were photoactivated, inducing crosslinking of VSV and G glycoprotein, an essential element for membrane fusion necessary for infection. The authors suggested that this result was possibly due to the higher production of ¹O₂ by photoactivation of H₂PPIX²⁻, ZnPPPIX²⁻, and H₂MPIX²⁻, pointing the Type II mechanism as the main source of ROS responsible for damage to viral proteins. The quantification of ¹O₂ was carried out by oxidation of 9,10-dimethylanthracene (DMA) to yield oxi-DMA. Besides, the effect of infectivity was assessed after ¹O₂ inhibition using sodium azide and α-tocopherol. To evaluate the potential of porphyrins in the treatment of infectious diseases in the bloodstream, the application of viral inactivation in cell culture was simulated. It was observed viral inactivation, although in a smaller amount than when the purified virus was previously incubated with porphyrins. Virus titer was quantified by plaque assay in hamster kidney fibroblasts (BHK-21). Also, it is important to comment that the cell viability of fibroblasts was preserved during the irradiation process with porphyrins, which induced a decrease in the viral titer.

Teles et al. [91] assessed the photodynamic inactivation of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) in suspension using four porphyrins: the anionic *meso*-tetrakis(p-sulfonatophenyl)porphyrin (H₂TPPS₄⁴⁻), cationic *meso*-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl) (H₂TM-4-PyP⁴⁺) and their Zn(II) complexes ZnTPPS₄⁴⁻ and ZnTM-4-PyP⁴⁺. At a concentration of 5 μmol/L, porphyrins did not present cytotoxicity without irradiation, the majority of porphyrins was highly effective in aPDI of

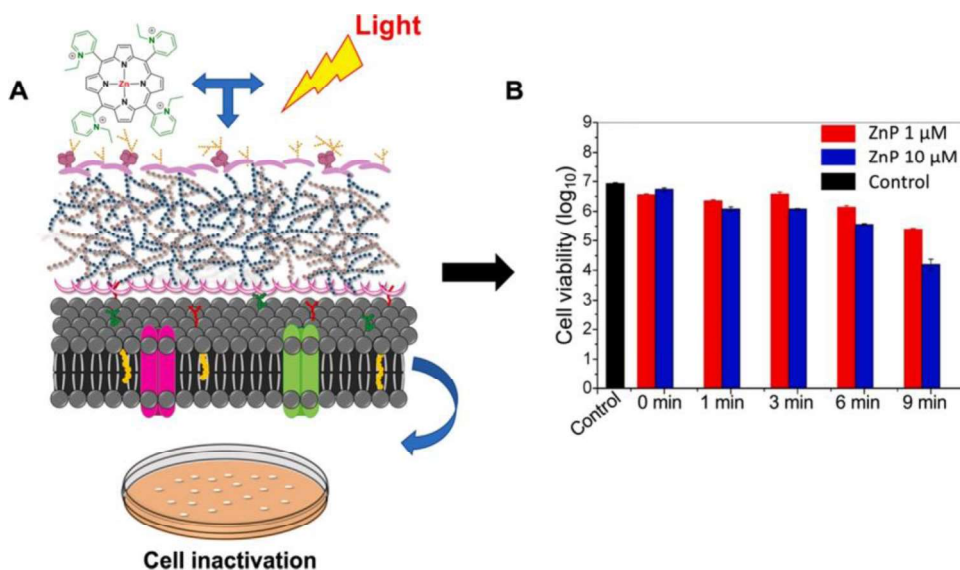


Fig. 8. The vast majority of fungi have a thick cell wall composed of polysaccharides and proteins (A), hindering the compound to reach the intracellular location. For aPDI to inactivate fungi, a PS needs to connect and be absorbed by the fungal cell, inducing then critical damage to cellular structures that would lead to cell death. It is possible to observe in the plot (B) that the use of ZnTE-2-PyP⁴⁺ as a photosensitizer against *C. albicans* resulted in a significant reduction in cell viability of up to ~3 log₁₀ units, demonstrating its antifungal potential. Reproduced from Viana et al. [96], Molecules (2015), with permission under the open access Creative Common CC BY license. © 2015, MDPI.

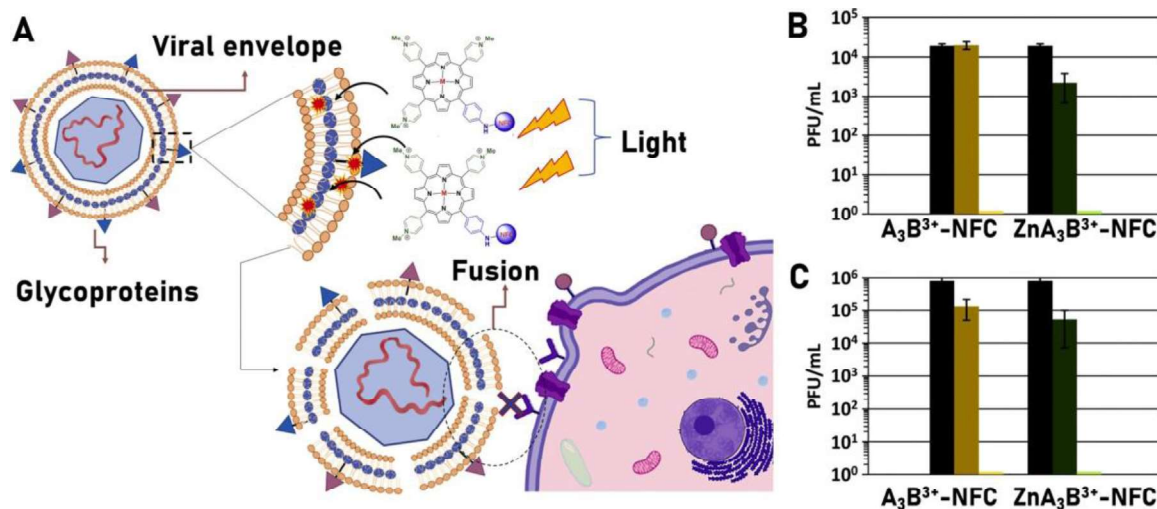


Fig. 9. (A) The image above illustrates the process of damage to the viral envelope exerted by the production of ROS via porphyrins photoactivation. The integrity of the virus is compromised and, likewise, the glycoproteins necessary for the fusion with the host cells are damaged, preventing the infection process. The result of the inactivation potential of the dengue-1 virus and vesicular stomatitis virus (VSV) is shown in (B) and (C) respectively, using H₂M4APTriM-4-PyP³⁺ (A₃B₃³⁺; M = 2H⁺) and ZnM4APTriM-4-PyP³⁺ (ZnA₃B₃³⁺; M = Zn²⁺) conjugated to nanofibrillated cellulose (NFC). For both B and C panels, the bars are color-coded as: (i) black, the PS-free (dark controls); (ii) dark yellow, A₃B₃³⁺-NFC but no light group (PS alone); (iii) dark green, ZnA₃B₃³⁺-NFC but no light (PS alone); (iv) light yellow A₃B₃³⁺-NFC + irradiation group (PS + light); (v) light green, ZnA₃B₃³⁺-NFC + irradiation group (PS + light). PFU is plaque-forming unit which correspond to the measure of number of infectious virus particles. Reproduced from Alvarado et al. [106], Green Chemistry (2019), with permission from The Royal Society of Chemistry.

BoHV-1, after 120 min irradiation induced complete virus inactivation, except H₂TPPS₄⁴⁻ that reduced by 5 log₁₀ (halogen lamp, λ = 400–900 nm, 130 mW/cm², preincubation time of 60 min). Virus inactivation followed in decreasing order, where the best inactivation corresponded to ZnTM-4-PyP⁴⁺ and the porphyrin that had the least inactivation was H₂TPPS₄⁴⁻, following the order: ZnTM-4-PyP⁴⁺ > H₂TM-4-PyP⁴⁺ > ZnTPPS₄⁴⁻ > H₂TPPS₄⁴⁻. The cationic porphyrins H₂TM-4-PyP⁴⁺ and ZnTM-4-PyP⁴⁺, due to their positive charge and better interaction with the viral envelope, were more efficient as PS than the anionic PSS (H₂TPPS₄⁴⁻ and ZnTPPS₄⁴⁻). The electrostatic attraction and the lower hydrophilicity observed for ZnTM-4-PyP⁴⁺, rendered by the insertion of Zn(II) in its structure, contributed to its greater efficiency compared to the other PSs. Thus, the study showed that cationic ZnPs, due to their charge and lipophilicity characteristics combined, are more likely to induce photodamage to viral glycoproteins. Their attraction to the lipoprotein envelope leads to a marked reduction in the time required for virus inactivation and a decreased virus infectivity when compared to anionic porphyrins.

Unlike the two previous studies in this Section, the study published by Alvarado et al. [106] (also mentioned in Section 3), evaluated the functionalization of cellulose biopolymer with porphyrins as antimicrobial material candidates for surface coatings or personal protective equipment in the healthcare environments, avoiding contamination by pathogens. The porphyrins H₂M4APTriM-4-PyP³⁺ (A₃B₃³⁺) and ZnM4APTriM-4-PyP³⁺ (ZnA₃B₃³⁺), which are structurally related to H₂TMPyP⁴⁺ derivatives, were covalently attached to NFC and the ability of the resulting material for viral inactivation was evaluated in two viral strains in suspension (VSV and dengue-1 subtype) under visible illumination (non-coherent light LumaCare™, λ = 400–700 nm, 65–5 mW/cm²) for 1 h, with controls in the dark for the same time. Both H₂M4APTriM-4-PyP³⁺-NFC (A₃B₃³⁺-NFC) and ZnM4APTriM-4-PyP³⁺-NFC (ZnA₃B₃³⁺-NFC) materials induced complete inactivation of the pathogens using a concentration of 5 μ mol/L (Fig. 9B and C). The authors suggested that this strategy of conjugating PS to biopolymers has the potential to be used in large-scale nanocellulosic materials, which may later be woven into textiles to prevent nosocomial infections.

5. Zn(II) porphyrins-mediated aPDI of parasites

Parasitic diseases, despite being very common in the world, are often considered neglected tropical diseases as they affect majorly, but not exclusively, poor populations in the most vulnerable regions of the planet. They are considered neglected diseases mainly due to the lack of investments in therapies and innovations, which reflects the extremely small number of drugs that have reached the market over the last few decades. The toxicity of classic antiparasitic drugs, the long treatment regimen, the mode of administration, and the resistance mechanisms acquired by protozoa and helminths over time are factors that limit the use of these compounds [144–146]. The combination of these factors reinforces the need for developing new and more effective therapeutic options.

Due to the clinical efficacy of PDT in localized skin diseases and the growing evidence of its antimicrobial activity [11,33], researchers have started trials related to the treatment of cutaneous leishmaniasis (CL) and observed promising results. Antiparasitic PDI is an emerging approach for the treatment of CL, since no major adverse effects, contraindications, or resistance of parasites have been reported so far [26, 65,146,147]. Studies in patients have shown that the application of PDT, in general, while being effective against CL, also showed improvements in the signs of skin aging. The cosmetic results were promising when compared to conventional treatments [8].

Despite favorable results using ZnPs in bacteria [7,98], studies related to their application in parasites are still scarce. Espitia-Almeida et al. [26], exploring metalloporphyrins for photodynamic treatment, observed that among the 7 porphyrin compounds used in the study against the promastigote forms of *L. panamensis* and *L. amazonensis*, the complex with Zn(II) was classified as the best PS tested. The irradiation source used was Omnilux lamps (EL10000AG, λ = 420–450 nm, 80 J/cm²), with incubation and irradiation time simultaneously of 24 h. Zn(II) meso-tetrakis(4-ethylphenyl)porphyrin (ZnT4EtPP) showed higher Φ^1O_2 and better IC₅₀ values of 1.2 μ mol/L for *L. panamensis*, and 11.6 μ mol/L for *L. braziliensis* in aPDI assays, using MTT to assess the cell survival.

Espitia-Almeida et al. [93] prepared H₂TBAP⁴⁻ and its Zn(II) derivative, ZnTBAP⁴⁻, for photophysical studies and biological activity using promastigote forms of *L. panamensis* and *L. braziliensis*. The irradiation

source was a lamp (Omnilux lamps EL10000AG, $\lambda = 420\text{--}450\text{ nm}$), being applied 80 J/cm^2 of light dose and 24 h of exposure time). With the insertion of Zn(II) into $\text{H}_2\text{TBAP}^{4-}$ to yield ZnTBAP^{4-} , a change in the photophysical properties was noted, such as a reduction in Φ_F from 0.23 to 0.10, respectively, and an increase in $\Phi^1\text{O}_2$ from 0.75 to 0.93, respectively. The authors reported that parasite mortality was directly attributed to singlet oxygen produced by the compounds; in this sense, the ZnTBAP^{4-} compound with lower Φ_F and higher $\Phi^1\text{O}_2$ exerted high antileishmanial activity against the parasites and achieved the best IC_{50} values ($2.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ for *L. panamensis* and $7.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ for *L. braziliensis*). The IC_{50} value found for aPDI with ZnTBAP^{4-} compound was at least 5-fold smaller than that of the standard drug (Glucantime) used against *L. panamensis* ($\text{IC}_{50}\ 12.7\text{ }\mu\text{mol/L}$) and *L. braziliensis* ($\text{IC}_{50}\ 36.9\text{ }\mu\text{mol/L}$). The authors also mention that ZnTBAP^{4-} is a promising compound to further *in vivo* aPDI studies in mice.

Andrade et al. [97] performed photoinactivation ($\text{LED}, \lambda\ 455\text{--}20\text{ nm}$, 300 mW/cm^2 , 90 J/cm^2) for 10 min, using cationic hydrophilic ZnP (ZnTE-2-PyP^{4+}) at a concentration of $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ on *L. braziliensis* parasites. The preincubation time was 10 min. The authors reported damage of ca. 90% in promastigote forms and a reduction of about 40% in the number of amastigotes per macrophage, after aPDI. The treatment showed no considerable toxicity on mammalian cells (J774 macrophages and Vero cells), under the conditions evaluated.

Souza et al. [81] investigated the photodynamic effects mediated by a cationic and lipophilic water-soluble ZnP ($\text{ZnTnHex-2-PyP}^{4+}$) at a concentration of 0.62 and $1.25\text{ }\mu\text{mol/L}$ on *L. braziliensis* and *L. amazonensis* promastigote forms ($\text{LED}, \lambda\ 410 \pm 10\text{ nm}$, 19.1 mW/cm^2 , 3.4 J/cm^2). The cells were preincubated for 5 min and irradiated for 3 min. The percentage of promastigote survival was evaluated by the trypan blue exclusion and both PS concentrations induced cell death to more than 99% to both *Leishmania* species, compared to the control without treatment. aPDI also led to reductions of ca. 64% in the number of amastigotes per macrophage and 70% in the infection index at $1.25\text{ }\mu\text{mol/L}$. No noteworthy toxicity was observed on macrophages (bone-marrow), under the conditions applied.

Souza et al. and Andrade et al. studies [81,97] showed a direct or indirect photodynamic effect of ZnPs on the mitochondrion of *Leishmania* promastigote forms. The dysfunction of this organelle results in a partial reduction, or complete inhibition, of adenosine triphosphate (ATP) production (Fig. 10A). Andrade et al. [97] used rhodamine 123, a fluorescent dye that can be used to monitor the potential of the mitochondrial membrane ($\Delta\Psi_m$), and observed an evident hyperpolarization. The authors associated this result with a final attempt of cells to prevent death, since $\Delta\Psi_m$ depolarization could be preceded by a high transient hyperpolarization. On the other hand, Souza et al. [81]

observed an intense $\Delta\Psi_m$ depolarization after the photodynamic treatment mediated by $\text{ZnTnHex-2-PyP}^{4+}$. The authors attributed the distinct $\Delta\Psi_m$ behavior among $\text{ZnTnHex-2-PyP}^{4+}$ and ZnTE-2-PyP^{4+} to higher lipophilicity of $\text{ZnTnHex-2-PyP}^{4+}$, indicating an enhanced interaction with the cell membrane and a greater intracellular PS bioavailability, which led to effective cell death under low concentration and irradiation light doses.

The mitochondria play a key role in cell energy production and their importance for cell survival or death is well established. This is particularly relevant to protozoa of *Leishmania* spp. which have a single mitochondrion and are not able to compensate correctly any damage in this organelle. Consequently, parasite survival requires the correct performance of the mitochondrial respiratory chain [26,97,148,149].

Andrade et al. [97] observed noticeably morphological changes in promastigote forms of *L. braziliensis* subjected to aPDI by scanning electron microscopy (SEM). Whereas the control groups showed normal spindle-shaped bodies and smooth cell membranes (Fig. 10B), the promastigote groups subjected to aPDI mediated by ZnTE-2-PyP^{4+} exhibited changes in membrane morphology and cell volume (Fig. 10C) [97]. SEM analyses of *L. amazonensis* promastigotes photodynamically treated with $\text{ZnTnHex-2-PyP}^{4+}$, reported by Souza [81], also indicated similar morphological changes.

The results published so far on leishmaniasis encourage further studies related to the application, understanding, and evaluation of the effects of ZnP-mediated aPDI. ZnP-based aPDI may give rise to effective photoactive experimental therapies as promising treatment for leishmaniasis.

Table 2 presents a compilation of the results of all the different antimicrobial studies presented in this review.

6. Conclusions

Zn(II) porphyrins are promising PSs for aPDI. In addition to the native porphyrins, synthetic procedures can be explored to design innovative porphyrin structures with improved chemical and photophysical properties. The incorporation of Zn(II) into the porphyrin structure increased in most instances the PS efficiency compared to other metalloporphyrins and particularly with respect to their corresponding free-base ligand. The lipophilicity, amphiphilicity and cationic features of ZnPs also seem to play a paramount role in the ZnP uptake by cells, subcellular distribution, and, consequently, modulation of ZnP photoefficiency for aPDI. Despite the great progresses on ZnP-based aPDI in the past decade, there is a clear need for further studies focused on the photochemical and photophysical characteristics of ZnPs, $\Phi^1\text{O}_2$, triplet lifetime, ground-state and excited-state redox potentials,

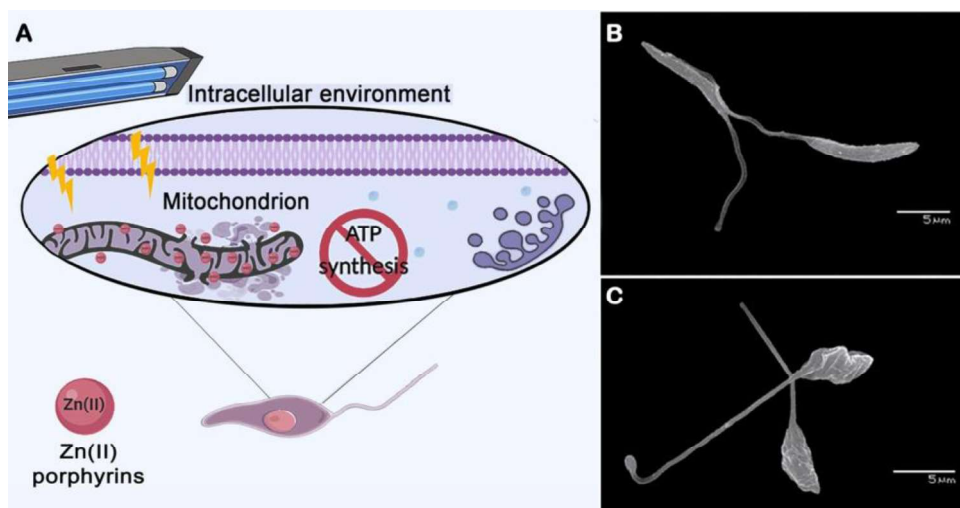


Fig. 10. (A) Illustrative scheme depicting the biological action of ZnPs directly or indirectly on target organelles, in this case, the mitochondrion, partially or totally reducing ATP production and leading to the death of the protozoan. In the right, representative images of the photodynamic effect on the ultrastructure of the promastigote forms of *L. braziliensis*; (B) Untreated control; (C) Treatment with $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ZnTE-2-PyP^{4+} + light (90 J/cm^2). Reproduced from Andrade et al. [97] with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

among other relevant properties. The studies designed to unravel unambiguously the contributions of Type I or Type II pathways of ZnP-based photodamage mechanisms under relevant biological conditions are also needed.

While several studies have employed ZnPs for aPDI of bacteria, the application of these compounds in the photoinactivation of fungi, parasites, and viruses is still scarce in the literature. Nonetheless, as discussed in this review, ZnPs showed promising efficiency to inactivate these microorganisms. The available information about ZnP-mediated aPDI supports the potential of photodynamic treatment as an alternative technology especially for topical infections and highlights the need for further studies on aPDI of microorganisms other than bacteria. If properly explored, ZnP-mediated aPDI has also the potential to subvert microbial drug resistance.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We are grateful to the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). This work was supported by the Wellcome Trust [219677_Z_19_Z]. This study is also associated with the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica (INCT-INFO).

References

- [1] N.S. Thakor, K.S. Wilson, P.G. Scott, D.E. Taylor, An improved procedure for expression and purification of ribosomal protection protein Tet(O) for high-resolution structural studies, *Protein Expr. Purif.* 55 (2007) 388–394, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.04.016>.
- [2] W. Witte, C. Cuny, I. Klare, U. Nübel, B. Strommenger, G. Werner, Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens, *Int. J. Med. Microbiol.* 298 (2008) 365–377, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.10.005>.
- [3] M. Wainwright, L. Amaral, Photobactericides—a local option against multi-drug resistant Bacteria, *Antibiotics* 2 (2013) 182–190, <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020182>.
- [4] CDC, Biggest Threats and Data 2019 AR Threats Report, 2020 (accessed October 30, 2020), <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>.
- [5] S. Harbarth, H.H. Balkhy, H. Goossens, V. Jarlier, J. Kluytmans, R. Laxminarayan, M. Saam, A. Van Belkum, D. Pittet, Antimicrobial resistance: one world, one fight!, *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 4 (2015) 49, <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0091-2>.
- [6] C.F.A. Ribeiro, G.G. de O.S. Silveira, Ede S. Cândido, M.H. Cardoso, C.M. Espínola Carvalho, O.L. Franco, Effects of antibiotic treatment on gut microbiota and how to overcome its negative impacts on human health, *ACS Infect. Dis.* 6 (2020) 2544–2559, <https://doi.org/10.1021/acscinfeddis.0c00036>.
- [7] M. Thomas, J.D. Craik, A. Tovmasyan, I. Batinic-Haberle, L.T. Benov, Amphiphilic cationic Zn-porphyrins with high photodynamic antimicrobial activity, *Future Microbiol.* 10 (2015) 709–724, <https://doi.org/10.2217/fmb.14.148>.
- [8] S.R. Annunzio, N.C.S. Costa, R.D. Mezzina, M.A.S. Graminha, C.R. Fontana, Chlorin, phthalocyanine, and porphyrin types derivatives in phototreatment of cutaneous manifestations: a review, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 3861, <https://doi.org/10.3390/ijms20163861>.
- [9] S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka, Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.* 106 (2018) 1098–1107, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.
- [10] N. Kashef, M.R. Hamblin, Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resist. Updat.* 31 (2017) 31–42, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2017.07.003>.
- [11] M.R. Hamblin, Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes, *Curr. Opin. Microbiol.* 33 (2016) 67–73, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>.
- [12] N. Couto, J. Wood, J. Barber, The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network, *Free Radic. Biol. Med.* 95 (2016) 27–42, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>.
- [13] O.M. Ighodaro, O.A. Akinloye, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria J. Med.* 54 (2018) 287–293, <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- [14] F. Sperandio, Y.-Y. Huang, M. Hamblin, Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative Bacteria, *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 8 (2013) 108–120, <https://doi.org/10.2174/1574891X113089990012>.
- [15] L.B. de Oliveira de Siqueira, V. da Silva Cardoso, I.A. Rodrigues, A.L. Vazquez-Villa, E.P. dos Santos, B. da Costa Leal Ribeiro Guimarães, C. dos Santos Cerqueira Coutinho, A.B. Vermelho, E.R. Junior, Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for Leishmania spp, *Nanotechnology* 28 (2017), 065101, <https://doi.org/10.1088/1361-6528/28/6/065101>.
- [16] C. Queirós, P.M. Garrido, J. Maia Silva, P. Filipe, Photodynamic therapy in dermatology: beyond current indications, *Dermatol. Ther.* (2020), <https://doi.org/10.1111/dth.13997>.
- [17] A. Martinez De Pinillos Bayona, P. Mroz, C. Thunshelle, M.R. Hamblin, Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers, *Chem. Biol. Drug Des.* 89 (2017) 192–206, <https://doi.org/10.1111/cbdd.12792>.
- [18] A. Regiel-Futyr, J.M. Dąbrowski, O. Mazuryk, K. Śpiewak, A. Kyzioł, B. Pucelik, M. Brindell, G. Stochel, Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era, *Coord. Chem. Rev.* 351 (2017) 76–117, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.05.005>.
- [19] J. Bhaumik, S. Kirar, J.K. Laha, Theranostic nanoconjugates of tetrapyrrolic macrocycles and their applications in photodynamic therapy, in: I. Batinic-Haberle, J.S. Rebouças, I. Spasojević (Eds.), *Redox-Active Ther.*, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 509–524, https://doi.org/10.1007/978-3-319-30705-3_22.
- [20] O.S. Viana, M.S. Ribeiro, A. Fontes, B.S. Santos, Quantum dots in photodynamic therapy, in: I. Batinic-Haberle, J.S. Rebouças, I. Spasojević (Eds.), *Redox-Active Ther.*, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 525–539, https://doi.org/10.1007/978-3-319-30705-3_23.
- [21] B. Pucelik, A. Sulek, J.M. Dąbrowski, Bacteriochlorins and their metal complexes as NIR-absorbing photosensitizers: properties, mechanisms, and applications, *Coord. Chem. Rev.* 416 (2020), 213340, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213340>.
- [22] D. Mondal, S. Bera, Porphyrins and phthalocyanines: promising molecules for light-triggered antibacterial nanoparticles, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2014), 033002, <https://doi.org/10.1088/2043-6262/5/3/033002>.
- [23] B. Amos-Tautua, S. Songca, O. Oluwafemi, Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy, *Molecules* 24 (2019), 2456, <https://doi.org/10.3390/molecules24132456>.
- [24] R. Ezzeddine, A. Al-Banaw, A. Tovmasyan, J.D. Craik, I. Batinic-Haberle, L. T. Benov, Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn(II) N-Alkylpyridylporphyrins, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 36579–36588, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.511642>.
- [25] C. Pavani, A.F. Uchoa, C.S. Oliveira, Y. Iamamoto, M.S. Baptista, Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 233–240, <https://doi.org/10.1039/B810313E>.
- [26] F. Espitia-Almeida, C. Díaz-Urbe, W. Vallejo, D. Gómez-Camargo, A.R. Romero Bohórquez, In vitro anti-leishmanial effect of metallic meso-substituted porphyrin derivatives against leishmania braziliensis and leishmania panamensis promastigotes properties, *Molecules* 25 (2020), 1887, <https://doi.org/10.3390/molecules25081887>.
- [27] W.-P. Fong, H.-Y. Yeung, P.-C. Lo, D.K.P. Ng, Photodynamic therapy. *Handb. Photonics Biomed. Eng.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2017, pp. 657–681, https://doi.org/10.1007/978-94-007-5052-4_35.
- [28] M.S. Baptista, J. Cadet, A. Greer, A.H. Thomas, Photosensitization reactions of biomolecules: definition, targets and mechanisms, *Photochem. Photobiol.* (2021), pph.13470, <https://doi.org/10.1111/pph.13470>.
- [29] M.S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A.A. Ghogare, A. Greer, M.R. Hamblin, C. Lorente, S.C. Nunez, M.S. Ribeiro, A.H. Thomas, M. Vignoni, T.M. Yoshimura, Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways, *Photochem. Photobiol.* 93 (2017) 912–919, <https://doi.org/10.1111/pph.12716>.
- [30] L. Benov, Photodynamic therapy: current status and future directions, *Med. Princ. Pract.* 24 (2015) 14–28, <https://doi.org/10.1159/000362416>.
- [31] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1 (2004) 279–293, [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- [32] H. Hou, X. Huang, G. Wei, F. Xu, Y. Wang, S. Zhou, Fenton reaction-assisted photodynamic therapy for Cancer with multifunctional magnetic nanoparticles, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 29579–29592, <https://doi.org/10.1021/acsaami.9b09671>.
- [33] Y.-Y. Huang, A. Wintner, P.C. Seed, T. Brauns, J.A. Gelfand, M.R. Hamblin, Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue and potassium iodide to treat urinary tract infection in a female rat model, *Sci. Rep.* 8 (2018), 7257, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25365-0>.
- [34] J.Y. Nagata, N. Hioka, E. Kimura, V.R. Batistela, R.S.S. Terada, A.X. Graciano, M. L. Baesso, M.F. Hayacibara, Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 9 (2012) 122–131, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.11.006>.

- [35] E. Sorbellini, M. Rucco, F. Rinaldi, Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update, *Lasers Med. Sci.* 33 (2018) 1431–1439, <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2584-8>.
- [36] M.S. Ribeiro, D. de F.T. da Silva, S.C. Núñez, D.M. Zezell, *Laser em baixa intensidade. Técnicas E Procedimentos Ter.*, 2011, pp. 945–953.
- [37] R. de F.Z. Lizarelli, *Protocolos clínicos odontológicos: uso do laser de baixa intensidade. Uso Do Laser Baixa Intensidade*, 2010, pp. 19–22, 4th, São Paulo.
- [38] M.S. Patterson, Photodynamic therapy dosimetry: a TO Z. Handb. Photodyn. Ther., WORLD SCIENTIFIC, 2016, pp. 295–315, https://doi.org/10.1142/9789814719650_0008.
- [39] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy, *Phys. Med. Biol.* 53 (2008) R61–R109, <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>.
- [40] B. Habermeyer, R. Guillard, Some activities of PorphyrinChem illustrated by the applications of porphyrinoids in PDT, PIT and PDI, *Photochem. Photobiol. Sci.* 17 (2018) 1675–1690, <https://doi.org/10.1039/C8PP00222C>.
- [41] D. Pan, X. Zhong, W. Zhao, Z. Yu, Z. Yang, D. Wang, H. Cao, W. He, Meso-substituted porphyrin photosensitizers with enhanced near-infrared absorption: synthesis, characterization and biological evaluation for photodynamic therapy, *Tetrahedron* 74 (2018) 2677–2683, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.04.025>.
- [42] L.P. Cook, G. Brewer, W. Wong-Ng, Structural aspects of porphyrins for functional materials applications, *Crystals* 7 (2017), 223, <https://doi.org/10.3390/cryst7070223>.
- [43] T.P. Wijesekera, D. Dolphin, ChemInform abstract: synthetic aspects of porphyrin and metalloporphyrin chemistry, *ChemInform* 26 (2010), <https://doi.org/10.1002/chin.199534281> no-no.
- [44] E.F.F. Silva, F.A. Schaberle, C.J.P. Monteiro, J.M. Dąbrowski, L.G. Arnaut, The challenging combination of intense fluorescence and high singlet oxygen quantum yield in photostable chlorins – a contribution to theranostics, *Photochem. Photobiol. Sci.* 12 (2013) 1187, <https://doi.org/10.1039/c3pp25419d>.
- [45] R.K. Pandey, M.M. Siegel, R. Tsao, J.H. McReynolds, T.J. Dougherty, Fast atom bombardment mass spectral analyses of Photofrin II® and its synthetic analogs, *Biol. Mass Spectrom.* 19 (1990) 405–414, <https://doi.org/10.1002/bms.1200190705>.
- [46] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889–905, <https://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>.
- [47] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 380–387, <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- [48] S.S. Stylli, M. Howes, L. MacGregor, P. Rajendra, A.H. Kaye, Photodynamic therapy of brain tumours: evaluation of porphyrin uptake versus clinical outcome, *J. Clin. Neurosci.* 11 (2004) 584–596, <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2004.02.001>.
- [49] T. Yoshida, T. Saeki, S. Ohashi, T. Okudaira, M. Lee, H. Yoshida, H. Maruoka, H. Ito, S. Funasaka, H. Kato, Clinical study of photodynamic therapy for laryngeal cancer, *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho.* 98 (1995) 795–804, <https://doi.org/10.3950/jibiinkoka.98.795>, 927.
- [50] V.V. Sokolov, Clinical fluorescence diagnostics in the course of photodynamic therapy of cancer with the photosensitizer PHOTOGEN. *Proc. SPIE*, SPIE, 1995, pp. 375–380, <https://doi.org/10.1117/12.199170>.
- [51] T.J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, The bacterial cell envelope, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414> a000414–a000414.
- [52] T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2329–2335, <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005>.
- [53] J.A. Imlay, The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium, *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2013) 443–454, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>.
- [54] M.J. Davies, Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 17, <https://doi.org/10.1039/b307576c>.
- [55] I. Fridovich, Oxygen: how do we stand it? *Med. Princ. Pract.* 22 (2013) 131–137, <https://doi.org/10.1159/000339212>.
- [56] M.C. Berenbaum, R. Bonnet, E.B. Chevetron, S.L. Akande-Adebakin, M. Ruston, Selectivity of meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrins and chlorins and of photofrin II in causing photodamage in tumour, skin, muscle and bladder. The concept of cost-benefit in analysing the results, *Lasers Med. Sci.* 8 (1993) 235–243, <https://doi.org/10.1007/BF02547845>.
- [57] B. Marydasan, A.K. Nair, D. Ramaiah, Optimization of triplet excited state and singlet oxygen quantum yields of picolylamine-Porphyrin conjugates through zinc insertion, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 13515–13522, <https://doi.org/10.1021/jp407524w>.
- [58] J.N. Silva, A. Galmiche, J.P.C. Tomé, A. Boullier, M.G.P.M.S. Neves, E.M.P. Silva, J.-C. Capod, J.A.S. Cavaleiro, R. Santos, J.-C. Mazière, P. Filipe, P. Morlière, Chain-dependent photocytotoxicity of tricationic porphyrin conjugates and related mechanisms of cell death in proliferating human skin keratinocytes, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1373–1385, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.033>.
- [59] M.J. Casteel, K. Jayaraj, A. Gold, L.M. Ball, M.D. Sobsey, Photoinactivation of hepatitis A virus by synthetic porphyrins, *Photochem. Photobiol.* 80 (2007) 294–300, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2004.tb00086.x>.
- [60] J. Lin, M.T. Wan, Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* (2014) 145, <https://doi.org/10.2147/CCID.S35334>.
- [61] E. Alves, M.A. Faustino, M.G. Neves, A. Cunha, J. Tome, A. Almeida, An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation, *Future Med. Chem.* 6 (2014) 141–164, <https://doi.org/10.4155/fmc.13.211>.
- [62] M. Merchat, G. Bertolini, P. Giacomini, A. Villaneuva, G. Jori, Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 32 (1996) 153–157, [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(95\)07147-4](https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)07147-4).
- [63] K. Kassab, D. Dei, G. Roncucci, G. Jori, O. Coppellotti, Phthalocyanine-photosensitized inactivation of a pathogenic protozoan, *Acanthamoeba palestinensis*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2 (2003) 668, <https://doi.org/10.1039/b300293d>.
- [64] K. Kassab, T. Ben Amor, G. Jori, O. Coppellotti, Photosensitization of Colpoda inflata cysts by meso-substituted cationic porphyrins, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002) 560–564, <https://doi.org/10.1039/b201267g>.
- [65] C.-A. Bristow, R. Hudson, T.A. Paget, R.W. Boyle, Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 3 (2006) 162–167, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2006.04.004>.
- [66] F.M. Engelmann, I. Mayer, D.S. Gabrielli, H.E. Toma, A.J. Kowaltowski, K. Araki, M.S. Baptista, Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 175–185, <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9075-0>.
- [67] F. Ricchelli, L. Franchi, G. Miotto, L. Borsetto, S. Gobbo, P. Nikolov, J.C. Bommer, E. Reddi, Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 306–319, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.06.013>.
- [68] S. Wu, F. Zhou, Y. Wei, W.R. Chen, Q. Chen, D. Xing, Cancer phototherapy via selective photoinactivation of respiratory chain oxidase to trigger a fatal superoxide anion burst, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 733–746, <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5229>.
- [69] S. Ichinose, J. Usuda, T. Hirata, T. Inoue, K. Ohtani, S. Maehara, M. Kubota, K. Imai, Y. Tsunoda, Y. Kuroiwa, K. Yamada, H. Tsutsui, K. Furukawa, T. Okunaka, N. Oleinick, H. Kato, Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na), *Int. J. Oncol.* (2006), <https://doi.org/10.3892/ijo.29.2.349>.
- [70] J.-Y. Matroule, C.M. Carthy, D.J. Granville, O. Jolito, D.W.C. Hunt, J. Piette, Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyrophosphoride-a methylester photosensitization, *Oncogene* 20 (2001) 4070–4084, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204546>.
- [71] N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko, The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002) 1–21, <https://doi.org/10.1039/b108586g>.
- [72] E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis, Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1776 (2007) 86–107, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>.
- [73] M. Merchat, J.D. Spikes, G. Bertolini, G. Jori, Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 35 (1996) 149–157, [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07321-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07321-6).
- [74] E. Alves, A.C. Esteves, A. Correia, Â. Cunha, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, A. Almeida, Protein profiles of *Escherichia coli* and *Staphylococcus warneri* are altered by photosensitization with cationic porphyrins, *Photochem. Photobiol. Sci.* 14 (2015) 1169–1178, <https://doi.org/10.1039/C4PP00194J>.
- [75] T. Maisch, A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment, *Mini-Reviews Med. Chem.* 9 (2009) 974–983, <https://doi.org/10.2174/138955709788681582>.
- [76] J.M. Dąbrowski, B. Pucelik, M.M. Pereira, L.G. Arnaut, G. Stochel, Towards tuning PDT relevant photosensitizer properties: comparative study for the free and Zn 2 + coordinated meso -tetrakis[2,6-difluoro-5-(N -methylsulfamoyl)phenyl] porphyrin, *J. Coord. Chem.* 68 (2015) 3116–3134, <https://doi.org/10.1080/00958972.2015.1073723>.
- [77] K. Kalyanasundaram, Photochemistry of water-soluble porphyrins: comparative study of isomeric tetrapyrrolyl- and tetrakis(N-methylpyridiniumyl)porphyrins, *Inorg. Chem.* 23 (1984) 2453–2459, <https://doi.org/10.1021/ic00184a019>.
- [78] T.A. Skwor, S. Klemm, H. Zhang, B. Schardt, S. Blaszczyk, M.A. Bork, Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: a metalloporphyrin comparison, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 165 (2016) 51–57, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.016>.
- [79] A.M. Odeh, J.D. Craik, R. Ezzeddine, A. Tovmasyan, I. Batinic-Haberle, L. T. Benov, Targeting mitochondria by Zn(II)-N-alkylpyridylporphyrins: the impact of compound sub-mitochondrial partition on cell respiration and overall photodynamic efficacy, *PLoS One* 9 (2014), e108238, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108238>.
- [80] I. Spasojevic, I. Kos, L.T. Benov, Z. Rajic, D. Fels, C. Dedeugd, X. Ye, Z. Vujaskovic, J.S. Reboucas, K.W. Leong, M.W. Dewhirst, I. Batinic-Haberle, Bioavailability of metalloporphyrin-based SOD mimics is greatly influenced by a single charge residing on a Mn site, *Free Radic. Res.* 45 (2011) 188–200, <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.522575>.
- [81] T.H.S. Souza, C.G. Andrade, F.V. Cabral, J.F. Sarmiento-Neto, J.S. Reboucas, B. S. Santos, M.S. Ribeiro, R.C.B.Q. Figueiredo, A. Fontes, Efficient photodynamic inactivation of *Leishmania* parasites mediated by lipophilic water-soluble Zn(II) porphyrin ZnTnHex-2-PyP4+, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1865 (2021), 129897, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129897>.

- [82] L.G. Arnaut, Design of Porphyrin-based Photosensitizers for Photodynamic Therapy, in: 2011, pp. 187–233, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385904-4.00006-8>.
- [83] T. Zoltan, F. Vargas, V. López, V. Chávez, C. Rivas, Á.H. Ramírez, Influence of charge and metal coordination of meso-substituted porphyrins on bacterial photoinactivation, *Spectrosc. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 135 (2015) 747–756, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.053>.
- [84] C. Pavani, Y. Iamamoto, M.S. Baptista, Mechanism and efficiency of cell death of type II photosensitizers: effect of zinc chelation, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 774–781, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01102.x>.
- [85] B.C. De Simone, G. Mazzone, N. Russo, E. Sicilia, M. Toscano, Metal atom effect on the photophysical properties of Mg(II), Zn(II), Cd(II), and Pd(II) tetraphenylporphyrin complexes proposed as possible drugs in photodynamic therapy, *Molecules* 22 (2017) 1093, <https://doi.org/10.3390/molecules22071093>.
- [86] K. Kalyanasundaram, M. Neumann-Spallart, Photophysical and redox properties of water-soluble porphyrins in aqueous media, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 5163–5169, <https://doi.org/10.1021/j100223a022>.
- [87] A. Sebastian, S.N. Remello, F. Kuttassery, S. Mathew, Y. Ohsaki, H. Tachibana, H. Inoue, Protolytic behavior of water-soluble zinc(II) porphyrin and the electrocatalytic two-electron water oxidation to form hydrogen peroxide, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 400 (2020), 112619, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112619>.
- [88] M. Neumann-Spallart, K. Kalyanasundaram, On the one and two-electron oxidations of water-soluble zinc porphyrins in aqueous media, *Zeitschrift Für Naturforsch. B.* 36 (1981) 596–600, <https://doi.org/10.1515/znbn-1981-0512>.
- [89] W.M. Sharman, C.M. Allen, J.E. van Lier, Role of Activated Oxygen Species in Photodynamic Therapy, 2000, pp. 376–400, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)19037-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)19037-8).
- [90] A. Hanakova, K. Bogdanova, K. Tomankova, K. Pizova, J. Malohlava, S. Binder, R. Bajgar, K. Langova, M. Kolar, J. Mosinger, H. Kolarova, The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin, *Microbiol. Res.* 169 (2014) 163–170, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.005>.
- [91] A.V. Teles, T.M.A. Oliveira, F.C. Bezerra, L. Alonso, A. Alonso, I.E. Borissevitch, P. J. Gonçalves, G.R.L. Souza, Photodynamic inactivation of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) by porphyrins, *J. Gen. Virol.* (2018), <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001121>.
- [92] E. Giannoudis, E. Benazzi, J. Karlsson, G. Copley, S. Panagiotakis, G. Landrou, P. Angaridis, V. Nikolaou, C. Matthaiki, G. Charalambidis, E.A. Gibson, A. G. Coutsolelos, Photosensitizers for H₂ evolution based on charged or neutral Zn and Sn porphyrins, *Inorg. Chem.* 59 (2020) 1611–1621, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01838>.
- [93] F. Espitia-Almeida, C. Díaz-Urbe, W. Vallejo, O. Peña, D. Gómez-Camargo, A.R. R. Bohórquez, X. Zarate, E. Schott, Photodynamic effect of 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin and (Zn₂ and Sn₄) derivatives against *Leishmania* spp in the promastigote stage: experimental and DFT study, *Chem. Pap.* (2021), <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01702-y>.
- [94] M.M. Awad, A. Tovmasyan, J.D. Craik, I. Batinic-Haberle, L.T. Benov, Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 7679–7688, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7632-3>.
- [95] S. Moghnie, A. Tovmasyan, J. Craik, I. Batinic-Haberle, L. Benov, Cationic amphiphilic Zn-porphyrin with high antifungal photodynamic potency, *Photochem. Photobiol. Sci.* (2017), <https://doi.org/10.1039/c7pp00143f>.
- [96] O. Viana, M. Ribeiro, A. Rodas, J. Rebouças, A. Fontes, B. Santos, Comparative study on the efficiency of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* using CdTe quantum dots, Zn(II) porphyrin and their conjugates as photosensitizers, *Molecules* 20 (2015) 8893–8912, <https://doi.org/10.3390/molecules20058893>.
- [97] C.G. Andrade, R.C.B.Q. Figueiredo, K.R.C. Ribeiro, L.I.O. Souza, J.F. Sarmento-Neto, J.S. Rebouças, B.S. Santos, M.S. Ribeiro, L.B. Carvalho, A. Fontes, Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 17 (2018) 482–490, <https://doi.org/10.1039/C7PP00458C>.
- [98] K. Alenezi, A. Tovmasyan, I. Batinic-Haberle, L.T. Benov, Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 17 (2017) 154–159, <https://doi.org/10.1016/j.jpdpdt.2016.11.009>.
- [99] R. Al-Mutairi, A. Tovmasyan, I. Batinic-Haberle, L. Benov, Sublethal photodynamic treatment does not lead to development of resistance, *Front. Microbiol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01699>.
- [100] L. George, A. Hiltunen, V. Santala, A. Efimov, Photo-antimicrobial efficacy of zinc complexes of porphyrin and phthalocyanine activated by inexpensive consumer LED lamp, *J. Inorg. Biochem.* 183 (2018) 94–100, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.015>.
- [101] K.B. Guterres, G.G. Rossi, M.M. de Campos, K.S. Moreira, T.A.L. Burgo, B. A. Iglesias, Metal center ion effects on photoinactivating rapidly growing mycobacteria using water-soluble tetra-cationic porphyrins, *BioMetals* 33 (2020) 269–282, <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00251-3>.
- [102] L. Benov, I. Batinic-Haberle, I. Spasojević, I. Fridovich, Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers, *Arch. Biochem. Biophys.* 402 (2002) 159–165, [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00062-0).
- [103] A. Galstyan, Y.K. Maurya, H. Zhylitskaya, Y.J. Bae, Y. Wu, M.R. Wasielewski, T. Lis, U. Dobrindt, M. Stępień, Π -extended donor–Acceptor porphyrins and metalloporphyrins for antimicrobial photodynamic inactivation, *Chem. Eur. J.* 26 (2020) 8262–8266, <https://doi.org/10.1002/chem.201905372>.
- [104] P.J. Gonçalves, F.C. Bezerra, A.V. Teles, L.B. Menezes, K.M. Alves, L. Alonso, A. Alonso, M.A. Andrade, I.E. Borissevitch, G.R.L. Souza, B.A. Iglesias, Photoinactivation of *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) by tetra-cationic porphyrins containing peripheral [Ru(bpy)₂Cl]⁺ units, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 391 (2020), 112375, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112375>.
- [105] F. Fayyaz, M. Rassa, R. Rahimi, Antibacterial photoactivity and thermal stability of tetra-cationic porphyrins immobilized on cellulosic fabrics, *Photochem. Photobiol.* 97 (2021) 385–397, <https://doi.org/10.1111/php.13353>.
- [106] D.R. Alvarado, D.S. Argyropoulos, F. Scholle, B.S.T. Peddinti, R.A. Ghiladi, A facile strategy for photoactive nanocellulose-based antimicrobial materials, *Green Chem.* (2019), <https://doi.org/10.1039/c9gc00551j>.
- [107] J. Feitelson, N. Barboy, Triplet-state reactions of zinc protoporphyrins, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 271–274, <https://doi.org/10.1021/j100274a013>.
- [108] J.M. Fernandez, M.D. Bilgin, L.I. Grossweiner, Singlet oxygen generation by photodynamic agents, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 37 (1997) 131–140, [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07349-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07349-6).
- [109] J.J. Leonard, T. Yonetani, J.B. Callis, Fluorescence study of hybrid hemoglobins containing free base and zinc protoporphyrin IX, *Biochemistry* 13 (1974) 1460–1464, <https://doi.org/10.1021/bi00704a022>.
- [110] C. Cruz-Oliveira, A.F. Almeida, J.M. Freire, M.B. Caruso, M.A. Morando, V.N. S. Ferreira, I. Assunção-Miranda, A.M.O. Gomes, M.A.R.B. Castanho, A.T. Da Poian, Mechanisms of vesicular stomatitis virus inactivation by protoporphyrin IX, zinc- protoporphyrin IX, and mesoporphyrin IX, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2017), <https://doi.org/10.1128/AAC.00053-17>.
- [111] S.M. Shabangu, B. Babu, R.C. Soy, M. Managa, K.E. Sekhosana, T. Nyokong, Photodynamic antimicrobial chemotherapy of asymmetric porphyrin-silver conjugates towards photoinactivation of *Staphylococcus aureus*, *J. Coord. Chem.* 73 (2020) 593–608, <https://doi.org/10.1080/00958972.2020.1739273>.
- [112] S.M. Shabangu, B. Babu, R.C. Soy, J. Oyim, E. Amuhaya, T. Nyokong, Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-silver nanoparticle mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy, *J. Lumin.* 222 (2020), 117158, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117158>.
- [113] D.A. Heredia, S.R. Martínez, A.M. Durantini, M.E. Pérez, M.I. Mangione, J. E. Durantini, M.A. Gervaldio, L.A. Otero, E.N. Duranti, Antimicrobial photodynamic polymeric films bearing biscarbazole triphenylamine end-capped dendrimeric Zn(II) porphyrin, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 27574–27587, <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09119>.
- [114] A.S. Stasheuski, V.A. Galievsky, V.N. Knyukshto, R.K. Ghazaryan, A. G. Gyulkhandanyan, G.V. Gyulkhandanyan, B.M. Dzhagarov, Water-soluble pyridyl porphyrins with amphiphilic N-Substituents: fluorescent properties and photosensitized formation of singlet oxygen, *J. Appl. Spectrosc.* 80 (2014) 813–823, <https://doi.org/10.1007/s10812-014-9849-1>.
- [115] G.V. Gyulkhandanyan, A.A. Sargsyan, M.H. Paronyan, M.A. Sheyryanyan, Absorption and fluorescence spectra parameters of cationic porphyrins for photodynamic therapy of tumors, *Biol. J. Armen.* 72 (2020) 72–75.
- [116] M.V. Korchenova, E.S. Tuchina, V.Y. Shvayko, A.G. Gulkhandanyan, A. A. Zakoyan, R.K. Kazaryan, G.V. Gulkhandanyan, B.M. Dzhagarov, V.V. Tuchin, Photodynamic effect of radiation with the wavelength 405 nm on the cells of microorganisms sensitised by metalloporphyrin compounds, *Quantum Electron.* 46 (2016) 521–527, <https://doi.org/10.1070/QEL16110>.
- [117] A.G. Gyulkhandanyan, R.K. Ghazaryan, V.N. Knyukshto, A.S. Stasheuski, B. M. Dzhagarov, G.V. Gyulkhandanyan, Action of fatty acids on the binding capacity of porphyrins to blood proteins: spectral investigations, *Biol. J. Armen.* 64 (2012) 80–84.
- [118] V.L. Simpkin, M.J. Renwick, R. Kelly, E. Mossialos, Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: progress, challenges and next steps, *J. Antibiot. (Tokyo)* 70 (2017) 1087–1096, <https://doi.org/10.1038/ja.2017.124>.
- [119] M. Nadimpalli, E. Delarocque-Astagneau, D.C. Love, L.B. Price, B.T. Huynh, J. M. Collard, K.S. Lay, L. Borand, A. Ndir, T.R. Walsh, D. Guillemot, A. De Lauzanne, A. Kerleguer, A. Tarantola, P. Piola, T. Chon, S. Lach, V. Ngo, S. Touch, Z.Z. Andrianirina, M. Vray, V. Richard, A. Seck, R. Bercion, A.G. Sow, J.B. Diouf, P.S. Dieye, B. Sy, B. Ndao, M. Seguy, L. Watier, A.Y. Abdou, Combating global antibiotic resistance: emerging one health concerns in lower- and middle-income countries, *Clin. Infect. Dis.* 66 (2018) 963–969, <https://doi.org/10.1093/cid/cix879>.
- [120] A. Engel, Fostering antibiotic development through impact funding, *ACS Infect. Dis.* 6 (2020) 1311–1312, <https://doi.org/10.1021/acscinfed.0c00069>.
- [121] M.R. Hamblin, T. Hasan, Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 436–450, <https://doi.org/10.1039/b311900a>.
- [122] A.D. Radkov, Y.P. Hsu, G. Booher, M.S. Vannieuwenhze, Imaging bacterial cell wall biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 87 (2018) 991–1014, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012921>.
- [123] R. Rahimi, F. Fayyaz, M. Rassa, M. Rabbani, Microwave-assisted synthesis of 5,10,15,20-tetrakis(4-nitrophenyl)porphyrin and zinc derivative and study of their bacterial photoinactivation, *Iran. Chem. Commun.* 11 (2016) 175–185.
- [124] A. Tovmasyan, T. Weitner, H. Sheng, M. Lu, Z. Rajic, D.S. Warner, I. Spasojević, J. S. Rebouças, L. Benov, I. Batinic-Haberle, Differential coordination demands in Fe versus Mn water-soluble cationic metalloporphyrins translate into remarkably different aqueous redox chemistry and biology, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 5677–5691, <https://doi.org/10.1021/ic3012519>.
- [125] I. Batinic-Haberle, I. Spasojević, P. Hambright, L. Benov, A.L. Crumbliss, I. Fridovich, Relationship among redox potentials, proton dissociation constants

- of pyrrolic nitrogens, and in vivo and in vitro superoxide dismutating activities of manganese(III) and Iron(III) Water-Soluble porphyrins, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 4011–4022, <https://doi.org/10.1021/ic990118k>.
- [126] L. Malina, K.B. Tomankova, J. Malohlava, J. Jiravova, B. Manisova, J. Zapletalova, H. Kolarova, The in vitro cytotoxicity of metal-complexes of porphyrin sensitizer intended for photodynamic therapy, *Toxicol. In Vitro* 34 (2016) 246–256, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.04.010>.
- [127] E. Guney, V.T. Yilmaz, F. Ari, O. Buyukgungor, E. Ulukaya, Synthesis, characterization, structures and cytotoxic activity of palladium(II) and platinum (II) complexes containing bis(2-pyridylmethyl)amine and saccharinate, *Polyhedron* 30 (2011) 114–122, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2010.09.037>.
- [128] A. Almeida, A. Cunha, M.A.F. Faustino, A.C. Tomé, M.G.P.M.S. Neves, Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents, in: M.R. Hamblin, G. Jori (Eds.), *Photodynam.*, 2011, pp. 83–160.
- [129] C. Spagnul, L.C. Turner, R.W. Boyle, Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 150 (2015) 11–30, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.021>.
- [130] M.H. Staegemann, S. Gräfe, B. Gitter, K. Achazi, E. Quaas, R. Haag, A. Wiehe, Hyperbranched polyglycerol loaded with (Zinc-)Porphyrins: photosensitizer release under reductive and acidic conditions for improved photodynamic therapy, *Biomacromolecules* 19 (2018) 222–238, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01485>.
- [131] M.H. Staegemann, B. Gitter, J. Dervede, C. Kuehne, R. Haag, A. Wiehe, Mannose-functionalized hyperbranched polyglycerol loaded with zinc porphyrin: investigation of the multivalency effect in antibacterial photodynamic therapy, *Chem. Eur. J.* 23 (2017) 3918–3930, <https://doi.org/10.1002/chem.201605236>.
- [132] R. Rahimi, F. Fayyaz, M. Rassa, The study of cellulosic fabrics impregnated with porphyrin compounds for use as photo-bactericidal polymers, *Mater. Sci. Eng. C* 59 (2016) 661–668, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.067>.
- [133] L.E. Cowen, The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype, *Nat. Rev. Microbiol.* (2008), <https://doi.org/10.1038/nrmicro1835>.
- [134] N.M. Revie, K.R. Iyer, N. Robbins, L.E. Cowen, Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact, *Curr. Opin. Microbiol.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.005>.
- [135] M.A. Al-Fattani, L.J. Douglas, Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance, *J. Med. Microbiol.* (2006), <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0>.
- [136] J.P. Lyon, L.M. Moreira, P.C.G. de Moraes, F.V. dos Santos, M.A. de Resende, Photodynamic therapy for pathogenic fungi, *Mycoses* (2011), <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01966.x>.
- [137] J.P. Lyon, L.M. Moreira, P.C.G. de Moraes, F.V. dos Santos, M.A. de Resende, Photodynamic therapy for pathogenic fungi, *Mycoses* 54 (2011) e265–e271, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01966.x>.
- [138] R.F. Donnelly, P.A. McCarron, M.M. Tunney, Antifungal photodynamic therapy, *Microbiol. Res.* 163 (2008) 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.08.001>.
- [139] J.M. Song, B.L. Seong, Viral membranes: an emerging antiviral target for enveloped viruses? *Expert Rev. Anti. Ther.* (2010) <https://doi.org/10.1586/eri.10.51>.
- [140] F. Vigant, M. Jung, B. Lee, Positive reinforcement for viruses, *Chem. Biol.* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.10.002>.
- [141] I. Stojilkovic, B.D. Evavold, V. Kumar, Antimicrobial properties of porphyrins, *Expert Opin. Investig. Drugs* (2001), <https://doi.org/10.1517/13543784.10.2.309>.
- [142] B. Magi, A. Ettore, S. Liberatori, L. Bini, M. Andreassi, S. Frosali, P. Neri, V. Pallini, A. Di Stefano, Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation, *Cell Death Differ.* (2004), <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401427>.
- [143] D.V. Sakharov, E.D.R. Elstak, B. Chernyak, K.W.A. Wirtz, Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591, *FEBS Lett.* (2005), <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.024>.
- [144] L.C. Dias, M.A. Dessoy, R.V.C. Guido, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades, *Quim. Nova* 36 (2013) 1552–1556, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013001000011>.
- [145] I.B. dos Santos, D.A.M. da Silva, F.A.C.R. Paz, D.M. Garcia, A.K. Carmona, D. Teixeira, I.M. Longo-Maugéri, S. Katz, C.L. Barbiéri, Leishmanicidal and immunomodulatory activities of the palladacycle complex DPPE 1.1, a potential candidate for treatment of cutaneous leishmaniasis, *Front. Microbiol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01427>.
- [146] M.B. Johansen, G.B.E. Jemec, S. Fabricius, Effective treatment with photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis: a case report, *Dermatol. Ther.* 32 (2019), <https://doi.org/10.1111/dth.13022>.
- [147] D.P. Aureliano, J.A.L. Lindoso, S.R. de Castro Soares, C.F.H. Takakura, T. M. Pereira, M.S. Ribeiro, Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy,

Photodiagnosis Photodyn. Ther. 23 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.005>.

- [148] F.P. Garcia, J. Henrique da Silva Rodrigues, Z.U. Din, E. Rodrigues-Filho, T. Ueda-Nakamura, R. Auzely-Vely, C.V. Nakamura, A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction, *Apoptosis* 22 (2017) 57–71, <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1308-4>.

- [149] L. Benov, J. Craik, I. Batinic-Haberle, The potential of Zn(II) N-Alkylpyridylporphyrins for anticancer therapy, *Anticancer Agents Med. Chem.* 11 (2011) 233–241, <https://doi.org/10.2174/187152011795255975>.



Tiago H. S. Souza is a Ph.D. student in Biological Sciences at the Universidade Federal de Pernambuco. He received a Bachelor's degree in Biomedicine (2017) and a Master's degree in Biological Sciences (2020) from the same University. He has experience in Nanobiotechnology and Biophotonics applied to health. His Ph.D. research, under the supervision of Dr. A. Fontes, is focused on exploring cationic porphyrins as photosensitizers for antimicrobial photodynamic inactivation *in vitro* and *in vivo* studies.



José Ferreira Sarmiento-Neto is a Chemistry Ph.D. student at the Universidade Federal da Paraíba (Brazil). He received his undergraduate degree in Pharmacy (2014) and his M.Sc. degree in Chemistry (2016) from the same institution. His Ph.D. research in Medicinal Chemistry is carried out under the supervision of Dr. J. S. Rebouças and is focused on the design and synthesis of cationic Mn(III) porphyrins as potential redox-active therapeutics and cationic Zn(II) porphyrins as photosensitizers for antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI). Part of his Ph.D. work was awarded a Royal Society of Chemistry Poster Prize during the 18th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC) organized by the Society of Biological Inorganic Chemistry (SBIC).



Sueden O. de Souza received her Bachelor's degree in Biomedicine (2018) from the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. She is currently a research fellow of the Wellcome Trust International Master's Fellowship developing a research project under the supervision of Dr. A. Fontes to explore antimicrobial photodynamic therapy to treat topical candidiasis. She also has experience in Nanobiotechnology, including the use of liposomes to deliver nanoparticles.



Bruno L. Raposo received a Bachelor's degree in Biomedicine (2021) and is currently pursuing a Master's degree in Biological Sciences at the Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) under the supervision of Dr. A. Fontes and Dr. P. E. Cabral Filho. His research interests focus on Nanobiotechnology, especially applying quantum dots to biological studies. He is also interested in exploring nanoparticles to antimicrobial photodynamic inactivation.



Bruna P. Silva is a pharmacist and a Ph.D. student of Pharmaceutical Sciences at the Universidade Federal de Pernambuco under the supervision of Dr. B. S. Santos. She has experience in the areas of physicochemical quality control of polymers, microparticulate pharmaceutical systems, photodynamic therapy, and clinical pharmacy. She holds a Bachelor's degree in General Pharmacy (2014) and a Master's degree in Pharmaceutical Sciences (2017), both from the Universidade Estadual da Paraíba.



Paulo E. Cabral Filho is a Professor at the Biophysics and Radiobiology Department of the Universidade Federal de Pernambuco since 2017, Fellow of the Brazilian National Research Council (CNPq), and a member of the Brazilian National Institute of Photonics (INFO). He received his Bachelor's degree in Biomedicine (2011), Master's (2013) and Ph.D. (2016) degrees in Biological Sciences from the same University. He has experience in Biophotonics and Nanobiotechnology. His research focuses on the synthesis, bioconjugation, and application of quantum dots and multimodal nanoparticles in biomedical studies. Currently, Dr. Cabral Filho is also working with photodynamic inactivation of microorganisms.



Christiane P. F. Borges is a Professor at the Chemistry Department of the Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brazil, since 1995. Her research interests are centered on the synthesis and application of ceramic materials, biomaterials, and photosensitizers. Dr. Borges received her Bachelor's degree in Chemistry (1988) and M.Sc. degree in Science (1991) from the Universidade Federal de Pernambuco and her Ph.D. in Chemistry from the Universidade Estadual de São Paulo, in 1994.



Júlio S. Rebouças is an Associate Professor at the Universidade Federal da Paraíba (UFPB, Brazil), Fellow of the Brazilian National Research Council (CNPq), and a member of the Brazilian National Institute of Photonics (INFO). He was introduced to porphyrin bioinorganic chemistry by Profs. Y. M. Idemori and M. E. M. D. de Carvalho during his undergraduate and M.Sc. studies at the Universidade Federal de Minas Gerais (Brazil). He received his Chemistry Ph.D. degree from the University of British Columbia (Canada) under the supervision of Prof. B. R. James, exploring Ru(II) porphyrins for small-molecule recognition as heme-thiol(ate) biomimetic models and oxidation catalysts. He joined the Batinic-Haberle and

Spasojevic Laboratories at Duke University School of Medicine (USA) in 2006, where he completed his postdoctoral training in metalloporphyrin-based redox-active therapeutics, before moving to UFPB in 2009 to establish a research group on porphyrin-based biomimetic materials, photosensitizers, and redox-active therapeutics. His group has been recently featured in the New Talents: Americas 2020 special issue of RSC Dalton Transactions. He is a founding member of the Society of Porphyrins and Phthalocyanines and currently serves as the deputy director of the Inorganic Chemistry Division of the Brazilian Chemical Society.



Beate S. Santos is an Associate Professor at the Pharmaceutical Sciences Department of the Universidade Federal de Pernambuco since 2002, Fellow of the Brazilian National Research Council (CNPq), and a member of the Brazilian National Institute of Photonics (INFO). Her research breakthroughs focus on quantum dots and metallic nanoparticles, diagnosis based on fluorescence, the application of nanomaterials to photodynamic therapy, and the study of semisolid formulations for therapeutic applications. Dr. Santos received her Bachelor's degree in Chemistry (1988), M.Sc. (1996) and Ph.D. (2002) degrees in Chemistry all from the Universidade Federal de Pernambuco.



Adriana Fontes is an Associate Professor at the Biophysics and Radiobiology Department of the Universidade Federal de Pernambuco since 2006, Fellow of the Brazilian National Research Council (CNPq), and a member of the Brazilian National Institute of Photonics (INFO). Her research interests are in the area of Biophotonics and Nanobiotechnology, including the synthesis and biological application of quantum dots and multimodal nanoparticles, optical linear and non-linear spectroscopy and microscopy, the use of optical tweezers in biomedical sciences, and photodynamic therapy. She was awarded the L'Oréal-Brazil for Women in Science Grant in 2008 (Physics). Dr. Fontes received her Bachelor's degree in

Physics, in 1996, from the Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) and her Ph.D. in Science from the same University, in 2004.

APÊNDICE 2: artigo publicado no periódico Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. Fator de impacto: 3.3. Março/2024.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 46 (2024) 104066



Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

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





Methylene blue@silver nanoprisms conjugates as a strategy against *Candida albicans* isolated from balanoposthitis using photodynamic inactivation

Cláudio H. Rodrigues ^{a,c}, Bruna Pereira Silva ^{a,c}, Marques L.R. Silva ^{a,c}, Dimitri C. Gouveia ^{a,c},
Adriana Fontes ^b, Danielle P.C. Macêdo ^a, Beate S. Santos ^{a,c,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil
^b Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil
^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Plasmonic effect
Dimerization
Yeast infection
Silver nanoparticles
Photodynamic Therapy

ABSTRACT

Balanoposthitis can affect men in immunocompromised situations, such as HIV infection and diabetes. The main associated microorganism is *Candida albicans*, which can cause local lesions, such as the development of skin cracks associated with itching. As an alternative to conventional treatment, there is a growing interest in the photodynamic inactivation (PDI). It has been shown that the association of photosensitizers with metallic nanoparticles may improve the effectiveness of PDI via plasmonic effect. We have recently shown that the association of methylene blue (MB), a very known photosensitizer, with silver prismatic nanoplatelets (AgNPs) improved PDI of a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. To further investigate the experimental conditions involved in PDI improvement, in the present study, we studied the effect of MB concentration associated with AgNPs exploring spectral analysis, zeta potential measurements, and biological assays, testing the conjugated system against *C. albicans* isolated from a resistant strain of balanoposthitis. The AgNPs were synthesized through silver anisotropic seed growth induced by the anionic stabilizing agent poly(sodium 4-styrenesulfonate) and showed a plasmon band fully overlapping the MB absorption band. MB and AgNPs were conjugated through electrostatic association and three different MB concentrations were tested in the nanosystems. Inactivation using red LED light (660 nm) showed a dose dependency in respect to the MB concentration in the conjugates. Using the highest MB concentration (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) with AgNP, it was possible to completely inactivate the microorganisms upon a 2 min irradiation exposure. Analyzing optical changes in the conjugates we suggest that these results indicate that AgNPs are enhancers of MB photodynamic action probably by a combined mechanism of plasmonic effect and reduction of MB dimerization. Therefore, MBAgNPs can be considered a suitable choice to be applied in PDI of resistant microorganisms.

1. Introduction

Balanoposthitis is defined as an inflammation of the glans penis in uncircumcised men. It can occur due to different factors, such as poor hygiene, infections, skin disorders, and due to decreased immunity caused by other diseases, such as diabetes mellitus [1]. Balanoposthitis can manifest itself in different ways. Among them, we observe the inflammatory pathway, which is characterized by the presence of lichens, and the neoplastic process, which is related to malignant lesions, such as in Bowen's disease and in allergies, such as to latex and chlorine when associated with lack of hygiene [2]. Another form is related to infectious processes caused by microorganisms, and corresponds to the large

number of cases observed where the disease is recurrent [2]. The main microorganism associated with this condition is *Candida albicans*, a commensal species, responsible for about 30 to 35 % of infections [1,3]. Some other fungi, such as *Aspergillus* spp. and dermatophytes are also frequently isolated, as well as some bacteria, such as *Staphylococcus* spp. and Group B and D *Streptococcus* [3]. Although some patients may be asymptomatic, some itching may be found, as well as changes in the glans, involving fissures [3,4].

Between alternative methods currently studied for fungus annihilation, photodynamic inactivation (PDI) is a non-invasive technique that combines a light source with a wavelength in resonance with the absorption profile of a photosensitizer molecule (PS) and molecular

* Corresponding author at: Biomedical Nanotechnology research group.
E-mail address: beate.santos@ufpe.br (B.S. Santos).

<https://doi.org/10.1016/j.pdpt.2024.104066>

Received 20 January 2024; Received in revised form 6 March 2024; Accepted 22 March 2024

Available online 27 March 2024

1572-1000/© 2024 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

oxygen [5]. Through photochemical reactions, the so-called reactive oxygen species (ROS) are generated, which have cytotoxic action, and kill the target at the site of action [6]. PDI is a technique that has already shown good results against bacteria, fungi, parasites, and cancer cells. Several molecules can be used as PS, among them methylene blue (MB), a heterocyclic molecule of the class of phenothiazine compounds is well known. This PS is widely used due to its low cost, low cytotoxicity and good efficiency in generating ROS. There are already a great number of reports of its use in the field of dentistry, in the annihilation of bacteria and fungi, combined or not with nanomaterials to improve its photodynamic efficiency. In the fungal field, PDI has been evaluated against several species, such as *Candida* spp., applying several PS and various light dose parameters and reports of prevention of aggregation in biofilms [7–10]. The association of PS to metallic nanoparticles has shown the possibility of enhancement of ROS production and the most applied systems are gold nanoparticles (AuNPs) and silver nanoparticles (AgNPs) [11]. One of the mechanisms proposed to enhance PS efficacy is related to the localized surface plasmon resonance (LSPR), which corresponds to collective oscillation of electrons present at the surface of the metallic NPs [12]. This phenomenon is dependent on the NP size and shape and for some conditions, such as spectral overlap and species-NP distance, the PS can be benefited by the enhanced local field near the metallic NP boosting its action [13–19].

In a previous study [20], some of us reported the application of MB species associated to nanoprismatic AgNPs (AgNPrs) in the PDI of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis, a multiresistant strain to 19 antibiotics associations. Conjugates involving MB at final concentration of $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ and AgNPrs were produced, characterized and were able to reduce PDI time in 33 % compared to MB solution at the same concentration. The optical overlap of the MB absorption spectrum and the optical extinction of the AgNPrs was suggested to promote plasmonic enhancement in the ROS process production. In the present study, considering the previous hypothesis, we evaluated the potential of AgNPrs conjugated with MB to photo-inactivate a resistant strain of *C. albicans* yeast cells isolated from balanoposthitis. In addition, aiming to gain insights on the ROS enhancement and deepen the understanding on the nature of the observed effect we tested different experimental parameters such as MB:AgNPrs ratio and light dose on the PDI experiments.

1. Materials and methods

1.1. Materials

Silver nitrate (AgNO_3 , >99 %), trisodium citrate dibasic (TSC, >99 %), L-Ascorbic acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, >99 %), poly (sodium 4-styrenesulfonate) (PSSS 1000 kDa), sodium borohydride (NaBH_4 , >98 %), Sabouraud 4 % dextrose agar, potassium phosphate monobasic (99 %) and potassium phosphate dibasic (99 %) were purchased from Sigma Aldrich. MB (99 %) was purchased from Merck.

1.2. Synthesis of silver nanoprisms using seed-mediated growth method

AgNPrs were synthesized adapting the previously described methodology [21]. Basically, in an Erlenmeyer flask at room temperature (RT $\sim 26^\circ\text{C}$) and under vigorous stirring (~ 750 rpm), 5 mL of TSC (2.5 mmol L^{-1}), 1.25 mL of PSSS (500 mg mL^{-1}), 1.5 mL of NaBH_4 (10 mmol L^{-1}) and 10 mL of AgNO_3 (0.5 mmol L^{-1}) were thoroughly mixed. The system was stirred for 3 min after the addition of the Ag^+ solution, and then, it was set aside. For the growth of the AgNPrs, we added 50 mL of deionized water under the same conditions of the seed production system. To this system, $750 \mu\text{L}$ of $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (10 mmol L^{-1}) and 2 mL of the prepared seed suspension were added dropwise. The volume of 15 mL of AgNO_3 (0.5 mmol L^{-1}) was also inserted dropwise, observing the color change to dark blue. Finally, 5 mL of TSC (25 mmol L^{-1}) was added. Systems were characterized by UV-vis absorption spectroscopy region,

from 350 to 900 nm.

1.3. MBAgNPr association

First, AgNPr systems were purified using filtration tubes with a molecular cut-off of 10 kDa (General Electrics) to remove residual compounds of the synthesis. AgNPrs were redispersed to the same initial volume. Then, the conjugates were produced by electrostatic association of AgNPrs with MB species, through the addition of equal volumes of both systems resulting in conjugates named herein MBAgNPr. MB solution was added to the systems, to a final concentration of $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (MBAgNPr1), $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (MBAgNPr2), and $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (MBAgNPr3). The systems were kept under agitation (~ 750 rpm) for 24 h in the absence of light, at 25°C prior to the experiments.

1.4. Characterization

All systems were characterized using UV-Vis absorption and emission spectroscopies. Acquiring spectral conditions were kept the same for all the samples. For AgNPrs and conjugates, the measurement of the zeta potential (Malvern, UK) was performed by using 5 mL the suspensions in 50 mL of deionized water (pH = 6.9). Infrared absorption spectra applying Fourier Transform (FT/IR) was obtained using a FT/IR-6800 (JASCO®). Samples were used as powders, and the MBAgNPrs (MBAgNPr3) samples were lyophilized prior to use. Transmission electron microscopy (TEM) images were acquired using a FEI Tecnai Spirit Biotwin G2 (120 V) and the samples were prepared by dropping *ca.* $10 \mu\text{L}$ of the purified suspension and letting them dry prior to the image acquisition. Images were analyzed by *ImageJ* software program and over 300 particles per image were screened for morphological and statistical purposes. For the preparation of the MBAgNPr images the systems were kept in the same ratio of AgNPrs and $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (MBAgNPr3).

1.5. Inoculum nutrition and standardization

Inoculum used for the study was provided by the Coleção de Cultura de Microrganismos from Laboratório de Análises Microbiológicas/UFPE. Strain used in this study was isolated from balanoposthitis and showed resistance to fluconazole. For activation, one layer was subcultured on Sabouraud dextrose agar, and incubated for 24 h at 37°C . For the preparation of the suspension, the absorbance was standardized in 0.284 at 540 nm (corresponding to 10^6 CFU mL^{-1}) and confirmed with comparison using 0.5 McFarland standards.

1.6. Photodynamic inactivation

For microorganism inactivation, we applied the methodology proposed by Rodrigues et al., (2021) [16]. A LEDBox at $\lambda = 660 \text{ nm}$ coupled with smart control and dark chamber was used as the light source, applying an irradiance of *ca.* 45.9 mW.cm^{-2} . A pre-irradiation incubation time (PIT) of 30 min was applied. Using a 96-well plate, $100 \mu\text{L}$ of the isolated suspension was added with the subsequent addition of $100 \mu\text{L}$ of the tested conjugate suspension. After the incubation, each plate was exposed to irradiation times of 60, 120, 180 and 240 s (*i.e.* light doses of *ca.* 2.0, 5.0, 8.0 and 11 J.cm^{-2} , respectively). Subsequently, each test was serially diluted from 10^{-1} to 10^{-4} , and $10 \mu\text{L}$ was dropped vertically onto a plate with Sabouraud dextrose agar. The plates were incubated at 37°C for 24 h, and the smallest dilution with observed fungal growth was counted and converted to $\log_{10}$. A control following all the conditions described above, was performed only with the AgNPr, to verify if the same effect was observed for these systems.

2. Results

2.1. Silver nanoprisms characterization

TEM images indicated that AgNPrs had an average size of $d = 37 \pm 8$ nm in close agreement to our previous report [20]. Fig. 1 shows a representative image of the AgNPr applied in the present study. The histogram (Fig. 1b) shows the analysis of a set of 10 TEM images containing no less than 200 NPs each. Although some small seeds and hexagonal shaped particles are still observed among the prismatic platelets, they represent less than 10 % of the whole ensemble. Fig. 1(c) and 1(d) show the images collected for MBAgNPr conjugates, showing the same pattern, and presenting same histogram and diversity of morphologies, showing also several platelets that have positioned side by side during the drying process. We did not observe alteration in the nanoparticle morphologic pattern after conjugation to methylene blue molecules.

Zeta potential measurements of AgNPrs showed, as expected, a negative value ($\zeta = -51.4$ mV) due to the presence of (PSS⁻)_n chains, corroborating with our previous results [16]. The conjugation of the MB cationic species to (PSS⁻)_n coated AgNPrs was monitored by determining the zeta potential change according to the MB concentration increase. Data, shown in Fig. 2, demonstrate that zeta potential values decrease in modulus close to zero from 25 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of MB, corroborating that these cationic species are indeed associating to the sulfate terminations of the (PSS⁻)_n polymer chain.

Based on the description of the surface charge of the systems we suggest that the MB coating of the particles may be represented as the scheme in Fig. 3.

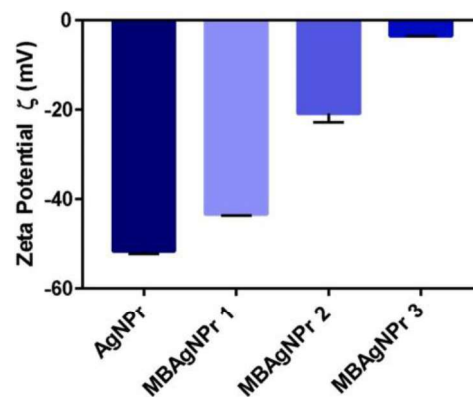


Fig. 2. Zeta potential of AgNPr and MBAgNPr conjugates prepared in this study. Indexes 1, 2 and 3 represent MB concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Data are disposed as mean $\pm$ standard deviation (SD) and correspond to 3 different measurements ($n = 3$).

As the surface charge is approximating the neutrality in the MBAgNPr3 conjugates, we suggest that the sulfate sites of the (PSS⁻)_n are almost completely associated to MB species. No macroscopic alterations of the conjugated systems were observed, and they remained colloiddally and optically stable for at least 3 months without phase separation nor color change.

Infrared spectra of the main constituents of the systems (MB, PSSS and MBAgNPr) and their molecular structures are depicted in Fig. 4.

We observe in the MB infrared spectrum (Fig. 4A) the characteristic

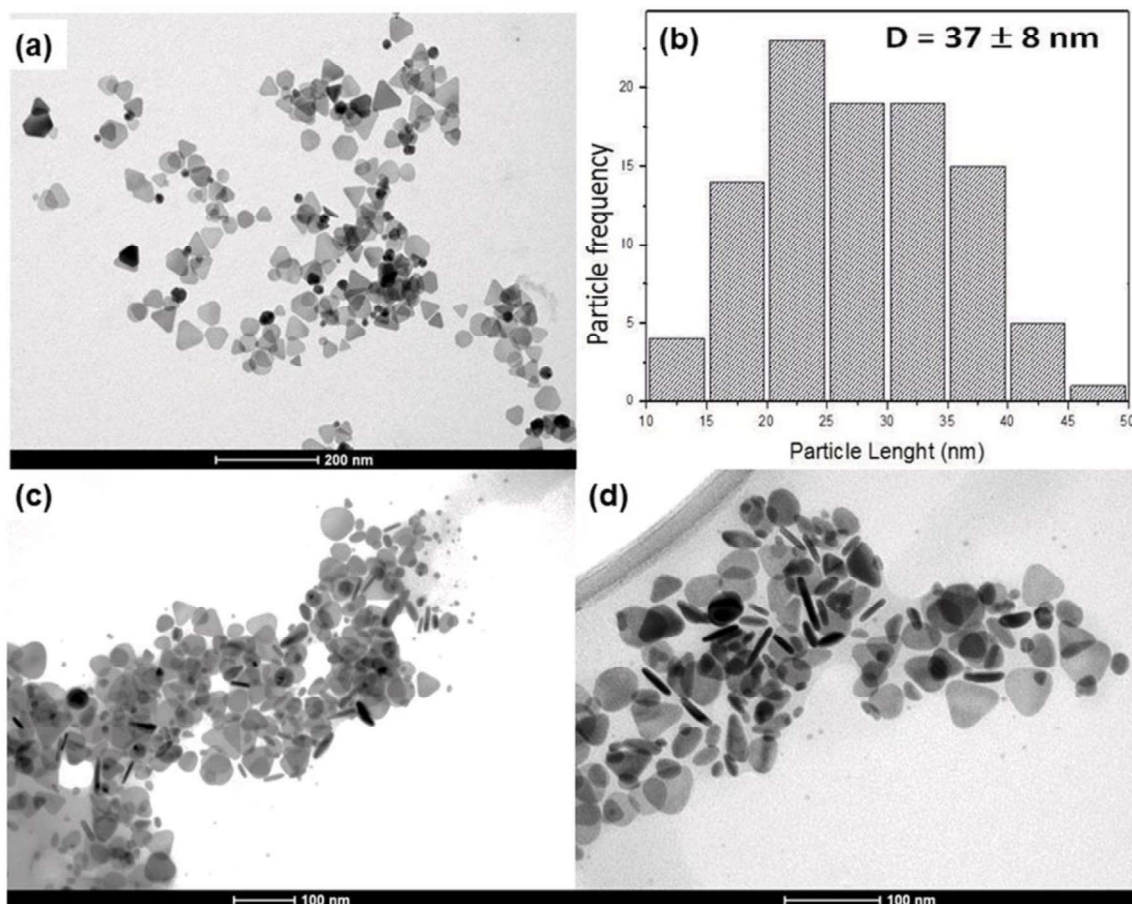


Fig. 1. TEM images for AgNPrs showing nanoprism morphology (a) the corresponding size distribution analysis (b); images (c) and (d) correspond to TEM images of MBAgNPrs conjugates (MBAgNPr3).

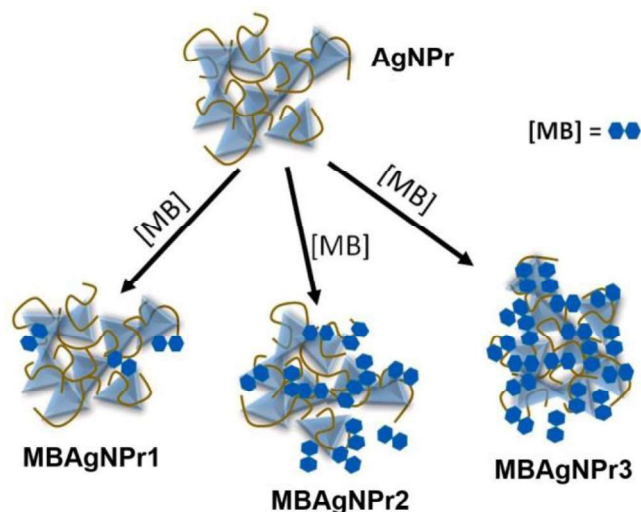


Fig. 3. Schematic representation of MBAgNPr conjugates prepared in the present study. AgNPr represent the prismatic nanoplatelets coated with anionic (PSS[−])_n polymer. Indexes 1, 2 and 3 represent MB concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively.

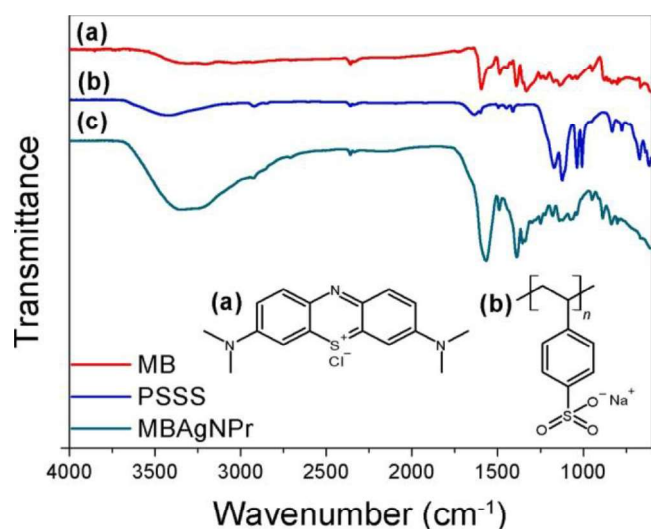


Fig. 4. FTIR spectra of (a) methylene blue (b) PSSS and (c) MBAgNPr conjugates (MBAgNPr₃). The molecular structure of the molecules (a) and (b) are also represented.

vibration frequencies expected for the molecule, that is: (i) ν 1594 cm^{-1} which corresponds to overlap of the C–C and C–N axial deformations; [22–24]. (ii) ν 1546 cm^{-1} which corresponds to the axial deformation of C–C and C–N groups of the heterocyclic ring [22,25]; (iii) ν = 1420 and 1395 cm^{-1} are related to symmetric and asymmetric out of plane deformations of the CH₃ groups [24,26]; (iv) ν = 1491 cm^{-1} corresponds to the a $\text{C}=\text{S}^+$ vibration [22,27]; (v) ν 1357 and 1338 cm^{-1} correspond to the C–N e C–S⁺ axial deformation of the heterocyclic ring [22,23,28]; (vi) ν 1143 e 1066 cm^{-1} correspond to the out of plane vibrations of the C–N e C–S–C groups [22,25,29]. In the infrared absorption spectrum of PSSS polymer we observe the following expected vibrations related to -SO₃ axial deformation vibrations at ν 1171, 1124, 1035 and 1006 cm^{-1} [30,31]. In the MBAgNPr conjugates infrared absorption spectrum we observe bands related to MB (ν = 1491, 1388, 1357, 1338 cm^{-1}). The expected ν = 1594 cm^{-1} vibration may be found at ν = 1571 cm^{-1} probably due to the association to the PSS[−] polymer chains, decreasing the bond strength of the -C–S⁺ functional

group. In the same spectrum we also observe PSS[−] vibrational peaks at ν = 1176, 1122, 1038 e 1008 cm^{-1} [30,31]. All these findings strongly suggest the effective association of MB molecules the AgNPrs.

2.2. Optical characterization of the systems

In the first step of synthesis, we achieved smaller round shaped AgNPs stabilized by (PSS[−])_n polymer chains that present an extinction band with maximum at λ = 408 nm (Fig. 5(a), orange line). Using 2 mL of this seed suspension, we induced the growth of AgNPrs, which achieved a maximum peak at λ = 664 nm (Fig. 5, blue line) and this spectral shift agrees with the formation of silver prismatic nanoplatelets as already reported in the literature [13,20]. In Fig. 5(b), we observe the MB characteristic absorption spectrum (light blue line). We also observe a total spectral overlap of the MB absorption and the AgNPr extinction bands.

Fig. 6(a) shows the absorption spectra of the MB solution at three different concentrations (25, 50, and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). The spectral profile shows two bands. The main absorption at 664 nm represents the characteristic MB spectral profile while the blue shifted band depicts the dimerized MB species. This component increases substantially with increasing MB concentration from 25 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 5a) evidencing a higher number of dimerized molecules. This is a known effect [32] and it is usually related to the decrease in photodynamic action of this PS. UV-Vis spectra of MBAgNPr conjugates with increasing MB concentration are depicted in Fig. 6(b) and we observe a very close resemblance to the spectral profile of MB corresponding solution spectrum. Nevertheless, the small increase in the baseline and wider shape of the band profile, especially for the smaller MB concentration associated with the AgNPr, show the influence of those NPs in MB absorption profile. By analyzing the spectral profiles of Fig. 6 we observed that the lower the MB concentration, the greater the optical interference of the AgNPrs. Although a small amount of AgNPrs was used in the systems, their extinction band was still perceptible in the overlaid plots for MBAgNPr₁ and MBAgNPr₂ systems. In the MBAgNPr₃ system, the MB contribution was dominant in the spectrum (Fig. 6b). Moreover, according to the change in the absorption band profile, we suggest that the dimerization effect is highly reduced. This behavior agrees well with the schematic suggestion of Fig. 3. Interestingly, the absorption band of MB decreases as it attaches onto the surface of the AgNPrs and the greater the MB concentration, a more pronounced decrease is observed. We ascribe this also as a reduction of free MB species in the suspension.

When analyzing the emission spectra profiles depicted in Fig. 6(c) and 6(d) we observe that, while AgNPrs do not show detectable fluorescence, MB solutions show a characteristic red emission, preserved after conjugation with AgNPrs. There are three features that are important mentioning when observing the spectral changes with increasing MB concentration: (i) a linear decrease in the fluorescence intensity for the MB species in solution, (ii) a small red shift of the emission maximum for both MB and MBAgNPrs systems and (iii) an increase of the emission intensity of the MBAgNPr conjugates. This contrasting behavior is depicted in Fig. 7, which shows the variation of the emission intensity for both systems. This observation will be further discussed in Section 4.

2.3. In vitro photodynamic inactivation

The irradiation of red light without any PS or only applying MB or MBAgNPr (up to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) without light irradiation was not able to kill fungal strains at any scenario tested in the present study. As a positive control, chlorhexidine 0.12 % killed the strains in all experiments. For photoinactivation with MB, we observed some effect ($\sim 1 \log_{10}$) only with the higher irradiation time. For the conjugate at the lowest MB concentration, no significant effect was observed, reducing only less than a $\log_{10}$. None of the conjugates promoted cell death in the absence of light, showing that the conjugates alone are not responsible for this

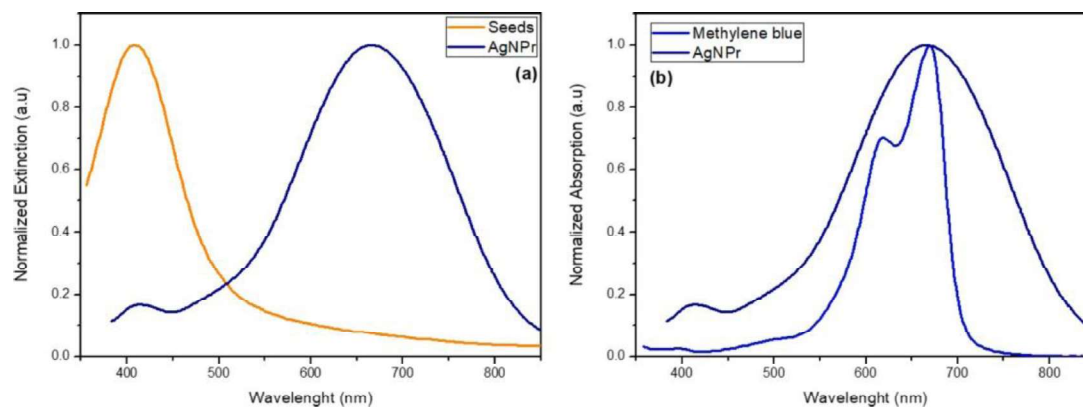


Fig. 5. Extinction spectra of silver nanoparticles seeds with maximum at 408 nm and silver nanoprisms (AgNPr) with maximum at 664 nm (a) and normalized UV-Vis spectra of AgNPr and MB (b).

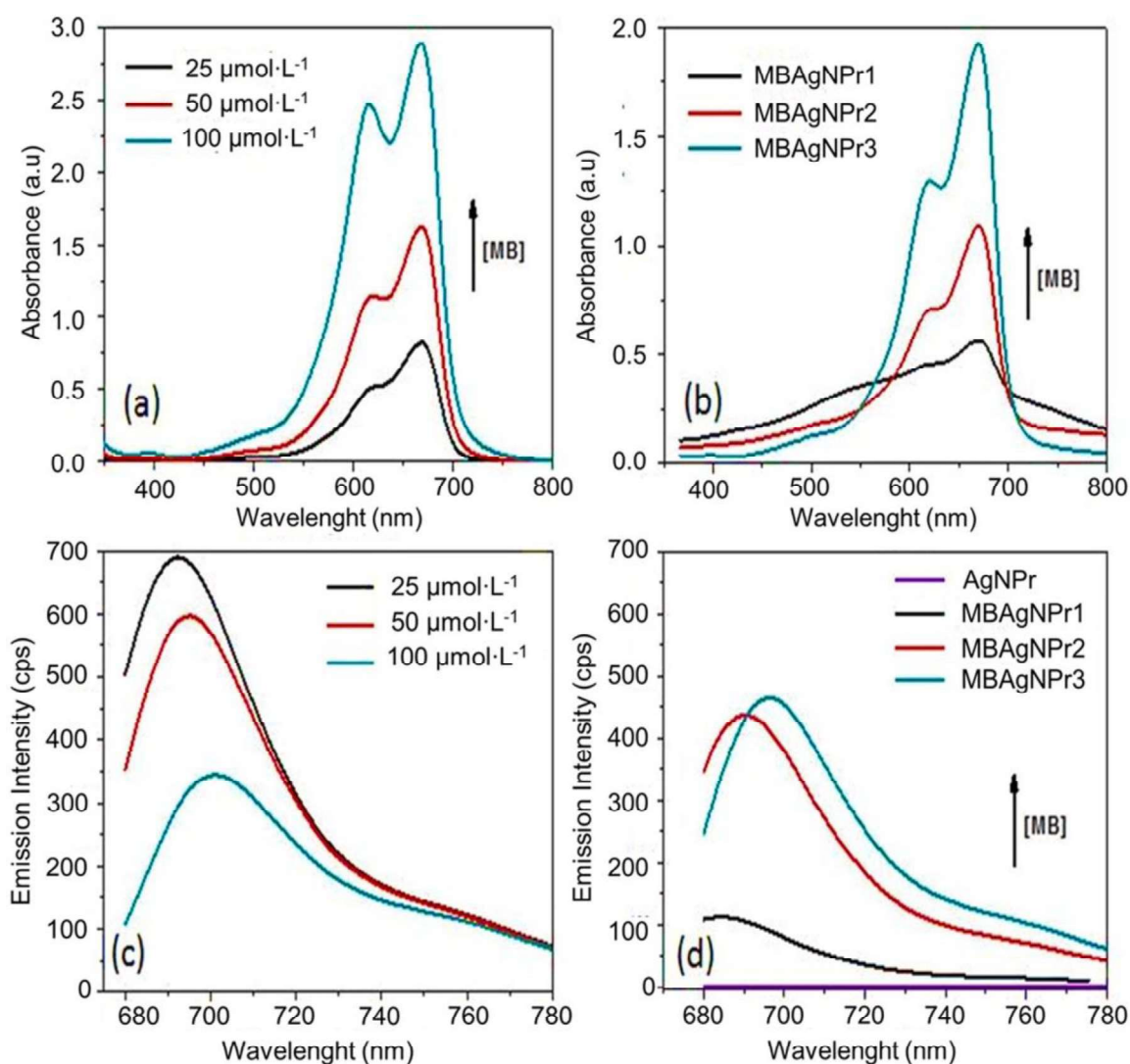


Fig. 6. UV-Vis spectra of (a) methylene blue solutions and (b) MBAgNPr conjugates. Emission profiles of methylene blue solutions (c) and MBAgNPr conjugates ($\lambda_{exc} = 660$ nm). Indexes 1, 2 and 3 represent MB concentrations of 25, 50 and $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

effect to be achieved, as well as AgNPrs alone. On the other hand, increasing the MB concentration in the conjugates, we observe an overall improvement in the photodynamic effect. Total inactivation of the microorganisms was achieved by applying 2 min for MBAgNPr3, 3

min for MBAgNPr2 and 4 min for MBAgNPr1. Fig. 8 presents all the results.

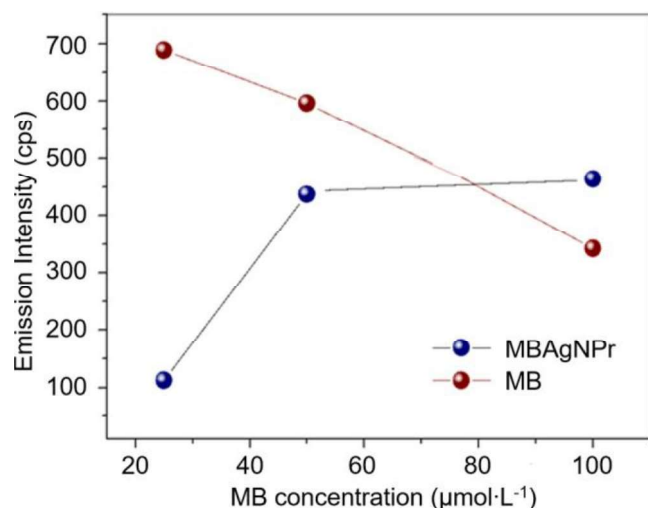


Fig. 7. Emission intensity variation of MB (red) and MBAgNPr (blue) with increasing MB concentration.

3. Discussion

It has been described in the literature the application of metallic NPs to improve the performance of PSSs, with emphasis on studies related to AuNPs [33,16] or spherical AgNPs [17,19]. AgNPrs are easily prepared systems that can be obtained within 20 min of synthesis, and their extinction band can be tuned (by changing size and morphology) to overlap the MB absorption profile, a necessary condition to explore the plasmonic effect in PDI. In a previous study, we were able to improve the PDI mediated by MB applying a single type of AgNPr-MB conjugate ([MB] = 45 μmol L⁻¹), which was able to fully inactivate multiresistant *S. aureus* from bubaline mastitis [20]. Indeed, one of our hypotheses to explain the enhanced MB-PDI performance in this previous work was amplification by plasmonic effect of the silver nanoparticles. Herein, we aimed to further study the contribution of this effect in PDI by changing the MB concentration associated with AgNPr and using spectroscopic analyses, zeta potential measurements, and the impact of the nano-systems in the fungal viability.

The electrostatic conjugation of cationic MB species to AgNPrs platforms was successfully monitored by zeta potential changes at the surface of the negative (PSS⁻)n polyanions coating the nanoparticles. The presence of MB molecules associated to AgNPrs is also observed by the FT/IR spectral analysis of the systems. The results presented in Fig. 2

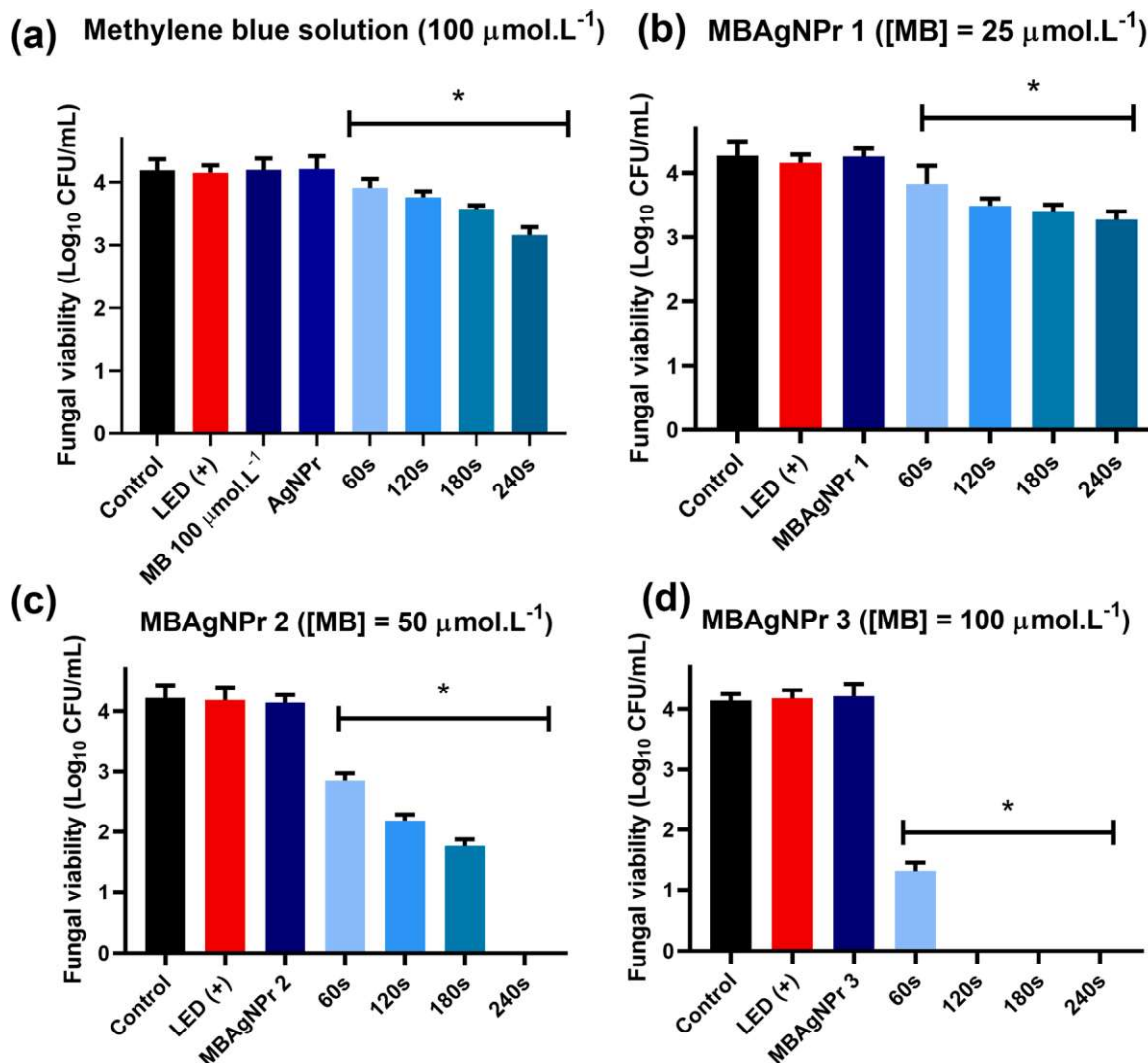


Fig. 8. - Photodynamic inactivation profile of *C. albicans* isolated from balanoposthitis using MB in solution and MBAgNPr conjugates, under irradiation of red light (45.9 mW · cm⁻² of irradiance) and light doses of 60, 120, 180 and 240 s (light dose of 2.0, 5.0, 8.0 and 11 J · cm⁻², respectively). Results are disposed as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments (n = 3) * p < 0.05 vs. control group.

corroborate that the greater the MB concentration, the more positive the resulting zeta potential, indicating that less MB molecules (monomers and dimers) were free in the media. And for the MBAgNPrs conjugates that is exactly the interpretation of the optical spectral profile observed for these systems. MB can suffer dimerization, a phenomenon that occurs due to the presence of methylene groups ($-\text{CH}_2-$) in the molecular structure of the compound, which can associate with other methylene groups in adjacent molecules, promoting intermolecular van der Waals interactions leading to the formation of a dimer [25–33,16,34–36]. Bergmann & O' Kanski (1963) [36] showed that the dimerization of MB is influenced by the concentration of the compound and the medium in which it is present. In aqueous solutions, dimerization is more favored at acidic or neutral pH, while at alkaline pH, the tendency is for the molecules to remain in the monomeric form. Moreover, Florence & Naorem (2014) [37], investigated by spectrophotometry the MB dimerization in water and different mixtures of water with organic solvents and reported that dimerization occurs faster in polar solvents, such as the aqueous medium itself, compared to less polar solvents, as the mixed medium. Our results demonstrate the influence of MB and MBAgNPr conjugates concentration in spectral profile (Fig 6). The MB concentration at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ leads to an increase of the absorption peak at $\lambda = 607 \text{ nm}$ corresponding to a greater rate of dimer formation (Fig. 6a), in contrast, Fig. 6(b) shows a reduction of the dimer band. This suggests that the

presence of $(\text{PSS}^-)_n$ coated silver nanoplatelets compete with the dimerization process enhancing the MB availability. Moreover, we observe that the emission auto suppression process, common to greater concentrations of MB, decreases as the MBAgNPr conjugates are formed.

Furthermore, in Fig. 6(c), we observed that the MB emission intensity decreased according to the increasing of the PS concentration, and this effect may be attributed to the characteristic fluorescence self-quenching due to excess of competing species [38]. This reduction was not observed in the MB conjugates (Fig. 6d and Fig. 7). On the contrary, for the MBAgNPr conjugates, we observed an increase of the emission intensity according to the rise of the MB concentration. Indeed, we observed that MBAgNPr3 presented an increase of ca. 25 % in emission intensity when compared to MB alone ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). We believe that this behavior is related to the MB association with the AgNPrs, which decreases the number of free MB species in the sample, and consequently reduces, not only the emission self-quenching, but also, the MB dimerization (as observed in Fig. 6b) by keeping the PS species in a greater distance from each other.

When using only MB in PDI of *C. albicans*, compared to the highest amount of the conjugate, we observed that the inactivation, although still not high, was concentration and light dose dependent. Using a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, Oliveira-Silva et al., (2019) [39] observed inactivation of *C. albicans* isolates, but this effect was obtained by applying a 4 times higher light dose than compared to our experiment. Nevertheless, we increased the efficiency of MB action by associating them to AgNPrs. Using the MBAgNPr3 conjugate, we decreased irradiation time to 2 min and fully inactivated the isolate, and MBAgNPr2 ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) completely inactivated the same strain within 4 min. Negligible inactivation was observed for MBAgNPr1 and we believe that this result is associated with the small number of MB molecules per NP. It is worth mentioning that we observed no photodynamic action when applying only AgNPr systems to *C. albicans* isolates with or without light radiation, preserving cell viability.

Some previous strategies have been reported to improve MB mediated photodynamic treatment. Among them, the MB was incorporated in latex membranes to inactivate *C. albicans* [40] and in another study, MB was combined with spherical AgNPs for bacterial PDI [41]. According to Belekov et al. (2020) [41], a germicidal effect may have come from the association of 10–15 nm spherical AgNPs and MB. The authors claim that the smaller size enabled entry of the AgNPs into microorganisms allowing a greater silver antibacterial mechanism. In contrast, we find that our nanoprisms, that present a greater dimension (30 - 40 nm), do not succeed in entering the microorganisms, and are most probably

anchoring on the fungal surface either by bonding with sulfur-containing proteins, or else, by being attracted to the negative cell wall by the MB species, promoting the oxidative effect on the cell wall [42,43].

Finally, the proximity of MB species to the metallic NP surface plus the overlap of NP extinction band with the MB absorption profile may promote a boosting of PDI via plasmonic effect. As shown in our previous study, the AgNPrs, prepared by the same synthetic route of the present study, presented ca. 30 % electric field enhancement at the edges of their surfaces [20]. This allows for a greater plasmonic enhancement of the absorption or emission process in the proximity of the prisms. In addition, it was already reported that the dimerization process influences the type of photochemical mechanism [44–47]. In the electronic excitation of dimers, electron transfer reactions (type I) are observed, forming semi-reduced and semi-oxidized radicals, that is, in high concentration of dimers, the type II mechanism is suppressed, favoring the type I mechanism, decreasing, the formation of singlet oxygen. Gabrielli et al. (2007) [45] suggested that semi-reduced radicals can react with oxygen forming superoxide, which can lead to the formation of several other

reactive oxygen species, such as hydroxyl radicals. Studies with *C. albicans* have shown that high MB concentration (*i.e.* higher than $60 \mu\text{mol L}^{-1}$) can cause PS aggregation and reduce the photodynamic efficacy.

Thus, taking together all the assays of the present study, we believe that the MB-PDI enhancement observed in the presence of AgNPrs is due to a combination of two main factors. We suggest that one of the factors is the contribution of the plasmonic effect due to the optical overlap between MB absorption band and AgNPrs optical extinction (Fig. 5b) as well as their physical proximity induced by electrostatic association. The second is the anchoring of MB species on the Ag nanoprisms providing a greater availability of MB in the monomer form, thus improving its PS action. As far as we know, there is no report of using AgNPrs with MB to inactivate *Candida* species and we believe that AgNPrs may be applied as new plasmonic tunable tools to enhance the performance of a great number of PSs aiming at photoinduced cell inactivation.

4. Conclusion

In this work, MB association with NPrs (30–40 nm) showed that we can successfully inactivate *C. albicans* isolated from balanoposthitis with reduced irradiation time. MBAgNPr systems showed high stability and no toxicity to fungal cells when applied alone, being suggested as a new tool for enhancing photodynamic applications with size tuning capability. We discussed the most probable enhancing processes that lead to the overall greater photo-efficiency of the conjugate compared to MB alone, and suggest that it reflects a combined mechanism of plasmonic effect and reduced MB dimer formation.

CRedit authorship contribution statement

Cláudio H. Rodrigues: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Bruna Pereira Silva:** Writing – review & editing, Validation, Visualization, Methodology. **Marques L.R. Silva:** Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Dimitri C. Gouveia:** Writing – original draft, Methodology. **Adriana Fontes:** Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Danielle P.C. Macêdo:** Writing – review & editing, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Beate S. Santos:** Supervision, Project administration, Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Writing – review & editing.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq, 424235/2018-8, 406450/2021-8 and 421369/2023-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(Capes, for fellowship of C. H. Rodrigues) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, APQ-0573-2.09/18 and BIC 1431-4.03/21). This work is also linked to National Institute of Photonics (INCT-Info).

References

- [1] C. Lisboa, A. Santos, C. Dias, F. Azevedo, C. Pina-Vaz, A. Rodrigues, Candida balanoposthitis: risk factors, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 24 (7) (2010) 820–826, <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03533.x>.
- [2] O.S. Perkins, S. Cortes, Balanoposthitis, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2022.
- [3] Y. Hu, Y. Hu, Y. Lu, S. Huang, K. Liu, X. Han, Z. Mao, Z. Wu, X. Zhou, A Case Report of Penile Infection Caused by Fluconazole- and Terbinafine-Resistant Candida albicans, Mycopathologia 182 (3–4) (2017) 397–402, <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0070-z>.
- [4] I. Maatouk, M.A. Hajjar, R. Moutran, Candida albicans and Streptococcus pyogenes balanitis: diabetes or STI? Int. J. STD AIDS. 26 (10) (2015) 755–756, <https://doi.org/10.1177/0956462414555933>.
- [5] S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przysupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka, Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations, Biomed. Pharmacother. 106 (2018) 1098–1107, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.
- [6] A.L.P. Silvestre, L.D. Di Filippo, J.F. Besegato, S.R. de Annunzio, B. Almeida Furquim de Camargo, P.B.G. de Melo, A.N. de S. Rastelli, C.R. Fontana, M. Chorilli, Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral infections, Int. J. Pharm. 592 (2021) 120078, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120078>.
- [7] F. Alves, J.C. Carmello, E.G.O. Mima, C.A.S. Costa, V.S. Bagnato, A.C. Pavarina, Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant Candida albicans *in vivo*, Med. Mycol. 57 (5) (2019) 609–617, <https://doi.org/10.1093/mmy/myo83>.
- [8] F. Daliri, A. Azizi, M. Goudarzi, S. Lawaf, A. Rahimi, *In vitro* comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene blue on Candida albicans colonies, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 26 (2019) 193–198, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.03.017>.
- [9] J.C. Carmello, F. Alves, F.G. Basso, C.A. de Souza Costa, A.C. Tedesco, F. Lucas Primo, E.G. de O. Mima, A.C. Pavarina, Antimicrobial photodynamic therapy reduces adhesion capacity and biofilm formation of Candida albicans from induced oral candidiasis in mice, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 27 (2019) 402–407, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.06.010>.
- [10] J. Ma, H. Shi, H. Sun, J. Li, Y. Bai, Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on Candida albicans biofilms *in vitro*, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 27 (2019) 280–287, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.06.015>.
- [11] L. Shang, X. Zhou, J. Zhang, Y. Shi, L. Zhong, Metal Nanoparticles for photodynamic therapy: a potential treatment for breast cancer, Molecules 26 (21) (2021) 6532, <https://doi.org/10.3390/molecules26216532>.
- [12] J.E. Millstone, S.J. Hurst, G.S. Metraux, J.I. Cutler, C.A. Mirkin, Colloidal gold and silver triangular nanoprisms, Small 5 (6) (2009) 646–664, <https://doi.org/10.1002/sml.200801480>.
- [13] M. Li, S.K. Cushing, N. Wu, Plasmon-enhanced optical sensors: a review, Analyst 140 (2) (2015) 386–406, <https://doi.org/10.1039/C4AN01079E>.
- [14] J. Honda, K. Sugawa, S. Fukumura, R. Katoh, H. Tahara, J. Otsuki, Optimizing the distance between upconversion thin films and silver nanoprisms for the design of a high-performance plasmonic Triplet–Triplet Annihilation Upconversion System, Langmuir 39 (2023) 16138–16150, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c02352>.
- [15] Y. Zhou, Y. Li, X. Tang, H. Li, Q. Zhang, K.S. Park, P. Li, A dual-signal output plasmonic sensor based on glucose oxidase-triggered etching of triangular silver nanoprisms for sensitive detection of fumonisin, Microchem. J. 196 (2024) 109713, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109713>.
- [16] I. Maliszewska, E. Wanarska, A.C. Thompson, I.D.W. Samuel, K. Matczyszyn, Biogenic gold nanoparticles decrease methylene blue photobleaching and enhance antimicrobial photodynamic therapy, Molecules 26 (3) (2021), <https://doi.org/10.3390/molecules26030623>.
- [17] M.B. Rivas Aiello, D. Castrogiovanni, J. Parisi, J.C. Azcarate, F.S. García Einschlag, T. Gensch, G.N. Bosio, D.O. Mártire, Photodynamic Therapy in HeLa Cells Incubated with Riboflavin and Pectin-coated Silver Nanoparticles, Photochem. Photobiol. 94 (6) (2018) 1159–1166, <https://doi.org/10.1111/php.12974>.
- [18] M.S. Ribeiro, L.S.A. de Melo, S. Farooq, A. Baptista, I.T. Kato, S.C. Núñez, R.E. de Araújo, Photodynamic inactivation assisted by localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles: *in vitro* evaluation on Escherichia coli and Streptococcus mutans, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 22 (2018) 191–196, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.04.007>.
- [19] P.G. Mahajan, N.C. Dige, B.D. Vanjare, S.-H. Eo, S.-Y. Seo, S.J. Kim, S.-K. Hong, C.-S. Choi, K.H. Lee, A potential mediator for photodynamic therapy based on silver nanoparticles functionalized with porphyrin, J. Photochem. Photobiol. A Chem. 377 (2019) 26–35, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.03.034>.
- [20] C.H. Rodrigues, E.A.G. Araújo, R.P. Almeida, T.P. Nascimento, M.M. Silva, G. Abbas, F.D. Nunes, E. Lins, M.C.B. Lira-Nogueira, J.S.A. Falcão, A. Fontes, A.L. F. Porto, G. Pereira, B.S. Santos, Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus isolated from bubaline mastitis, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 34 (2021) 102315, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102315>.
- [21] D. Aherne, D.M. Ledwith, M. Gara, J.M. Kelly, Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature, Adv. Funct. Mater. 18 (14) (2008) 2005–2016, <https://doi.org/10.1002/adfm.200800233>.
- [22] O.V. Ovchinnikov, A.V. Evtukhova, T.S. Kondratenko, M.S. Smirnov, V. Yu. Khokhlov, O.V. Erina, Manifestation of intermolecular interactions in FTIR spectra of methylene blue molecules, Vib. Spectrosc. 86 (2016) 181–189, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.06.016>.
- [23] D. Zhang, L. Fu, L. Liao, N. Liu, B. Dai, C. Zhang, Preparation, characterization, and application of electrochemically functional graphene nanocomposites by one-step liquid-phase exfoliation of natural flake graphite with methylene blue, Nano Res. 5 (2012) 875–887, <https://doi.org/10.1007/s12274-012-0271-9>.
- [24] Z. Li, C. Wang, W. Jiang, Intercalation of methylene blue in a high-charge calcium montmorillonite – an indication of surface charge determination, Adsorp. Sci. Technol. 28 (4) (2010) 297–312, <https://doi.org/10.1260/0263-6174.28.4.297>.
- [25] P.H.B. Aoki, D. Volpati, W. Caetano, C.J.L. Constantino, Study of the interaction between cardiolipin bilayers and methylene blue in polymer-based Layer-by-Layer and Langmuir films applied as membrane mimetic systems, Vib. Spectrosc. 54 (2) (2010) 93–102, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.03.013>.
- [26] C. D'Andrea, J. Bochterle, A. Toma, C. Huck, F. Neubrech, E. Messina, B. Fazio, O. M. Maragó, E.D. Fabrizio, M.L.L. Chapelle, P.G. Gucciardi, A. Pucci, Optical Nanoantennas for Multiband Surface-enhanced infrared and raman spectroscopy, ACS Nano 7 (4) (2013) 3522–3531, <https://doi.org/10.1021/nn4004764>.
- [27] C.N.R. Rao, R. Venkataraghavan, T.R. Kasturi, Contribution to the infrared spectra of organosulphur compounds, Can J Chem 42 (1) (1964) 36–42, <https://doi.org/10.1139/v64-006>.
- [28] D. Grumelli, L.P.M. Leo, C. Bonazzola, V. Zamlynny, E.J. Calvo, R.C. Salvarezza, Methylene blue incorporation into alkanethiol SAMs on Au(111): effect of hydrocarbon chain ordering, Langmuir 26 (11) (2010) 8226–8232, <https://doi.org/10.1021/la904594p>.
- [29] S.H.A. Nicolai, P.R.P. Rodrigues, S.M.L. Agostinho, J.C. Rubim, Electrochemical and spectroelectrochemical (SERS) studies of the reduction of methylene blue on a silver electrode, J. Electroanal. Chem. 527 (1–2) (2002) 103–111, [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(02\)00832-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(02)00832-X).
- [30] Y. Wang, Y. Shen, Y. Zhang, B. Yue, C. Wu, pH-Sensitive Polyacrylic Acid (PAA) Hydrogels Trapped with Polysodium-p-Styrenesulfonate (PSS), J. Macromol. Sci., Part B 45 (4) (2006) 563–571, <https://doi.org/10.1080/00222340600770111>.
- [31] B.T.N.C. Andrade, A.C.S. Bezerra, C.R. Calado, Adding value to polystyrene waste by chemically transforming it into sulfonated polystyrene, Matéria 24 (3) (2019) e-12417, <https://doi.org/10.1590/S1517-707620190003.0732>.
- [32] J.P. Tardivo, A.D. Giglio, C.S. Oliveira, D.S. Gabrielli, H.C. Junqueira, D.B. Tada, D. Severino, R.F. Turchiello, M.S. Baptista, Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2 (3) (2005) 174–191, [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9).
- [33] P.G. Calavia, G. Bruce, L. Pérez-García, D.A. Russell, Photosensitizer-gold nanoparticle conjugates for photodynamic therapy of cancer, Photochem. Photobiol. Sci. 17 (11) (2018) 1534–1552, <https://doi.org/10.1039/C8PP00271A>.
- [34] F. Bettanin, T.A.C. Fontinelles, C.D. Maciel, L.G. Dias, M.D. Coutinho-Neto, P. Homem-de-Mello, Aggregation of photosensitizers: the role of dispersion and solvation on dimer formation energetics, Theor. Chem. Acc. 134 (12) (2015) 152, <https://doi.org/10.1007/s00214-015-1732-5>.
- [35] A. Fernandez-Perez, G. Marban, Visible Light Spectroscopic Analysis of methylene blue in water; what comes after dimer? ACS omega 5 (46) (2020) 29801–29815, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03830>.
- [36] K. Bergmann, C.T. O'Konski, A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite, J. Phys. Chem. 67 (10) (1963) 2169–2177, <https://doi.org/10.1021/j100804a048>.
- [37] N. Florence, H. Naorem, Dimerization of methylene blue in aqueous and mixed aqueous organic solvent: a spectroscopic study, J. Mol. Liq. 198 (2014) 255–258, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.06.030>.
- [38] W. Bae, T.-Y. Yoon, C. Jeong, Direct evaluation of self-quenching behavior of fluorophores at high concentrations using an evanescent field, PLoS ONE 16 (2) (2021) e0247326, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247326>.
- [39] T. Oliveira-Silva, L.H. Alvarenga, C. Lima-Leal, B. Godoy-Miranda, P. Carribeiro, L. C. Suzuki, M.S. Ribeiro, I.T. Kato, C. Pavan, R.A. Prates, Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on Candida albicans in the presence of glucose, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 27 (2019) 54–58, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.032>.
- [40] M.A.O. Sousa, M.A.C. de Faria, R.P. Ribeiro, J.V.P. Valverde, H.D. Rocha, K.F. dos Santos, M.S. Sousa, P.C.S. Souto, J.R. Silva, N.C. de Souza, Latex membranes with methylene blue dye for antimicrobial photodynamic therapy, Photochem. Photobiol. Sci. 20 (8) (2021) 1027–1032, <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00077-z>.
- [41] E. Belekov, K. Kholikov, L. Cooper, S. Banga, A.O. Er, Improved antimicrobial properties of methylene blue attached to silver nanoparticles, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 32 (2020) 102012, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102012>.
- [42] F. Lavaee, M. Yousefi, P. Haddadi, Comparison of the fungicidal efficacy of photodynamic therapy with methylene blue, silver nanoparticle, and their conjugation on oral Candida isolates using cell viability assay, Curr. Med. Mycol. 6 (4) (2020) 35–40, <https://doi.org/10.18502/cmm.6.4.5332>.
- [43] B. Le Ouay, F. Stellacci, Antibacterial activity of silver nanoparticles: a surface science insight, Nano Today 10 (3) (2015) 339–354, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>.

- [44] S.C. Nuñez, T.M. Yoshimura, M.S. Ribeiro, H.C. Junqueira, C. Maciel, M. D. Coutinho-Neto, M.S. Baptista, Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue, *J. Photochem. Photobiol. B*. 150 (2015) 31–37, <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.018>.
- [45] D. Gabrielli, E. Belisle, D. Severino, A.J. Kowaltowski, M.S. Baptista, Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions, *Photochem. Photobiol.* 79 (3) (2004) 227–232, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2004.tb00389.x>.
- [46] H.C. Junqueira, D. Severino, L.G. Dias, M.S. Gugliotti, M.S. Baptista, Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (11) (2002) 2320–2328, <https://doi.org/10.1039/B109753A>.
- [47] D. Severino, H.C. Junqueira, M. Gugliotti, D.S. Gabrielli, M.S. Baptista, Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue, *Photochem. Photobiol.* 77 (5) (2003) 459–468, [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0770459IONCIO2.o.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0770459IONCIO2.o.CO2).