



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Instituto de Biociências – INBIO  
Curso de Graduação em Ciências Biológicas

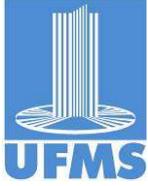


**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA  
DE COMPOSTOS PORFIRÍNICOS (3P<sub>t</sub>TPyP E 4P<sub>t</sub>TPyP) CONTRA  
*Aspergillus flavus***

Natalia Mendonça Lopes

CAMPO GRANDE-MS

2021



Curso de Graduação em Ciências Biológicas / UFMS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA  
DE COMPOSTOS PORFIRÍNICOS (3PtTPyP E 4PtTPyP) CONTRA  
*Aspergillus flavus***

Natalia Mendonça Lopes

Trabalho desenvolvido durante a disciplina de  
Introdução à Pesquisa Científica II como  
parte da avaliação do Curso de Graduação  
em Ciências Biológicas (Bacharelado) da  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

**Orientadora:** Carla Santos Oliveira

Campo Grande – MS

2021

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à minha orientadora por sempre se mostrar disponível para me ajudar e me orientar da melhor forma possível. Também agradeço à técnica Clarice Rossato Marchetti que sempre esteve disponível durante os experimentos e sempre me prestou suporte. À Giovana Martins, que também prestou suporte durante as fases finais dos experimentos.

À minha família e amigos por sempre me apoiarem e me ajudarem durante todo esse processo.

## RESUMO

A terapia de fotoinativação ou terapia fotodinâmica antimicrobiana (aTFD) é uma técnica alternativa à tratamentos contra microrganismos e com grande potencial para a ampliação de suas aplicações. Na aTFD, a combinação de três elementos importantes induz a morte celular: luz, fotossensibilizador e oxigênio. O fotossensibilizador absorve a luz e se excita, interagindo com as moléculas de oxigênio e produzindo espécies reativas desta molécula, como o oxigênio singlete, uma espécie altamente oxidante e reativa que pode reagir com vários alvos na célula microbiana, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Primeiramente, realizou-se o experimento de incorporação, preparando-se amostras (*Aspergillus flavus* incubado com 100  $\mu$ M de porfirina em meio de cultura líquido) e brancos (*A. flavus* incubado sem a porfirina em meio de cultura líquido) em triplicata para cada porfirina fotossensibilizadora (3PtTPyP e 4PtTPyP); após o tempo de incubação e lavagem, realizou-se a leitura em espectrofotômetro. Com as leituras, observou-se que a porfirina 3PtTPyP foi mais absorvida pelo fungo em comparação à 4PtTPyP. Após verificar a incorporação, realizou-se o experimento de teste de viabilidade de *A. flavus* incorporado com o fotossensibilizador e incidência de luz; após a irradiação, o crescimento do micélio do fungo foi medido por 4 dias. Posteriormente, calculou-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e índice de crescimento micelial (ICM) e realizou-se as análises estatísticas. Constatou-se que a porfirina 4PtTPyP não apresentou uma capacidade de fotoinativação significativa em nenhuma das doses estudadas (10 J/cm<sup>2</sup> e 50 J/cm<sup>2</sup>). Já a porfirina 3PtTPyP demonstrou uma capacidade de inativação fotodinâmica mais elevada e significativa ( $p < 0,05$ ) na dose de 50 J/cm<sup>2</sup>. Além disso, a luz e o fotossensibilizador sozinhos não causam efeitos significativos no IVCM e ICM do fungo.

## ABSTRACT

Photoinactivation therapy or antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is an alternative technique to treatments against microorganisms and with great potential for expanding its applications. In aPDT, the combination of three important elements induces cell death: light, photosensitizer and oxygen. The photosensitizer absorbs light and is excited, interacting with oxygen molecules and producing reactive species of this molecule, such as singlet oxygen, a highly oxidizing and reactive species that can react with various targets in the microbial cell, such as nucleic acids, proteins and lipids. First, the incorporation experiment was carried out, preparing samples (*Aspergillus flavus* incubated with 100  $\mu\text{M}$  of porphyrin in liquid culture medium) and blanks (*A. flavus* incubated without porphyrin in liquid culture medium) in triplicate for each porphyrin photosensitizer (3PtTPyP and 4PtTPyP); after incubation and washing, the reading was carried out in a spectrophotometer. With the readings, it was observed that 3PtTPyP porphyrin was more absorbed by the fungus compared to 4PtTPyP. After verifying the incorporation, the experiment of viability test of *A. flavus* incorporated with the photosensitizer and light incidence was carried out; after irradiation, the growth of the fungus mycelium was measured for 4 days. Subsequently, the mycelial growth velocity index (IVCM) and mycelial growth index (ICM) were calculated and statistical analyzes were performed. It was found that the porphyrin 4PtTPyP did not present a significant photoinactivation capacity at any of the doses studied (10  $\text{J}/\text{cm}^2$  and 50  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). On the other hand, 3PtTPyP porphyrin showed a higher and more significant photodynamic inactivation capacity ( $p < 0.05$ ) at a dose of 50  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Furthermore, light and the photosensitizer alone do not cause significant effects on the IVCM and ICM of the fungus.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aTFD	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
FS	Fotossensibilizador
3PtTPyP	Tetra-meso-[(3-piridil)-cloro-2,2'-bipiridil-platina(II)]porfirina
4PtTPyP	Tetra-meso-[(4-piridil)-cloro-2,2'-bipiridil-platina(II)]porfirina
IVCM	Índice de velocidade de crescimento micelial
ICM	Índice de crescimento micelial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Cultivo de fungos e contagem dos esporos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Incorporação de derivados de porfirina de platina em <i>Aspergillus flavus</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Viabilidade de <i>Aspergillus flavus</i> incorporado com o fotossensibilizador com e sem incidência de luz .....</b>	<b>17</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Incorporação de derivados de porfirina com platina em <i>Aspergillus flavus</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Viabilidade de <i>Aspergillus flavus</i> incorporado com o fotossensibilizador com e sem incidência de luz .....</b>	<b>25</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização da luz no tratamento de doenças é uma prática antiga, sendo utilizada por civilizações da Antiguidade no Egito, Grécia e Índia (ABDEL-KADER, 2014). Porém, ao decorrer dos séculos, tal prática se tornou inutilizada e esquecida, sendo redescoberta novamente em meados do século XX (NUNEZ et al., 2015).

A fototerapia moderna teve grandes avanços e se popularizou através do médico dinamarquês Niels Finsen, pioneiro no uso da luz solar no tratamento de doenças como lupus vulgaris e varíola, ganhando o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1903 por seu trabalho (McDONAGH, 2001).

Também em meados do século XX, foram realizadas as primeiras pesquisas científicas sobre o uso de fotossensibilizadores aplicados na medicina ocidental, dando início à uma série de trabalhos a respeito da terapia fotodinâmica (DANIELL & HILL, 1991).

A terapia fotodinâmica possui diversas aplicações, que envolvem tratamento de tumores e infecções dermatológicas, odontológicas, do trato respiratório, urinário, entre outras (RKEIN & OZOG, 2014).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aTFD) ou terapia de fotoinativação é utilizada em tratamentos contra certos agentes microbianos (ABDEL-KADER, 2014). A aTFD pode ser aplicada contra vários patógenos, como bactérias, fungos e parasitas; além disso, o mesmo fotossensibilizador pode ser utilizado contra diferentes tipos de organismos (ABDEL-KADER, 2014). Ademais, muitos tratamentos onde a aTFD é empregada são de baixo custo e podem ser repetidos várias vezes (HAMBLIN & JORI, 2015).

Na aTFD, utiliza-se da combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio para induzir a morte celular. Os processos da aTFD são realizados por dois mecanismos competitivos que necessitam da participação do fotossensibilizador fotoexcitado, usualmente, no estado tripleto. No primeiro mecanismo, há uma transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no estado tripleto e um substrato, com isso, há geração de espécies radicais; essas espécies podem reagir com as biomoléculas locais e gerar dano ou podem reagir com o oxigênio molecular em seu estado fundamental (tripleto), desencadeando reações que podem gerar muitos produtos oxidados (HAMBLIN & JORI, 2015).

No segundo mecanismo, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto para um aceptor de elétrons, frequentemente o oxigênio molecular. Com isso, o oxigênio molecular tripleto é convertido em oxigênio singleto, reagindo com vários alvos na célula microbiana: ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, entre outros (HAMBLIN & JORI, 2015); (HAMBLIN & HASAN, 2004). A quantidade de FS incorporado pelo microrganismo depende principalmente das características anfífilas da substância e sua afinidade com os componentes celulares; a interação com os componentes celulares decorre de atributos como número de cargas positivas do FS, grau de hidrofobicidade e organização espacial dos substituintes na molécula (ALVES et. al, 2014).

Dessa forma, a incorporação do fotossensibilizador juntamente com o estímulo luminoso irá resultar em necrose celular ou apoptose. Além disso, apenas as células que absorveram o fotossensibilizador serão danificadas, portanto, os tecidos que circundam o local de infecção não serão afetados (RKEIN & OZOG, 2014). Esse mecanismo de ação torna mais improvável o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos (WAINWRIGHT et al., 2017), isso porque a

aTFD é uma técnica em que vários componentes da célula microbiana são alvos e susceptíveis à ação das espécies reativas geradas (HAMBLIN & JORI, 2015).

Os fotossensibilizadores mais comumente empregados na aTFD são corantes sintéticos como azul de metileno e azul de toluidina. Porém, outros compostos também são estudados e utilizados: ácido 5-aminolevulínico, fenotiazina e tetrapirróis, como ftalocianinas e porfirinas (GHORBANI et. al, 2018); (DONELLY et. al, 2008).

Os fotossensibilizadores devem possuir algumas características para que possam ser aplicados na terapia fotodinâmica antimicrobiana, como: possuir pouca toxicidade no escuro, seletividade para adentrar as células microbianas e não as células do hospedeiro, ser rapidamente excretado pelas células do hospedeiro, possuir características anfífilas e não ser mutagênico (SIMPLICIO et. al, 2002); (LÓ et. al, 2015).

As porfirinas são moléculas orgânicas e macrocíclicas que possuem anéis tetrapirrólicos unidos através de pontes metínicas (ALVES, 2014). Algumas porfirinas catiônicas são conhecidas por possuírem eficácia contra agentes microbianos, isso porque esses compostos possuem um largo espectro de ação, podendo agir contra diferentes patógenos; além disso, são altamente seletivos, sendo mais fototóxicos aos microrganismos do que ao hospedeiro e possuem boa eficiência contra cepas selvagens e resistentes à antibióticos (NUNEZ et al., 2015).

Em análises para verificar os efeitos fotodinâmicos de derivados de porfirina contra diversas cepas de *Staphylococcus*, Maisch e colaboradores (2005) observaram uma redução de 99,9% de redução do número de células viáveis do patógeno utilizando uma incubação com 0,005  $\mu\text{M}$  dos derivados porfirínicos XF70 ou XF73 e dose de luz de 13.7  $\text{J}/\text{cm}^2$ , totalizando 15 minutos de irradiação; a

redução ocorreu em todas as cepas, inclusive nas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina.

Também utilizando o derivado porfirínico XF73, Gonzales e colaboradores (2013) observaram uma queda na ordem de 6 log na viabilidade de células planctônicas de *Candida albicans* após uma incubação de 15 minutos com 0,5  $\mu\text{M}$  do fotossensibilizador e irradiação com luz azul (12.1  $\text{J}/\text{cm}^2$  por 15 minutos). Para células de biofilme de *C. albicans*, necessitou-se de um tempo de incubação maior (4 horas) com 1  $\mu\text{M}$  de fotossensibilizador e uma dose maior de luz (48.2  $\text{J}/\text{cm}^2$  por 60 minutos), atingindo uma queda na viabilidade de 5 log.

Utilizando 20  $\mu\text{M}$  da porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e uma dose de luz de 64.8  $\text{J}/\text{cm}^2$ , totalizando 270 minutos de irradiação, Beirão e colaboradores (2014) observaram uma redução de 81% na produção de polissacarídeo constituinte da matriz do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, esse estudo mostra uma inativação significativa do biofilme de outras espécies como *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* na mesma concentração de porfirina e dose de luz.

Já em análises com o fungo *Penicillium chrysogenum*, Gomes e colaboradores (2011) observaram uma redução de 4.1 log da viabilidade de conídios, utilizando doses de 50  $\mu\text{M}$  de fotossensibilizador porfirínico e luz na dose de 240  $\text{J}/\text{cm}^2$  por 20 minutos.

As porfirinas 3PtTPyP e 4PtTPyP são isômeros de complexos de platina (II) e polipiridil e são derivadas das moléculas de estrutura básica tetra-meso-(3-piridil)porfirina (3TPyP) e tetra-meso-(4-piridil)porfirina(4TPyP), ilustradas na Figura 1. As porfirinas tetra-meso-[(3-piridil)-cloro-2,2'-bipiridil-platina(II)]porfirina (3PtTPyP) e tetra-meso-[(4-piridil)-cloro-2,2'-bipiridil-platina(II)]porfirina (4PtTPyP) diferem dessas moléculas de estrutura básica pois possuem quatro complexos contendo um

íon de platina adicionados às suas estruturas (COCCA, 2017).

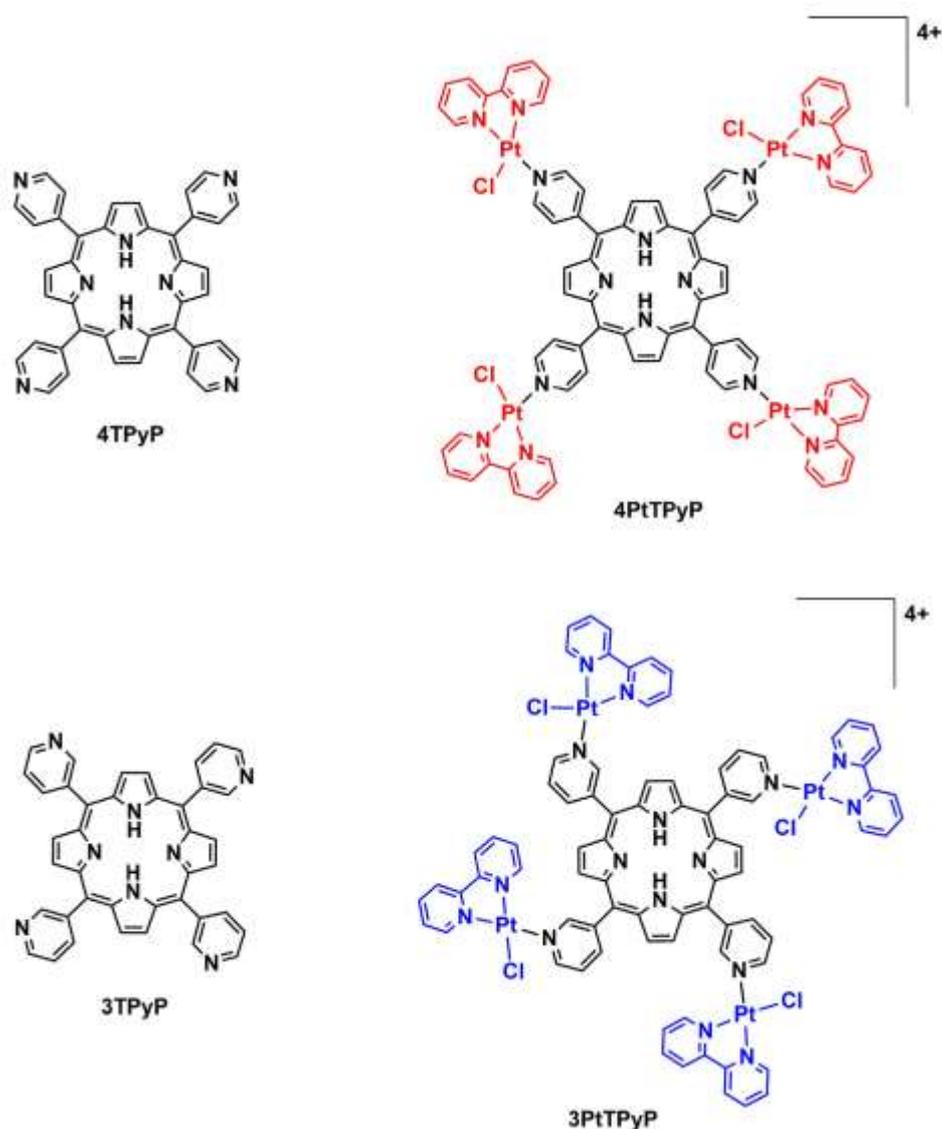


Figura 1 – Estruturas das porfirinas 3PtTPyP e 4PtTPyP.

Fonte: COCCA, Leandro H. Z. et al., 2018.

A diferença entre as moléculas de 3PtTPyP e 4PtTPyP é a posição do grupo ligado ao átomo de nitrogênio na estrutura do piridil, sendo que na 3PtTPyP o nitrogênio está na posição *meta* e na 4PtTPyP está na posição *para*. A porfirina 4PtTPyP apresenta uma geometria mais plana, com os complexos de platina (II) no mesmo plano do anel porfirínico. Já a porfirina 3PtTPyP possui os complexos de platina (II) abaixo e acima do anel porfirínico (COCCA et al., 2018).

A capacidade de fotoinativação do isômero *para* (4PtTPyP) contra diferentes microrganismos já foi avaliada por LOPES e colaboradores (2019), em que se detectou uma atividade antimicrobiana do isômero na presença de luz vermelha (dose de 180J/cm<sup>2</sup> por 1 hora) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Resultados positivos também foram obtidos por ROSSI e colaboradores (2020) em experimentos com várias espécies de micobactérias utilizando ambos os isômeros com uma dose de luz de 270 J/cm<sup>2</sup>.

*Aspergillus flavus* trata-se de um fungo filamentoso que geralmente se desenvolve em grãos e é capaz de produzir aflatoxinas, um grupo de micotoxinas altamente tóxicas, que se ingeridas podem causar sérios danos, estando associadas com cirrose hepática e câncer de fígado (MADIGAN et al., 2016). Além disso, esse fungo também pode causar aspergilose, uma micose oportunista (TORTORA et al., 2012).

Quadros de aspergilose invasiva são raros em indivíduos sem deficiências imunológicas, porém possui uma prevalência significativa em indivíduos imunocomprometidos, sendo que grande parte dos casos são causados por *A. fumigatus*, sendo *A. flavus* a segunda espécie mais comum a causar essa doença (KRISHNAN et. al, 2009; HEDAYATI et. al, 2007). Já nos casos de infecções superficiais causadas por esse gênero de fungos, *A. flavus* é o causador mais comum (HEDAYATI et. al, 2007).

As classificações clínicas da aspergilose são: alérgica, que pode causar asma e alveolite alérgica extrínsecas e aspergilose broncopulmonar alérgica; colonização saprofítica, que pode envolver tecidos pulmonares e extrapulmonares; e invasiva, que também pode ser pulmonar ou extrapulmonar (AMAIKE & KELLER, 2011).

O tratamento para a aspergilose envolve a administração de medicamentos antifúngicos como voriconazol, isavuconazol e anfotericina B, que apresentam toxicidade hepática e renal (REVANKAR, 2019). Com isso, observa-se a importância de desenvolver tratamentos eficientes, com baixa toxicidade e mutagênese e sem risco de desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte do agente infeccioso. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial de inativação fotodinâmica promovido pelas porfirinas 3PtTPyP e 4PtTPyP, utilizadas como fotossensibilizadores, contra o fungo *Aspergillus flavus*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial de inativação fotodinâmica promovido pelas porfirinas 3PtTPyP e 4PtTPyP, utilizadas como fotossensibilizadores, contra o fungo *Aspergillus flavus*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar as taxas de incorporação de cada porfirina no fungo *Aspergillus flavus*;
- Verificar se há diferenças estatísticas nas taxas de incorporação;
- Realizar experimentos sem incidência de luz de 532 nm com *Aspergillus flavus* incorporado com as porfirinas e verificar seu crescimento;
- Realizar experimentos com incidência de luz de 532 nm 10 J/cm<sup>2</sup> e 50 J/cm<sup>2</sup> com *Aspergillus flavus* incorporado com as porfirinas e verificar seu crescimento;
- Realizar cálculos a respeito do índice de crescimento micelial e índice de velocidade de crescimento micelial;
- Verificar se há diferenças estatísticas entre índices de cada tratamento.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo de fungos e contagem dos esporos

O fungo *Aspergillus flavus* foi mantido em tubos contendo meio sólido BDA (caldo de batata 20,0%, dextrose 2,0% e ágar 2,0%) inoculado a partir de um outro inóculo, incubado por 7 dias. Após o crescimento e esporulação, utilizou-se 10 mL de água destilada e estéril para recuperar os esporos da superfície, raspando-os com o auxílio de um palito estéril. Seguidamente, coletou-se 2 mL dessa solução de esporos e diluiu-se em 18 mL de água destilada estéril. Posteriormente, coletou-se 20 µL dessa solução final para realizar a contagem de esporos. A contagem foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer.

#### 3.2 Incorporação de derivados de porfirina de platina em *Aspergillus flavus*

A captura do fotossensibilizador pelo fungo, que representa o quanto do fotossensibilizador numa determinada concentração é absorvido pelo fungo, foi determinada. Buscou-se quantificar o acúmulo de fotossensibilizador no meio interno através de incubação dos fotossensibilizadores com concentração de 100 µM, seguido de subsequente lavagem, ruptura das paredes fúngicas e determinação da quantidade de fotossensibilizador no interior do fungo por análises usando espectrofotometria.

Primeiramente preparou-se as soluções estoque das porfirinas 3PtTPyP e 4PtTPyP. Cada porfirina foi colocada em um frasco, cada um contendo 10 mL de dimetilsulfóxido; as soluções foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador do tipo vórtex. Posteriormente, preparou-se as soluções de trabalho, retirando-se 10 µL das soluções estoque e colocou-se em balões volumétricos com o acréscimo de água destilada para volume final igual a 10 mL. Em seguida, foram retirados 3 mL de

cada solução de trabalho para a realização da leitura em espectrofotômetro.

Com os valores de absorvância obtidos nas leituras espectrofotométricas, foram realizados cálculos baseados na lei de Lambert-Beer (descrita abaixo) para descobrir o valor da concentração das soluções de trabalho e estoque ( $\epsilon = 14495 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para a porfirina 3PtTPyP e  $\epsilon = 16057 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para a porfirina 4PtTPyP) (TASSO et al., 2017). Com esses resultados, pode-se preparar as soluções de trabalho, cujas concentrações para os derivados de porfirina foi de 100  $\mu\text{M}$ .

$$A = \epsilon bc$$

Sendo:

A= absorvância

$\epsilon$ = absorbtividade molar da substância

b= caminho óptico percorrido

c= concentração

Para os testes de incorporação, preparou-se frascos do tipo erlenmeyer em triplicata para cada tipo de teste (amostra e branco), cada um contendo 4,5 mL de meio de cultura Czapek (sacarose 3,0%, nitrato de sódio 0,2%, fosfato dipotássico 0,1%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,05%, cloreto de potássio 0,05%, sulfato de ferro II heptahidratado 0,001%), que foram autoclavados. Em seguida, realizou-se a contagem de esporos de *Aspergillus flavus*. Foram testadas duas concentrações de esporos:  $10^6$  e  $10^7$ .

Os esporos foram adicionados aos meios e permaneceram por 24 horas em estufa a 30°C na condição de repouso. Após esse período, as porfirinas foram adicionadas às soluções, e voltaram para a estufa para que ocorresse a incubação com os FS por um período de mais 24 horas. A preparação das amostras e brancos foi realizada conforme a descrição abaixo:

### 3PtTPyP

- Branco: meio líquido [4,5 mL] + solução de esporo [0,5 mL] + água destilada [181 µL];
- Amostra: meio líquido [4,5 mL] + solução esporo [0,5 mL] + porfirina 3PtTPyP [181 µL];

### 4PtTPyP

- Branco: meio líquido [4,5 mL] + solução de esporo [0,5 mL] + água destilada [157 µL];
- Amostra: meio líquido [4,5 mL] + solução de esporo [0,5 mL] + porfirina 4PtTPyP [157 µL];

Após o período de incubação, os erlenmeyers foram retirados da estufa e seu material transferido para tubos separados. Em seguida, colocou-se solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% em cada um dos tubos, que foram posteriormente homogeneizados em agitador do tipo vórtex e guardados na geladeira até o dia seguinte.

No dia seguinte, retirou-se os tubos da geladeira e estes foram centrifugados novamente. Subsequentemente, pipetou-se 750 µL de cada tubo, esse volume foi dividido em três poços de uma placa de 96 poços, sendo 250 µL para cada poço. Em seguida, realizou-se a leitura espectrofotométrica em 514 nm, comprimento de onda de absorção da porfirina 3PtTPyP e 515 nm, comprimento de onda de absorção da porfirina 4PtTPyP. Esses comprimentos de onda correspondem aos picos de bandas de absorção dessas porfirinas de interesse para nosso estudo. Posteriormente, realizou-se cálculos baseados na Lei de Lambert-Beer para descobrir a concentração de porfirina absorvida e um Teste t utilizando o software estatístico PAST versão 4.03; um valor de  $p < 0,05$  foi considerado

significativo.

### **3.3 Viabilidade de *Aspergillus flavus* incorporado com o fotossensibilizador com e sem incidência de luz**

Para testar a viabilidade do fungo após o tratamento, *A. flavus* foi incubado com os fotossensibilizadores desse estudo em uma concentração de 100 µM para cada fotossensibilizador adicionado separadamente e posteriormente submetido à incidência de luz em placas de Petri contendo meio de cultura sólido. Após a irradiação, as placas foram vedadas e armazenadas em estufa a 30°C na condição de repouso. O crescimento do fungo foi mensurado e comparado com as placas de controle utilizando um paquímetro digital.

Primeiramente, realizou-se a contagem de esporos de *Aspergillus flavus* utilizando uma câmara de Neubauer, chegando-se ao valor de  $2,45 \times 10^6$  esporos/mL. Seguidamente, os esporos foram inoculados em 4,5 mL de meio Czapek líquido contido em frascos do tipo erlenmeyer autoclavados. O fungo foi submetido à diferentes condições experimentais seguintes, realizadas em triplicata: laser e fotossensibilizador 3PtTPyP ou 4PtTPyP (L<sup>+</sup>F<sup>+</sup>), laser e água destilada (controle claro, L<sup>+</sup>F<sup>-</sup>), apenas fotossensibilizador 3PtTPyP ou 4PtTPyP (controle escuro, L<sup>-</sup>F<sup>+</sup>) e apenas água destilada (branco, L<sup>-</sup>F<sup>-</sup>).

Dentro de cada erlenmeyer, foi adicionado um disco de papel filtro autoclavado de 3 mm de diâmetro. Os esporos foram adicionados aos meios e permaneceram por 24 horas em estufa a 30°C na condição de repouso. Após esse período, as porfirinas e a água destilada foram adicionadas às soluções, e voltaram para a estufa para que ocorresse a incubação com os fotossensibilizadores por um período de 24 horas.

Após o término da incubação, retirou-se os discos de papel filtro das soluções e lavou-os em água destilada. Posteriormente, os discos de cada solução foram colocados em uma placa de Petri contendo meio Czapek sólido (acrescido de ágar 2,0%), contabilizando um disco por placa. As placas foram separadas de acordo com os discos que receberam, portanto também foram organizadas em tratamento com FS + luz, branco, controle claro e controle escuro.

Em seguida, realizou-se o ensaio com o laser na capela de fluxo esterilizada. Posicionou-se o laser OMNILASER, com potência de saída de 60 mW e comprimento de onda de 532 nm, na capela de fluxo ligada e ajustou-se para 1 cm a distância do feixe de luz para as placas de Petri. Foram realizados experimentos com duas doses de luz de 10 J/cm<sup>2</sup> e 50 J/cm<sup>2</sup>. As placas que receberam irradiação foram as de controle claro e tratamento com FS + luz, as demais permaneceram no escuro.

As tampas foram retiradas e as placas foram centralizadas no feixe de luz e submetidas ao laser (Figura 2). Para o experimento com a dose de 10 J/cm<sup>2</sup>, a luz foi emitida diretamente por 5 minutos e 35 segundos. Já para o experimento com a dose de 50 J/cm<sup>2</sup> a luz foi emitida em um ciclo de 14 minutos no claro e 14 minutos no escuro, até totalizar 28 minutos de luz irradiada. Os tempos de exposição foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$D = \frac{P * t}{A}$$

Sendo:

D= dose de luz;

P= potência do laser;

t= tempo;

A= área;

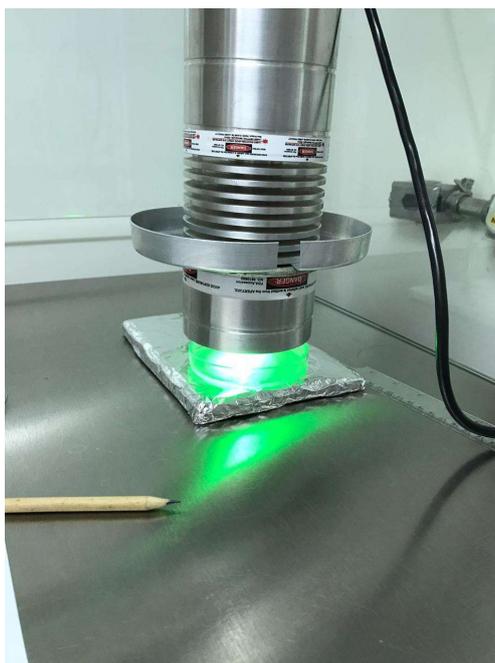


Figura 2 – Placa sendo submetida ao feixe de luz.

Fonte: Autora.

Após esse processo, todas as placas foram vedadas e colocadas em estufa a 30°C. Após 24 horas, os diâmetros das colônias de fungo foram mensurados (Figura 3), as medições foram realizadas diariamente por 4 dias.

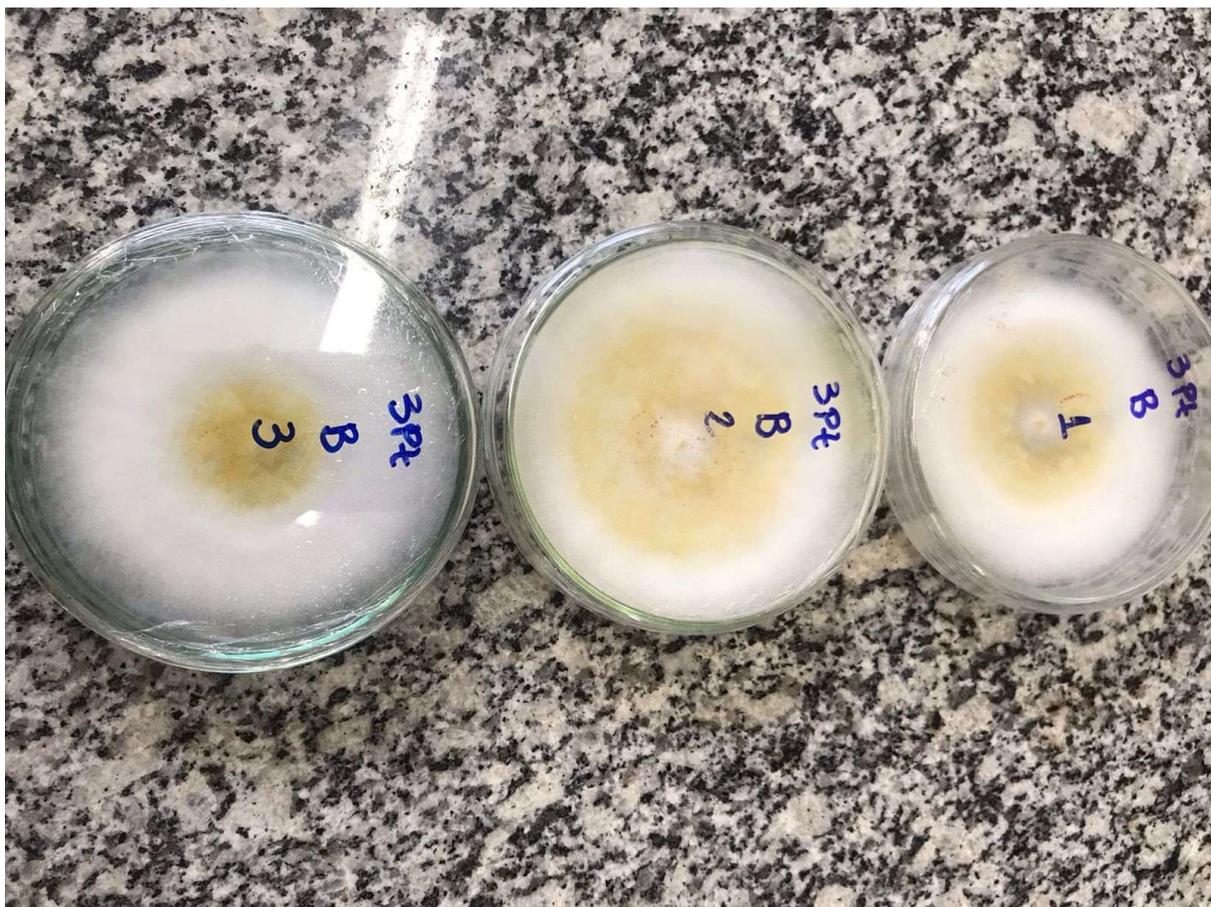


Figura 3 – Colônias do fungo *A. flavus*.

Fonte: Autora.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada através da análise do índice de velocidade de crescimento micelial (OLHER et al., 2021) e índice de crescimento micelial (BRITO et al., 2017), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial;

D= diâmetro médio atual da colônia;

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação.

$$ICM = \frac{C1}{N1} + \frac{C2}{N2} + \dots + \frac{Cn}{Nn}$$

Sendo:

ICM= índice de crescimento micelial;

C= crescimento micelial naquele determinado dia;

N= número do dia da avaliação.

Os resultados foram submetidos à uma análise de variância (ANOVA) seguida por um teste de Tukey, utilizando o software estatístico PAST versão 4.03.

Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Incorporação de derivados de porfirina com platina em *Aspergillus flavus*

Com os resultados dos cálculos da Lei de Lambert-Beer, no experimento com a população de  $10^6$  esporos obteve-se um valor de concentração de  $9,35 \times 10^{-6}$  M para as amostras do experimento com a porfirina 3PtTPyP e  $3,27 \times 10^{-6}$  M para as amostras do experimento com a porfirina 4PtTPyP (Figura 4). Esses valores diferem significativamente segundo o Teste t ( $p < 0,05$ ).

Já no experimento com população de  $10^7$  esporos a concentração foi de  $17,9 \times 10^{-6}$  M para as amostras do experimento com a porfirina 3PtTPyP e  $4,04 \times 10^{-6}$  M para as amostras do experimento com a porfirina 4PtTPyP (Figura 5), o que também é uma diferença significativa segundo o Teste t ( $p < 0,05$ ).

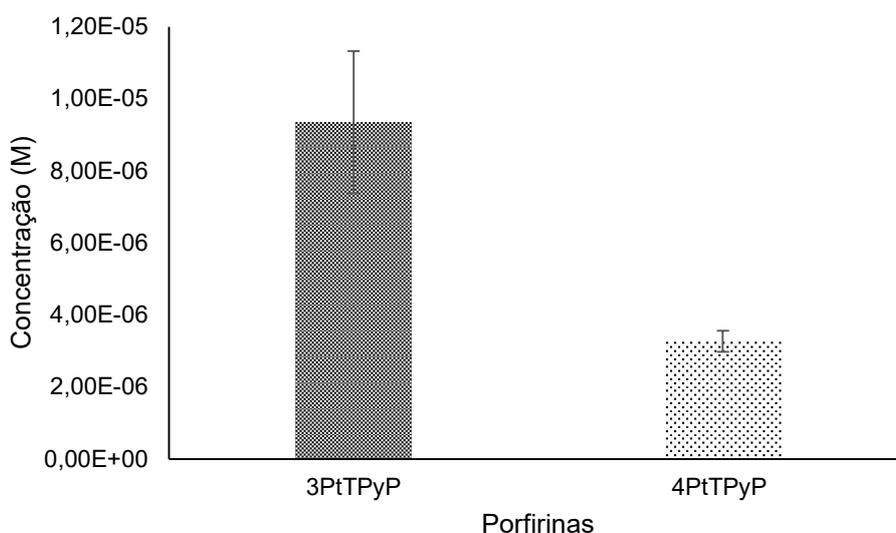


Figura 4 – Concentração de porfirina absorvida pela população de  $10^6$  esporos de *Aspergillus flavus* após incubação de 24 horas com  $100 \mu\text{M}$  de porfirina ( $n=3$ ).

Fonte: Autora.

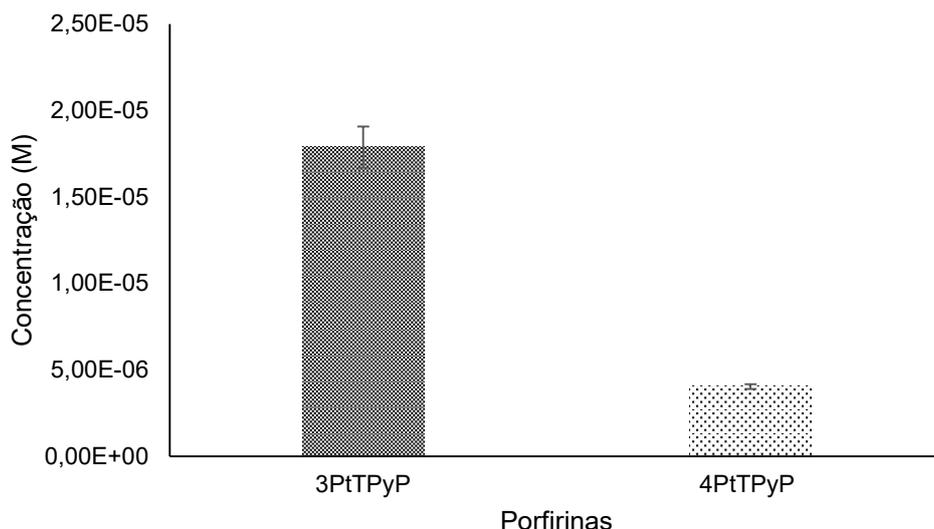


Figura 5 – Concentração de porfirina absorvida pela população de  $10^7$  esporos de *Aspergillus flavus* após incubação de 24 horas com  $100 \mu\text{M}$  de porfirina ( $n=3$ ).

Fonte: Autora.

Essa grande diferença observada entre a incorporação das porfirinas pelo fungo nas duas populações pode ser explicada pelas características anfífilicas das moléculas em questão. A disposição do grupo piridil de forma mais assimétrica na conformação espacial da porfirina 3PtTPyP pode conferir uma maior polaridade à molécula, quando comparada à porfirina 4PtTPyP, que possui uma distribuição mais plana dos grupos piridil (TASSO et al., 2017).

Essa maior polaridade pode resultar em uma melhor interação entre as moléculas de porfirina e a parede celular do fungo, e conseqüentemente resultar em mais incorporação. Além disso, TASSO e colaboradores (2017) também verificaram que a porfirina 3PtTPyP é muito mais eficaz em gerar fotodano em membranas de células HeLa quando comparada ao seu isômero 4PtTPyP.

Em relação à população de esporos, nota-se que para uma maior população há uma maior incorporação de fotossensibilizador, ocorrendo para ambas as porfirinas, veja Figuras 3 e 4. Porém, para comparação dos valores de

concentração de porfirina incorporada por esporo (Figuras 6 e 7), nota-se uma maior incorporação na população de  $10^6$ .

A população de  $10^6$  esporos mostrou-se mais adequada para se utilizar nos demais experimentos, pois além dos fatores de incorporação mencionados acima, ofereceu também uma maior facilidade de manuseio das amostras e brancos pois não houve um crescimento excessivo de micélio.

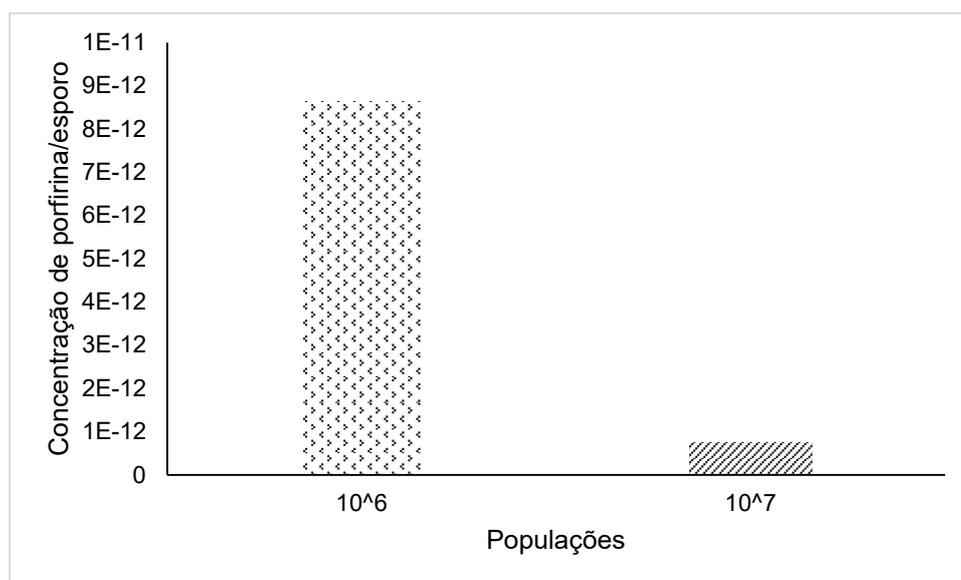


Figura 6 –Concentração de porfirina 3PtTPyP absorvida por esporo de *Aspergillus flavus* após incubação de 24 horas com 100  $\mu$ M de porfirina nas populações de  $10^6$  e  $10^7$  (n=3).

Fonte: Autora.

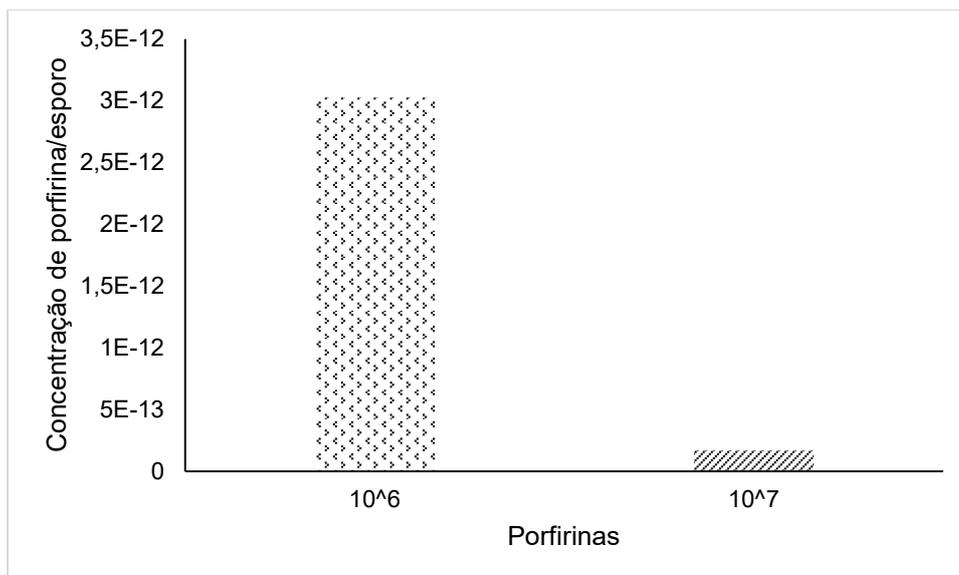


Figura 7 – Concentração de porfirina 4PtTPyP absorvida por esporo de *Aspergillus flavus* após incubação de 24 horas com 100  $\mu$ M de porfirina nas populações de  $10^6$  e  $10^7$  (n=3).

Fonte: Autora.

#### 4.2 Viabilidade de *Aspergillus flavus* incorporado com o fotossensibilizador com e sem incidência de luz

Através da Figura 8, que ilustra a evolução do crescimento das colônias do experimento com a porfirina 3PtTPyP e dose de luz de  $10\text{J}/\text{cm}^2$ , observamos que houve uma redução do crescimento do tratamento com FS + luz em relação aos demais tratamentos. Já no experimento com a porfirina 4PtTPyP com a mesma dose de luz, observamos uma sobreposição entre as linhas de crescimento de todos os tratamentos durante quase todos os dias (Figura 9).

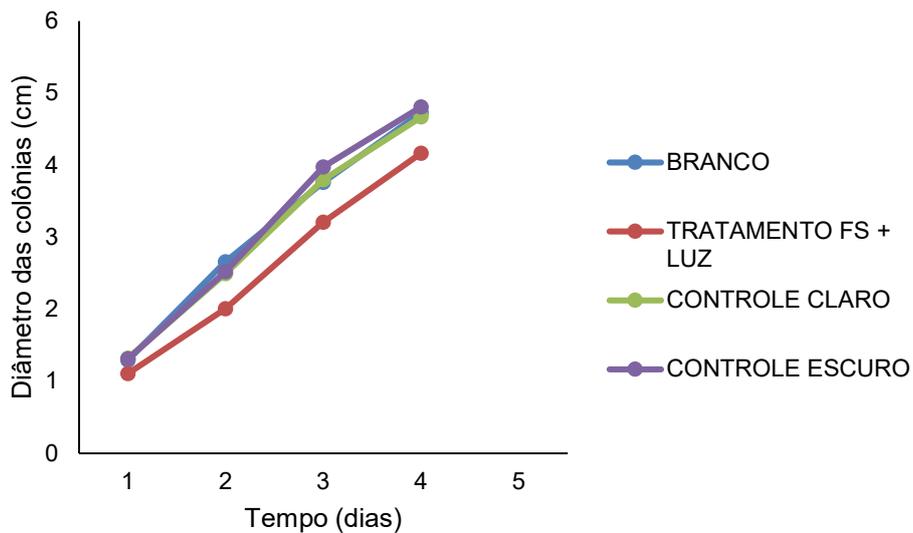


Figura 8 – Evolução do crescimento do diâmetro das colônias ao longo dos dias no experimento com a porfirina 3PtTPyP [100  $\mu$ M] e dose de luz de 10J/cm<sup>2</sup> (n=3).

Fonte: Autora.

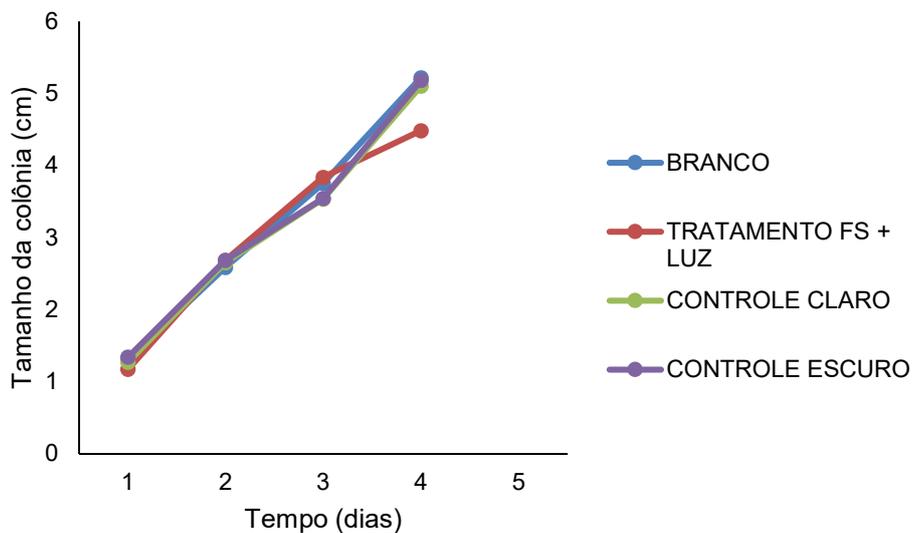


Figura 9 – Evolução do crescimento do diâmetro das colônias ao longo dos dias no experimento com a porfirina 4PtTPyP [100  $\mu$ M] e dose de luz de 10J/cm<sup>2</sup> (n=3).

Fonte: Autora.

Para a dose de luz de 50J/cm<sup>2</sup> observamos uma diferença mais acentuada entre o tratamento com FS + luz e demais tratamentos nos experimentos

com a porfirina 3PtTPyP (Figura 10). Já nos experimentos com a porfirina 4PtTPyP, novamente verificou-se uma sobreposição entre as linhas de crescimento dos diferentes tratamentos em quase todos os dias (Figura 11).

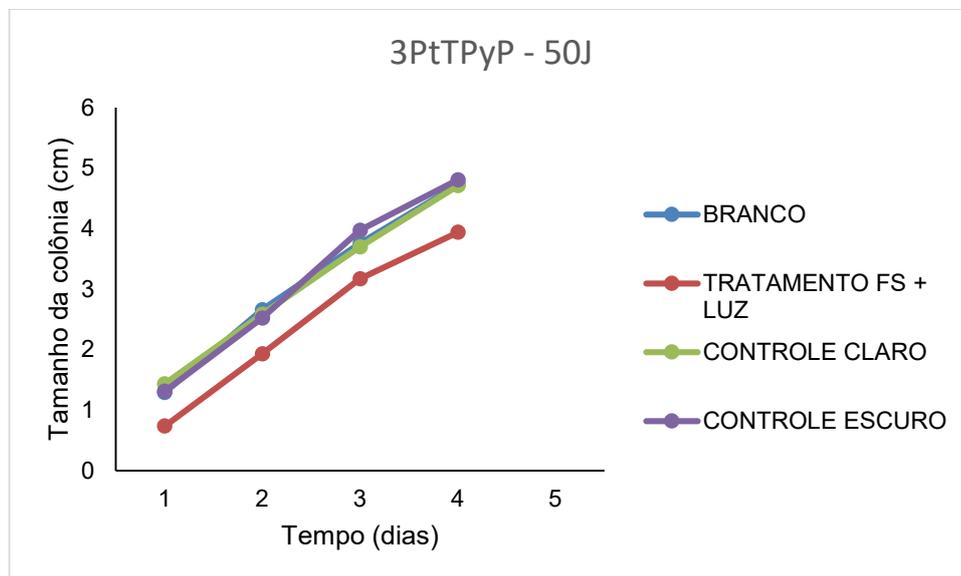


Figura 10 – Evolução do crescimento do diâmetro das colônias ao longo dos dias no experimento com a porfirina 3PtTPyP [100  $\mu$ M] e dose de luz de 50J/cm<sup>2</sup> (n=3).

Fonte: Autora.

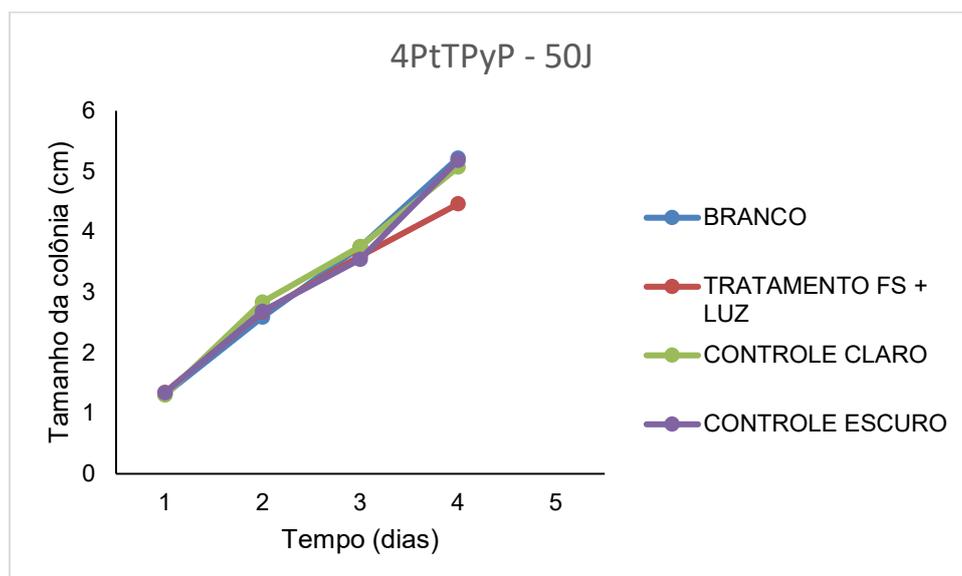


Figura 11 – Evolução do crescimento do diâmetro das colônias ao longo dos dias no experimento com a porfirina 4PtTPyP [100  $\mu$ M] e dose de luz de 50J/cm<sup>2</sup> (n=3).

Fonte: Autora.

No experimento com dose de luz de 50J/cm<sup>2</sup> observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias de IVCM (Tabela 1) e ICM (Tabela 2) do experimento com a porfirina 3PtTPyP. Já com a dose de luz de 10J/cm<sup>2</sup>, para ambas as porfirinas, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), embora tenha sido observado um menor tamanho do diâmetro das colônias do tratamento com FS + luz do experimento com a porfirina 3PtTPyP em relação aos demais tratamentos.

Tabela 1 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) do IVCM de *Aspergillus flavus* obtidos nos diferentes grupos de tratamento no experimento com dose de luz 50J/cm<sup>2</sup>.

Fotossensibilizador	L <sup>+</sup> F <sup>+</sup>	L <sup>+</sup> F <sup>-</sup>	L <sup>-</sup> F <sup>+</sup>	L <sup>-</sup> F <sup>-</sup>
3PtTPyP	2,309a $\pm$ 0,480	3,227b $\pm$ 0,155	3,173b $\pm$ 0,120	3,181b $\pm$ 0,162
4PtTPyP	3,140a $\pm$ 0,096	3,347a $\pm$ 0,067	3,318a $\pm$ 0,137	3,288a $\pm$ 0,103

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) do ICM de *Aspergillus flavus* obtidos nos diferentes grupos de tratamento no experimento com dose de luz 50J/cm<sup>2</sup>.

Fotossensibilizador	L <sup>+</sup> F <sup>+</sup>	L <sup>+</sup> F <sup>-</sup>	L <sup>-</sup> F <sup>+</sup>	L <sup>-</sup> F <sup>-</sup>
3PtTPyP	3,120a $\pm$ 0,748	4,515b $\pm$ 0,235	4,473b $\pm$ 0,202	4,431b $\pm$ 0,253
4PtTPyP	4,374a $\pm$ 0,128	4,615a $\pm$ 0,091	4,537a $\pm$ 0,234	4,540a $\pm$ 0,132

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Através dos dados apresentados nas tabelas, nota-se que, para o IVCM e

ICM, nos experimentos com a porfirina 3PtTPyP, os valores do tratamento com luz + luz (L<sup>+</sup>F<sup>+</sup>) diferem significativamente de todos os demais tratamentos. Já nos experimentos com a porfirina 4PtTPyP, não há diferença significativa entre os valores de nenhum dos tratamentos.

A diferença não significativa entre o IVCM e ICM do controle escuro (L<sup>-</sup>F<sup>+</sup>) e branco (L<sup>-</sup>F<sup>-</sup>) para as duas porfirinas (Tabelas 1 e 2) indica uma baixa citotoxicidade dos compostos porfirínicos avaliados. A baixa citotoxicidade destes isômeros no escuro também foi observada por Lopes e colaboradores (2019), com incubação de 24 horas de 2 µg/mL do isômero *para* em experimentos com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Klebsiella pneumoniae*. Já em experimentos com diferentes espécies de micobactérias, Rossi e colaboradores (2020), observaram que a concentração inibitória mínima das porfirinas 3PtTPyP e 4PtTPyP é de 93,75 µg/mL.

A exposição à luz sozinha não causou um impacto significativo nas colônias estudadas, o que também foi constatado por Gonzales et al. (2010) e Gomes et al. (2011), em estudos com conídios de *Metarhizium anisopliae* e dose de luz de 20 J/cm<sup>2</sup> e *Penicillium chrysogenum*, com dose de luz de 240 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

A maior eficiência do isômero *meta* 3PtTPyP quando comparado ao isômero *para* 4PtTPyP na inativação de microrganismos também foi observada por ROSSI et al. (2020) em estudos com micobactérias (concentração de porfirina de 375 µg/mL e dose de luz de 270 J/cm<sup>2</sup>) e BASSO et al. (2019) em estudos com vírus bovinos, com dose de luz de 90 J/cm<sup>2</sup> e concentração de porfirina de 0,91 µM. Além disso, TASSO et al. (2017) observaram que a porfirina 4PtTPyP necessita de uma concentração duas vezes maior do que a porfirina 3PtTPyP para obter as mesmas

taxas de morte celular em experimentos com células HeLa e dose de luz de 1 J/cm<sup>2</sup>.

Através dos resultados observamos que a porfirina 3PtTPyP (*meta*) possui uma maior capacidade de inibir o crescimento do fungo, comparada à 4PtTPyP (*para*). Além das diferenças nas taxas de incorporação dos isômeros pelas células do fungo *A. flavus* relatadas neste trabalho esses compostos também diferem entre si na eficiência quântica de conversão para tripleto, sendo o isômero *meta* mais eficiente nesse quesito (COCCA, 2017). Esse fator afeta diretamente o mecanismo de ação da terapia de fotoinativação, que envolve uma transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no estado tripleto e um substrato (HAMBLIN & JORI, 2015).

## 5 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que os isômeros *meta* (3PtTPyP) e *para* (4PtTPyP) apresentam diferentes características frente ao fungo *Aspergillus flavus*. Como mencionado anteriormente, o isômero *meta* possui características moleculares espaciais que lhe conferem uma maior polaridade comparado ao isômero *para* (TASSO et. al, 2017), portanto, esse aumento de polaridade pode conferir uma vantagem ao adentrar células fúngicas, que possuem parede celular composta em grande parte por polissacarídeos, moléculas polares (TORTORA et al., 2012). Isso pode explicar as diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) nas taxas de incorporação das porfirinas, sendo a porfirina 3PtTPyP mais incorporada pelo fungo.

Além disso, pode-se observar que, ao realizar os cálculos de incorporação de porfirina por esporo, a população de  $10^6$  esporos possui uma maior taxa de incorporação quando comparada com a de  $10^7$  esporos. Ademais, a população de  $10^6$  oferece maior praticidade de manuseio das amostras e brancos pois não há crescimento excessivo de micélio.

Nos experimentos com o fungo incorporado com o fotossensibilizador com incidência de luz, observou-se que nos tratamentos de FS + luz contendo o isômero *meta* houve diminuição do crescimento do fungo em ambas as doses de luz avaliadas ( $10 \text{ J/cm}^2$  e  $50 \text{ J/cm}^2$ ). Porém, avaliando o ICM e IVCM, só há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no experimento com a dose de  $50 \text{ J/cm}^2$ . No experimento com o isômero *para*, não houve diferença significativa entre nenhum dos tratamentos ( $p > 0,05$ ). As diferenças na eficiência quântica de conversão para tripleto podem ter afetado o desempenho do isômero *para* na inativação

fotodinâmica.

A respeito da citotoxicidade no escuro, conclui-se que as porfirinas estudadas apresentam baixa toxicidade na concentração de 100  $\mu\text{M}$  contra o fungo *Aspergillus flavus*, já que seus respectivos controles escuros obtiveram valores de ICM e IVCM similares e sem diferença significativa do branco ( $p > 0,05$ ).

A respeito da toxicidade da luz, observou-se que o tratamento apenas com a luz não causa diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no ICM e IVCM do fungo quando comparado aos índices do branco.

Com isso, conclui-se que o isômero *meta* 3PtTPyP possui um bom potencial de inativação fotodinâmica na dose de  $50\text{J}/\text{cm}^2$  e novos estudos devem ser realizados para aprimorar esse tratamento.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-KADER, Mahmoud H. **Photodynamic therapy. From theory to application**. 1. ed. Berlim: Springer, 2014.

ALVES, Eliana; FAUSTINO, Mariana AF; NEVES, Maria GPMS; CUNHA, Angela; TOMÉ, João; ALMEIDA, Adelaide. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 2, p. 141-164, 2014.

ALVES, Jorge F.S. **Porfirinas e Terapia Fotodinâmica em Neoplasias**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

AMAIKE, Saori; KELLER, Nancy P. *Aspergillus flavus*. **Annual review of phytopathology**, v. 49, p. 107-133, 2011.

BASSO, Giovana; CARGNELUTTI, Juliana F.; OLIVEIRA, Amanda L.; ACUNHA, Thiago V.; WEIBLEN, Rudi; FLORES, Eduardo F.; IGLESIAS, Bernardo A. Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-platinated porphyrins. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 23, n. 09, p. 1041-1046, 2019.

BEIRAO, Sandra; FERNANDES, Sara; COELHO, Joel; FAUSTINO; Maria A. F.; TOME, João P. C.; NEVES, Maria. G. P. M. S.; TOMÉ, Augusto C.; ALMEIDA, Adelaide; CUNHA, Angela. Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. **Photochemistry and photobiology**, v. 90, n. 6, p. 1387-1396, 2014.

BRITO, Rychaellen S.; ALVES, William F. A. F.; MOREIRA, José G. V. Avaliação do efeito da inibição da antracnose do maracujazeiro com a utilização do óleo de Pupunha (*Bactris gasipaes*). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 2, 2017.

COCCA, Leandro H. Z. **Efeitos fotofísicos em moléculas de Porfirina e Ftalocianina: uma relação entre geometrias e substituintes**. 2017. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

COCCA, Leandro H.Z.; GOTARDO, Fernando; SCIUTI, Lucas F.; ACUNHA, Thiago V.; IGLESIAS, Bernardo A.; BONI, Leonardo. Investigation of excited singlet state absorption and intersystem crossing mechanism of isomeric meso-tetra (pyridyl) porphyrins containing peripheral polypyridyl platinum (II) complexes. **Chemical Physics Letters**, v. 708, p. 1-10, 2018.

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340-348, 1991.

DONNELLY, Ryan F.; MCCARRON, Paul A.; TUNNEY, Michael M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.

GHORBANI, Jaber; RAHBAN, Dariush; AGHAMIRI, Shahin; TEYMOURI, Alireza; BAHADOR, Abbas. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. **Laser therapy**, v. 27, n. 4, p. 293-302, 2018.

GOMES, Maria C.; WORANOVICZ-BARREIRA, Sandra M.; FAUSTINO, Maria A. F.; FERNANDES, Rosa; NEVES, Maria G. P. M. S.; TOMÉ, Augusto C.; GOMES, Newton C. M.; ALMEIDA, Adelaide; CAVALEIRO, José A. S.; CUNHA, Ângela; TOMÉ, João P. C. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 11, p. 1735-1743, 2011.

GONZALES, Fernanda P.; FELGENTRÄGER, Ariane; BÄUMLER, Wolfgang; MAISCH, Tim. Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. **Future microbiology**, v. 8, n. 6, p. 785-797, 2013.

GONZALES, Fernanda P.; SILVA, Sérgio H.; ROBERTS, Donald W.; BRAGA, Gilberto U. L. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. **Photochemistry and photobiology**, v. 86, n. 3, p. 653-661, 2010.

HAMBLIN, Michael R.; HASAN, Tayyaba. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HAMBLIN, Michael R.; JORI, Giulio. **Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications**. 1 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015.

HEDAYATI, Mohammad T.; PASQUALOTTO, Alessandro C.; WARN, Peter; BOWYER, Paul; DENNING, David. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 2007.

KRISHNAN, Suganthini; MANAVATHU, Elias K.; CHANDRASEKAR, Pranatharthi H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 206-222, 2009.

LÓ, Stephanie M. S.; BARREIRA, Sandra M. W.; GONÇALVES, Alan G.; TOMÉ, João P. C. "Foto-antibióticos"-a luz na fotoinativação de micro-organismos. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 390-402, 2015.

LOPES, Leonardo Q. S.; RAMOS, Andiará P.; COPETTI, Priscila M.; ACUNHA, Thiago V.; IGLESIAS, Bernardo A.; SANTOS, Roberto C.V.; MACHADO, Alencar K.; SAGRILLO, Michele R. Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra (4-pyridyl) platinum (II) porphyrin. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 47-54, 2019.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel

H.; STAHL, David A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

MAISCH, Tim; BOSL, Claudia; SZEIMIES, Rolf-Markus; LEHN, Norbert; ABELS, Christoph. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1542-1552, 2005.

MCDONAGH, Antony F. Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. **Journal of Perinatology**, v. 21, n. 1, p. S7-S12, 2001.

NUNEZ, Silvia; GARCEZ, Aguinaldo S.; RIBEIRO, Martha S. **PDT-Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. São Paulo: Elsevier, 2015.

OLHER, Maria Luz D.R.; PEREIRA, Danielle C.S.; MARTINS, Eliane M.F.; CAMPOS, André N.R. Controle in vitro do crescimento micelial e da germinação de conídios de *Botrytis cinerea* por metabólitos e extratos de *Pisolithus microcarpus*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 15008-15025, 2021.

REVANKAR, Sanjay G. **Antifúngicos**. Manual Merck On-line. Disponível em: [https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as%20infecciosas/fungos/antif%C3%BAngicos#v1011978\\_pt](https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as%20infecciosas/fungos/antif%C3%BAngicos#v1011978_pt). Acesso em 22 de abril de 2021.

RKEIN, Ali M.; OZOG, David M. Photodynamic therapy. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, p. 415-425, 2014.

ROSSI, Grazielle G.; GUTERRES, Kevim B.; SILVEIRA, Carolina H.; MOREIRA, Kelly S.; BURGO, Thiago A. L.; IGLESIAS, Bernardo A.; CAMPOS, Marli M.A. Peripheral tetra-cationic Pt (II) porphyrins photo-inactivating rapidly growing mycobacteria: First application in mycobacteriology. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104455, 2020.

SIMPLICIO, Fernanda Ibanez; MAIONCHI, Florângela; HIOKA, Noboru. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002.

TASSO, Thiago T.; TSUBONE, Tayana M.; BAPTISTA, Maurício S.; MATTIAZZI, Lia M.; ACUNHA, Thiago V.; IGLESIAS, Bernardo A. Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 33, p. 11037-11045, 2017.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2012.

WAINWRIGHT, Mark; MAISCH, Tim; NONELL, Santi; PLAETZER, Kristjan; ALMEIDA, Adelaide; TEGOS, George P.; HAMBLIN, Michael R. Photoantimicrobials—are we afraid of the light?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e49-e55, 2017.