



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
2008

**Anabela Amorim Inactivação de endósporos bacterianos com  
de Oliveira fotossensibilizadores porfirínicos**





**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
**2008**

**Anabela Amorim de Oliveira** **Inactivação de endósporos bacterianos com fotossensibilizadores porfirínicos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ângela Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.



## **o júri**

Presidente do Júri:

**Doutor António Carlos Matias Correia**

Professor Auxiliar com Agregação

Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogais:

**Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino**

Professora Auxiliar

Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Maria Ângela de Sousa Dias Alves Cunha** (orientadora)

Professora Auxiliar

Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



## agradecimentos

À Professora Ângela Cunha, orientadora da dissertação, pela disponibilidade e auxílio permanentes que me prestou em todos os momentos da concretização deste trabalho.

Às professoras Adelaide Almeida e Amparo Faustino pela disponibilidade em colaborarem neste trabalho com sugestões muito pertinentes. À Professora Adelaide Almeida também pela ajuda na preparação e observações microscópicas realizadas no TEM.

À Professora Salomé Almeida pela ajuda na preparação e observações microscópicas realizadas no SEM.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ambiental, que desde o início me acolheram e prestaram ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Grupo de Química pela produção das porfirinas, pelas leituras de fluorescência envolvidas na quantificação de material porfirínico adsorvido aos endósporos e pela cedência do sistema de iluminação.

À Universidade de Aveiro, FCT e FEDER pelo financiamento da Unidade de Investigação de Química Orgânica.

Ao CESAM pelo financiamento do Grupo Ecossistemas Marinhos e Modelação.

Ao Projecto POCI/CTM/58183/2004 pelo financiamento parcial do trabalho experimental.





**palavras-chave**

*PACT, inativação fotodinâmica, endósporos bacterianos, fotossensibilizadores porfirínicos*

**resumo**

A formação de endósporos é uma estratégia de sobrevivência apresentada por algumas bactérias que envolve a formação de um invólucro com várias camadas muito resistentes a danos provocados pelo calor, radiações e químicos. As bactérias produtoras de endósporos são extremamente resistentes a técnicas de desinfecção solar e fotocatalítica.

Os derivados porfirínicos produzem espécies reactivas de oxigénio na presença de luz e oxigénio molecular, o que pode constituir uma abordagem interessante na inativação dos endósporos bacterianos altamente resistentes.

O objectivo deste trabalho foi avaliar o potencial de derivados porfirínicos na fotoinativação de endósporos produzidos por espécies do género *Bacillus* e também das células vegetativas correspondentes. *Bacillus cereus* foi usado como modelo biológico, por ser estruturalmente mais semelhante a *B. anthracis*, tendo sido também testadas outras espécies do género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. liqueniformis* e *B. sphaericus*), menos críticas do ponto de vista da biosegurança. Foram utilizados vários derivados porfirínicos diferindo no número de cargas positivas e nos grupos de meso-substituição. O corante Azul de Toluidina (fenotiazina) foi também testado como fotossensibilizador de referência para endósporos bacterianos.

Suspensões puras de endósporos foram irradiadas, após pré-exposição no escuro a concentrações de 0.5-60  $\mu\text{M}$  de fotossensibilizador. A cinética de irradiação foi avaliada a partir da quantificação do teor de UFC em alíquotas recolhidas no início da experiência e durante a irradiação. Em todas as experiências foi incluído um controle claro, irradiado sem fotossensibilizador e um controle escuro, adicionado da concentração máxima de fotossensibilizador, mas resguardado da luz.

Os resultados obtidos demonstraram que as porfirinas neutras, monocatiónicas e dicatiónicas são ineficazes na inativação de endósporos de *B. cereus* (< 1 unidade logarítmica de redução).

O derivado porfirínico mais eficaz na inativação de endósporos foi a

molécula tricatiónica com um grupo *meso*-pentafluorofenilo (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF), tendo sido atingida uma redução de 3.5 unidades logarítmicas (log) na concentração de 0.5 µM de porfirina, após 4 minutos de irradiação (40.7 J/cm<sup>2</sup>). Com as porfirinas tetracatiónica e tricatiónica com um grupo carboxilo também se observou uma redução da concentração de endósporos viáveis em mais de 3 log. Estes resultados correspondem à mesma ordem de grandeza da inactivação obtida com 60 µM de Azul de Toluidina (TBO).

Com endósporos de outras espécies de *Bacillus*, as porfirinas tri e tetracatiónicas causaram redução inferior a 1 log na concentração de endósporos viáveis.

Com condições experimentais semelhantes, os derivados tricatiónicos e tetracatiónicos causaram a redução de 5 a 7 log na concentração de células vegetativas de *B. cereus* e reduções de 2 a 5 log em *B. subtilis*, *B. liqueniformis* e *B. sphaericus*.

Nenhum dos produtos testados apresentou toxicidade na ausência de luz.

Os resultados permitem concluir que a modificação estrutural dos fotossensibilizadores porfirínicos melhora significativamente a sua capacidade de fotoinactivação, sendo por isso, compostos promissores para aplicação na desinfecção de tecidos vivos, materiais contaminados e águas residuais.

**keywords** *PACT, photodynamic inactivation, bacterial endospores, photosensitizer, porphyrin derivatives*

**abstract**

The formation of bacterial endospores is a survival strategy of some bacteria that implies the formation of an involucre composed by several highly resistant layers that increases their resistance to damage caused by heat, radiation and chemicals. Endospore-producing bacteria are extremely resistant to solar and photocatalytic disinfection techniques. Porphyrin derivatives produce reactive oxygen species in the presence of light and molecular oxygen, and can be regarded as an interesting approach for the inactivation of highly resistant bacterial endospores.

This work aims to evaluate the potential of porphyrin derivatives for the photodynamic inactivation (PDI) of endospores and vegetative cells produced by different species of *Bacillus*. *Bacillus cereus* was included as a model for *B. anthracis* and the other species tested were *B. subtilis*, *B. liqueniformis* and *B. sphaericus*. Several porphyrin derivatives, differing in the number of positive charges and in the meso-substituent groups were tested. The phenothiazin dye toluidin blue O was also tested as a reference photosensitizer for bacterial endospores. Pure suspensions of bacterial endospores were irradiated, after pre-incubation in the dark with concentrations of 0.5-60  $\mu\text{M}$  of photosensitizer. The kinetics of irradiation was evaluated by the quantification of CFU in aliquots collected at the beginning of the experiment and during the irradiation. A light-control irradiated without photosensitizer and a dark control with the maximum concentration of photosensitizer but protected from light, were included in all the experiments.

Neutral, monocationic and dicationic porphyrins were relatively ineffective in the inactivation of *B. cereus* endospores (<1 log unit reduction). The most effective porphyrin derivative for the inactivation of endospores was the tricationic porphyrin with a meso-pentafluorophenyl group. With this photosensitizer, at 0.5  $\mu\text{M}$ , a reduction of 3.5 log units occurs after only 4 minutes of irradiation (40.7  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Reductions of more

than 3 log units of the concentration of viable endospores were also obtained with the tetracationic porphyrin and the tricationic porphyrin with a carboxyl group. These results correspond to the same order of magnitude of inactivation obtained with 60  $\mu$ M of toluidin blue O (TBO). With endospores of other *Bacillus* species, the tri and tetra-cationic porphyrin derivatives caused small reductions ( $< 1$  log) in the concentration of viable endospores. Under identical conditions, tricationic and tetracationic derivatives caused reductions of 5 to 7 log in the concentration of *B. cereus* vegetative cells and reductions of 2 to 5 log units in suspensions of *B. subtilis*, *B. liqueniformis* e *B. sphaericus* cells. None of the porphyrin derivatives showed toxicity in the absence of light.

The results show that the structural changes in porphyrin derivatives can improve significantly their potential as photosensitizers for the inactivation of bacterial endospores and should be considered as interesting compounds to use in the disinfection of live tissues, contaminated materials and residual waters.

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS .....	xxi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. Endósporos bacterianos .....	1
2. Endósporos em espécies do género <i>Bacillus</i> .....	4
3. Processo de esporulação .....	5
4. Endósporos e actividades humanas.....	7
5. Inactivação de endósporos .....	8
6. Fototerapia, efeito fotodinâmico e terapia fotodinâmica .....	9
7. Abordagem fotodinâmica em tratamentos antimicrobianos- PACT.....	11
8. Fotossensibilizadores e mecanismos de actuação.....	13
9. Inactivação de células bacterianas .....	16
10. Porfirinas como fotossensibilizadores em PDI de endósporos .....	18
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
1. Fotossensibilizadores .....	21
2. Material biológico.....	23
2.1. Condições de cultura e preparação das suspensões-stock de endósporos .....	23
2.2. Condições de cultura e preparação das suspensões de células vegetativas .....	24
2.3. Controle do material biológico .....	24
2.3.1. Pureza da cultura de <i>B.cereus</i> .....	24
2.3.2. Teor residual de células vegetativas .....	24
2.3.3. Germinação durante a experiência.....	25
3. Fontes de luz .....	25
4. Montagens experimentais .....	26
4.1. Optimização do protocolo de fotoinactivação dos endósporos.....	26
4.1.1. Experiências preliminares de irradiação em luminária.....	26
4.1.2. Experiências preliminares de irradiação com luz solar.....	27
4.1.3. Experiências preliminares de irradiação com fibra óptica.....	27
4.1.3.1. Irradiação contínua.....	27
4.1.3.2. Irradiação descontínua .....	28
4.2. Experiências padronizadas de fotoinactivação de endósporos .....	28
4.2.1. Cinética de inactivação .....	28
4.2.2. Estimativa da adsorção de fotossensibilizador aos endósporos .....	29
4.2.3. Detecção de alterações morfológicas (TEM e SEM).....	30
4.3. Experiências de fotoinactivação de células vegetativas.....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	33
1. Experiências de inactivação de endósporos de <i>Bacillus cereus</i> .....	33
1.1. Qualidade do material biológico .....	33
1.2. Experiências preliminares com luminária e com luz solar .....	33
1.3. Irradiação descontínua e irradiação contínua com fibra óptica .....	34
1.4. Experiências com luz de fibra óptica e irradiação contínua .....	34
1.4.1. Experiências com 10 a 60 µM de fotossensibilizador (gama alta) .....	34
1.4.2. Experiências com 0.5 a 5 µM de fotossensibilizador (gama baixa) .....	36

1.5. Alterações morfológicas resultantes do efeito fotodinâmico sobre os endósporos de <i>Bacillus cereus</i> (TEM e SEM).....	37
1.6. Adsorção do PS pelos endósporos de <i>Bacillus cereus</i> .....	38
2. Inativação de endósporos de outras espécies do género <i>Bacillus</i> com TBO e fotossensibilizadores porfirínicos.....	39
2.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	39
2.2. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	40
2.3. <i>Bacillus sphaericus</i> .....	41
3. Inativação de células vegetativas de espécies do género <i>Bacillus</i> com TBO e fotossensibilizadores porfirínicos.....	42
3.1. <i>Bacillus cereus</i> .....	42
3.2. <i>Bacillus subtilis</i> .....	43
3.3. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	45
3.4. <i>Bacillus sphaericus</i> .....	46
<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
Anexo I .....	67
Anexo II .....	75

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> - Imagem de uma célula vegetativa contendo um endósporo. ( <a href="http://tidepool.st.usm.edu/crswr/endospore.html">http://tidepool.st.usm.edu/crswr/endospore.html</a> ) .....	1
<b>Figura 2</b> - Estrutura do endósporo evidenciando as várias camadas que o constituem. A espessura das várias camadas varia entre espécies. O exospório não está presente em todas as espécies ( <a href="http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C11/">http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C11/</a> ). .....	1
<b>Figura 3</b> - Endósporos de <i>B. cereus</i> ATCC 14579 observados ao SEM, evidenciando a estrutura do exospório (Hornstra et al., 2006) .....	2
<b>Figura 4</b> - Endósporos centrais (A), terminais (B) e subterminais (C) ( Madigan e Martinko, 2006) .....	4
<b>Figura 5</b> - Imagem das alterações estruturais da célula bacteriana durante a esporulação (Adaptado Madigan e Martinko, 2006).....	5
<b>Figura 6</b> - Estrutura da porfirina .....	13
<b>Figura 7</b> - Estrutura da ftalocianina .....	14
<b>Figura 8</b> - Estrutura do psoraleno .....	15
<b>Figura 9</b> - Estrutura da hipericina .....	15
<b>Figura 10</b> - Mecanismo de acção do fotossensibilizador (P) na célula; P - fotossensibilizador; P1- estado excitado do fotossensibilizador após ter absorvido luz; <sup>1</sup> O <sub>2</sub> - singuleto de oxigénio (Adaptado de Luksiene, 2005) .....	16
<b>Figura 11</b> - Estrutura da parede das bactérias Gram positivas ( <a href="http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes/Eubacteria.htm">http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes/Eubacteria.htm</a> ).....	17
<b>Figura 12</b> - Estrutura da parede das bactérias Gram negativas ( <a href="http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes/Eubacteria.htm">http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes/Eubacteria.htm</a> ).....	17
<b>Figura 13</b> - Estrutura dos fotossensibilizadores testados .....	22
<b>Figura 14</b> - Sobrevivência de endósporos de <i>B. cereus</i> em ensaios de PDI com 10, 30 e 60 µM da porfirina Tetra-Py <sup>+</sup> -Me. A - Irradiação com luz artificial da luminária de intensidade 40 Wm <sup>-2</sup> . B - Irradiação com luz solar com uma intensidade de 80 Wm <sup>-2</sup> . —○— CC, —●— CE, —■— 10 µM, —▲— 30 µM, —◆— 60 µM.....	33
<b>Figura 15</b> - A - Sobrevivência de endósporos de <i>B. cereus</i> em ensaios de PDI com irradiação descontínua na presença de 60 µM de TBO. B - Sobrevivência de endósporos de <i>B. cereus</i> em ensaios de PDI com 10, 30 e 60 µM de corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa contínua de 1690 Wm <sup>-2</sup> . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. —○— CC, —●— CE, —■— 10 µM, —▲— 30 µM, —◆— 60 µM.....	34
<b>Figura 16</b> - Sobrevivência de endósporos de <i>B. cereus</i> em ensaios de PDI com 10, 30 e 60 µM das porfirinas Tri-Py-COOH, Mono- Py <sup>+</sup> -Me-COOH, Di-Py <sup>+</sup> -Me-COOH, Tri-Py <sup>+</sup> -Me-Ph. Irradiação com luz branca (400-800nm) de intensidade 1690 Wm <sup>-2</sup> . Os valores representados correspondem à média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. —○— CC, —●— CE, —■— 10 µM, —▲— 30 µM, —◆— 60 µM .....	35

**Figura 17** - Sobrevivência de endósporos de *B. cereus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e do corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) de intensidade 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores representados correspondem à média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ ..... 36

**Figura 18** - Sobrevivência de endósporos de *B. cereus* em ensaios de PDI com 0,5, 1 e 5  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 0,5  $\mu\text{M}$ , —▲— 1  $\mu\text{M}$ , —◆— 5  $\mu\text{M}$ ..... 37

**Figura 19** - Imagens de endósporos de *B. cereus* observados em SEM. Após cada tratamento: A - Controle claro; B - Endósporos expostos a 60  $\mu\text{M}$  de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF irradiados com luz branca (400-800 nm) de 1690  $\text{Wm}^{-2}$  durante 4 minutos ..... 38

**Figura 20** - Imagens de endósporos de *B. cereus* observados em TEM. A - Controle claro; B - Endósporos expostos a 60  $\mu\text{M}$  de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF irradiados com luz branca (400-800 nm) de 1690  $\text{Wm}^{-2}$  durante 4 minutos ..... 38

**Figura 21** - Sobrevivência de endósporos de *B. subtilis* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e do corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ ..... 39

**Figura 22** - Sobrevivência de endósporos de *B. licheniformis* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e do corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ ..... 40

**Figura 23** - Sobrevivência de endósporos de *B. sphaericus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ ..... 41

**Figura 24** - Sobrevivência de células vegetativas de *B. cereus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ ..... 43

**Figura 25** - Sobrevivência de células vegetativas de *B. subtilis* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ ..... 44

**Figura 26** - Sobrevivência de células vegetativas de *B. licheniformis* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o



corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690 Wm<sup>-2</sup>. Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10 μM, —▲— 30 μM, —◆— 60 μM..... 45

**Figura 27** - Sobrevivência de células vegetativas de *B. sphaericus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60 μM das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690 Wm<sup>-2</sup>. Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10 μM, —▲— 30 μM, —◆— 60 μM..... 46



## LISTA DE TABELAS

Página

**Tabela 1** - Quantidade de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me adsorvida a endósporos de *B. cereus* após incubação no escuro, durante 3 h a 37°C, na presença de 10, 30 e 60 μM de fotossensibilizador (moléculas de PS. UFC<sup>-1</sup>) ..... 39

**Tabela 2** - Valor máximo de fotoinativação de endósporos produzidos por espécies do género *Bacillus*, com compostos porfirínicos bem como o fotossensibilizador correspondente à inativação máxima ..... 42

**Tabela 3** - Valor máximo de fotoinativação de células vegetativas, de espécies do género *Bacillus*, com compostos porfirínicos bem como o fotossensibilizador correspondente à inativação máxima ..... 47



## LISTA DE ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\text{CaCl}_2$ ,	Cloreto de cálcio
CC	Controle claro
CE	Controle escuro
DPA	Ácido dipicolínico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	Food and Drug Administration
$\text{FeSO}_4$	Sulfato de ferro(II)
HpD	Hematoporfirina
KCl	Cloreto de potássio
log	Unidade logarítmica
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molar
$\text{MgSO}_4$	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de manganês tetra-hidratado
MYP	Mannitol egg yolk agar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PACT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
PBS	Tampão fosfato salino
PDI	Inativação fotodinâmica
PDT	Terapia fotodinâmica
PS	Fotossensibilizadores
rpm	Rotações por minuto
SASP	Small acid soluble proteins
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SEM	Microscópio electrónico de varrimento
SODIS	Solar water disinfection

SPC-DIS	Solar and Photocatalytic Disinfection
TBO	Azul de Toluidina O
TEM	Microscópio electrónico de transmissão
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titânio (IV)
Tris-HCl	Tris hidrocloreto
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
UFC	Unidade formadora de colónia
UV	Ultra-violeta







## INTRODUÇÃO

### 1. Endósporos bacterianos

A esporulação é um fenômeno de grande importância ecológica para certas espécies de bactérias. A produção de endósporos é um mecanismo protector que permite a sobrevivência das bactérias por longos períodos, sob condições extremas, como ausência de água e/ou nutrientes. São por isso, consideradas estruturas de resistência.

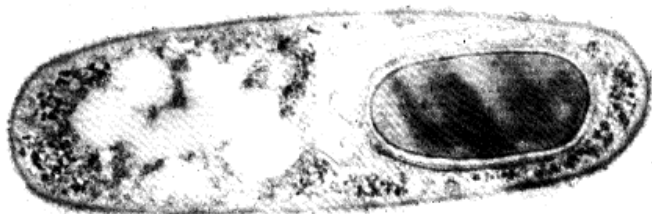


Figura 1 - Imagem de uma célula vegetativa contendo um endósporo  
(<http://tidepool.st.usm.edu/crswr/endospore.html>).

A descoberta dos endósporos bacterianos (Figura 1) data de 1838, tendo sido descritos por Ehrenberg como sendo corpos refractários à coloração, formados no interior de células bacterianas (Hornstra et al., 2006). Estudos,

feitos de modo independente por Cohn e Koch em 1876, demonstraram a resistência destas estruturas a temperaturas elevadas (100°C) e a sua germinação sob condições

diferentes das que tinham permitido a sua formação. Koch, em 1888, descreveu os principais acontecimentos envolvidos na esporulação e germinação de *Bacillus anthracis* (Hornstra et al., 2006). As investigações com endósporos registaram um acentuado desenvolvimento a partir de 1950, com a contribuição de vários laboratórios (Gould, 2006).

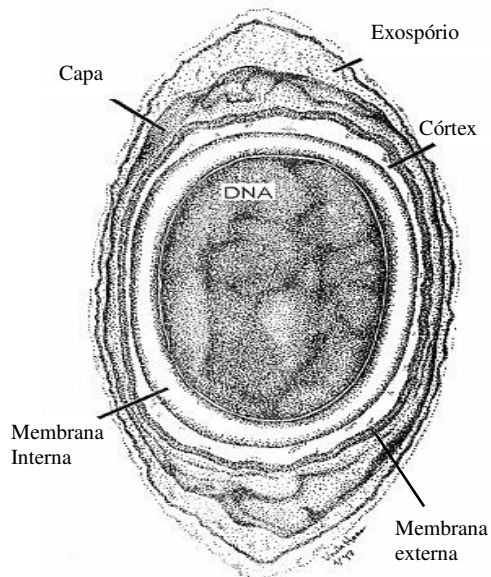


Figura 2 - Estrutura do endósporo evidenciando as várias camadas que o constituem. A espessura das camadas varia entre espécies. O exospório não está presente em todas as espécies (<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C11/>).

Os endósporos bacterianos têm uma estrutura complexa constituída por várias camadas protectoras altamente resistentes (Figura 2). O exospório constitui a camada mais externa do endósporo, embora não esteja presente em todas as espécies. É constituído

essencialmente por proteínas, água e hidratos de carbono. Quando presente, constitui a camada mais espessa do endósporo. Apresenta-se fracamente ligado à camada seguinte

e com a configuração de um sáculo ou balão (Figura 3) (Ohye et al., 1973). Possui uma camada basal paracristalina com proteínas (53%) e uma outra mais externa com prolongamentos ou filamentos de natureza glicoprotéica (20%), lípidos (18%) e resíduo seco (4%) (Gerhardt e Ribí, 1964). O exospório corresponde a cerca de 2% do peso seco do endósporo. A sua função é pouco conhecida, mas uma vez que ocorre nas espécies patogénicas e apresenta uma natureza hidrofóbica, poderá estar relacionado com a interacção com os organismos hospedeiros (Hornstra et al., 2006). A sua relação com a elevada resistência dos endósporos não está, no entanto, documentada (Dricks, 2003).

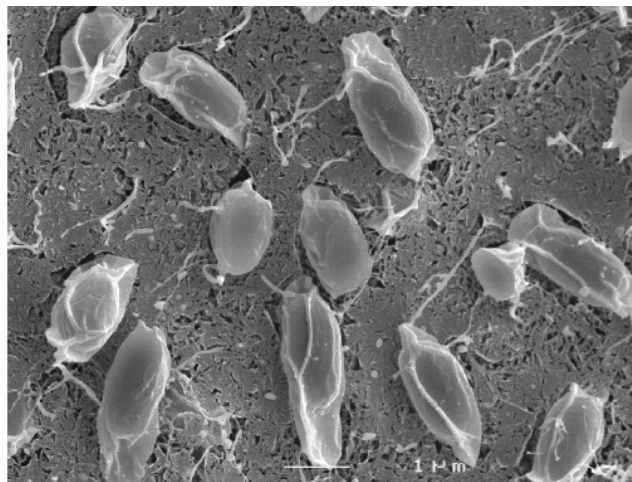


Figura 3 - Endósporos de *B. cereus* ATCC 14579 observados ao SEM, evidenciando a estrutura do exospório (Hornstra et al., 2006).

A capa é composta essencialmente por camadas de queratina e proteínas específicas inter cruzadas que conferem protecção contra enzimas hidrolíticas, como a lisozima, e também contra espécies reactivas de oxigénio, oxidantes químicos e solventes orgânicos (Dricks, 1999; Nicholson et al., 2000; Setlow et al., 2000). Admite-se também que seja importante na protecção e resistência durante a germinação, preservando a integridade contra agressões mecânicas e excluindo moléculas tóxicas de grandes dimensões. Ao mesmo tempo, permite que as pequenas moléculas penetrem e interactuem com receptores de germinação localizados no interior dos endósporos (Young e Setlow, 2004; Hornstra et al., 2006).

Para além do seu papel durante a germinação, a capa está envolvida em interacções ecológicas permitindo as alterações de volume (hipertrofia e hipotrofia), que acompanham as mudanças estruturais do endósporo durante a sua formação e a sua germinação (Dricks, 1999; Setlow et al., 2003). A espessura e o número de camadas de polipéptidos que a capa pode apresentar, é variável entre espécies (Dricks, 1999).

A função da membrana externa, entre o córtex e a capa não é ainda completamente conhecida, mas parece ser importante no processo de esporulação (Setlow et al., 2000). Esta membrana foi inicialmente considerada permeável. Contudo, resultados posteriores mostraram o contrário. Actualmente, admite-se que não deve funcionar como barreira já que foi experimentalmente demonstrado que a remoção desta

membrana e da capa, não afectava a resistência dos endósporos ao calor, a radiações e a agentes químicos (Nicholson et al., 2000; Setlow et al., 2000).

O córtex é composto por uma espessa camada de resíduos de ácido murâmico  $\delta$ -lactâmico, um peptidoglicano característico dos endósporos (Warth e Strominger, 1972). O grau de ligação cruzada das cadeias de peptidoglicano ao longo do córtex é variável entre as espécies e pode permitir uma maior expansão e contracção do endósporo em resposta a alterações iónicas do meio (Dricks, 2003). A formação do córtex durante o processo de esporulação, parece ser determinante na dormência do endósporo, bem como na sua resistência à destruição pelo calor (Atrih e Foster, 2001). Esta estrutura parece ainda ter um importante papel durante a germinação, uma vez que ao ser degradado permite a expansão do núcleo do endósporo (Nicholson et al., 2000). A constituição do córtex é muito estável de espécie para espécie (Atrih e Foster, 2001).

A separar o córtex da parte mais interna do endósporo, o núcleo, existe uma membrana interna que funciona como barreira selectiva e que aparenta ter um importante papel na primeira fase da germinação (Vepachedu e Setlow, 2007). A membrana interna apresenta poros ou canais que permitem, de um modo regulado, a libertação de cálcio e ácido dipicolínico (DPA), compostos envolvidos na activação das enzimas hidrolíticas que degradam o córtex durante o processo de germinação (Vepachedu e Setlow, 2007).

O núcleo do endósporo contém as estruturas que permitirão a formação da nova célula vegetativa: a parede celular (com peptidoglicano), a membrana citoplasmática, o nucleóide (material genético), enzimas e pequenas moléculas. O DPA é um composto característico dos endósporos e encontra-se no núcleo, sendo responsável pela diminuição da quantidade de água e o conseqüente aumento da resistência ao calor (Paidhungat et al., 2001). Este composto é produzido na célula vegetativa durante a esporulação e forma um complexo com catiões divalentes de cálcio, que constituem 5 a 15% do peso seco do endósporo (Hornstra et al., 2006). O mecanismo que torna o núcleo desidratado na fase final da esporulação não é ainda bem conhecido (Melly et al., 2002). O conteúdo de água do núcleo é cerca de 35 a 45% em comparação com o valor de 80% característico das células vegetativas, o que poderá explicar a elevada estabilidade das biomoléculas aí existentes e contribuir para a resistência dos endósporos (Setlow, 1994; Setlow et al., 2000). O pH do núcleo do endósporo é cerca de 6.3 a 6.5, o que é inferior ao pH do citoplasma das células vegetativas (Setlow e Setlow, 1980). As proteínas SASP (Small Acid Soluble Proteins) correspondem a cerca

de 3 a 6 % do total de proteínas do endósporo. Esta classe de proteínas é expressa no final da esporulação e protege o DNA durante a dormência do endósporo, tornando a sua estrutura mais estável e compacta (Setlow, 1995).

## 2. Endósporos em espécies do género *Bacillus*

*Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Thermoactinomyces* e *Sporosarcina* são alguns dos géneros bacterianos em que ocorrem genes de esporulação que levam ao desenvolvimento de alterações morfológicas das células vegetativas originando endósporos. Estes últimos podem ser classificados quanto à sua localização como centrais, terminais e subterminais (Figura 4).

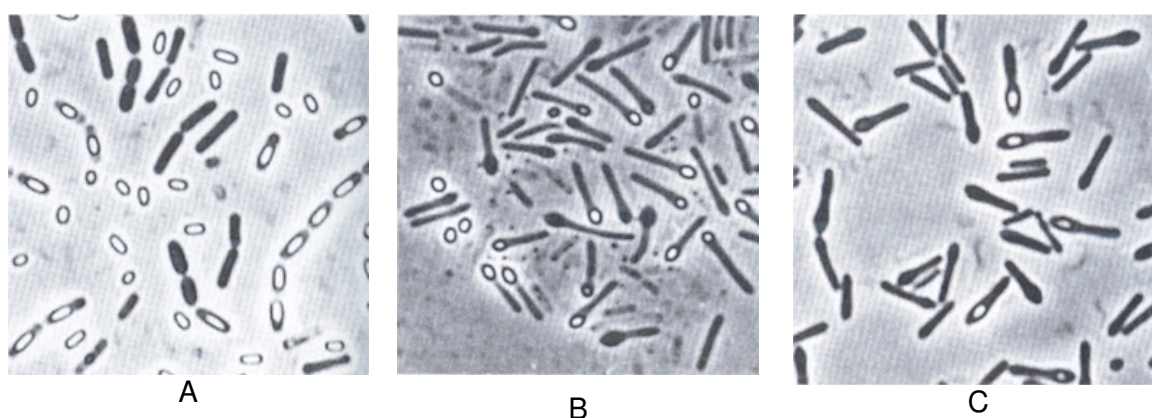


Figura 4 - Endósporos centrais (A), terminais (B) e subterminais (C) ( Madigan e Martinko, 2006).

O género *Bacillus*, utilizado neste trabalho como modelo biológico, agrupa bactérias Gram positivas, aeróbicas e anaeróbicas facultativas está bem representado no solo. A maioria das espécies é móvel e durante a esporulação produzem catalase, em condições aeróbicas. Sobrevivem em diferentes ambientes a temperaturas que variam dos 3°C aos 75°C, com uma gama de tolerância a pH entre 2 e 10 (Drobniewski, 1993).

Este género produz enzimas hidrolíticas extracelulares que têm a capacidade de degradar a maioria dos substratos provenientes de plantas e animais, como celulose, amido, pectina, proteínas, agar e outros hidratos de carbono (Madigan e Martinko, 2006).

Em algumas espécies é reconhecida a produção de antibióticos (*Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*), a nitrificação e desnitrificação (*Bacillus azotoformans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*), a fixação de azoto e o parasitismo (*Bacillus thuringiensis*) (Schnepf et al., 1998; Souto et al., 2004).

Como os solos são variáveis em termos de nutrientes, disponibilidade de água e temperatura, a esporulação para as bactérias que aí se desenvolvem, torna-se um processo fundamental em termos de sobrevivência.

### 3. Processo de esporulação

A formação de endósporos pode ser despoletada por condições nutricionais desfavoráveis como a falta de água ou fontes de carbono e/ou azoto. O processo de diferenciação dura cerca de 8 horas e inicia-se a partir da fase estacionária do crescimento bacteriano, distinguindo-se sete fases quanto ao desenvolvimento do endósporo (Figura 5). Durante o processo de esporulação ocorrem reacções complexas em cascata (Dricks, 2004).

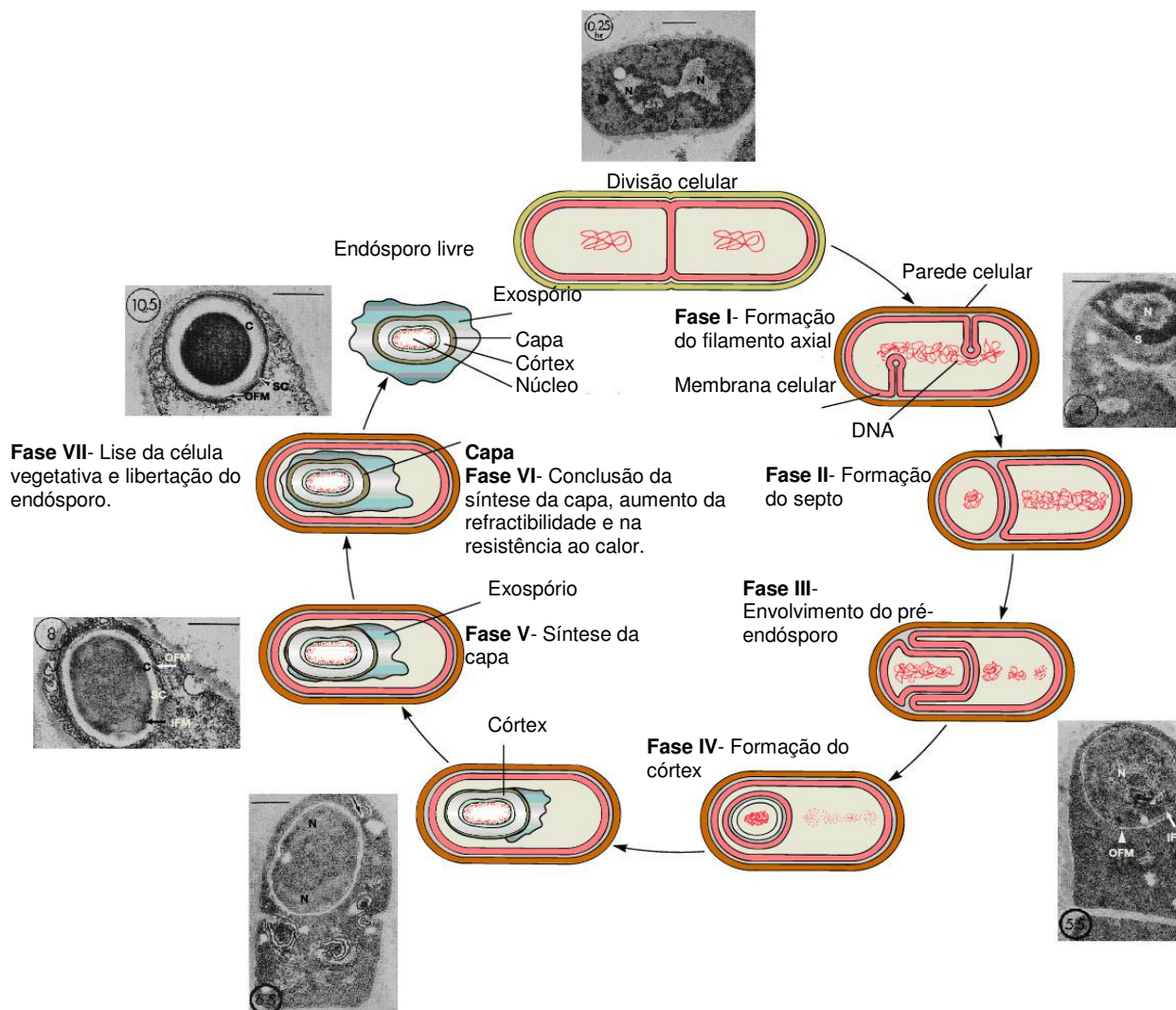


Figura 5 - Imagem das alterações estruturais da célula bacteriana durante a esporulação (Adaptado de Madigan e Martinko, 2006).

Na fase I ocorre a duplicação do DNA na célula vegetativa e o alongamento do

material nuclear formando um filamento axial.

A fase II caracteriza-se pela formação/invaginação da membrana citoplasmática com formação do septo assimétrico (que apresenta duas membranas) e a compartimentalização de uma das cópias do DNA e de uma pequena porção de citoplasma - o protoplasto.

Na fase III, o protoplasto é envolvido pela membrana da célula-mãe e forma o pré-endósporo.

Na fase IV, ocorre a formação do córtex entre as duas membranas. Também se forma uma parede celular germinativa que é uma camada espessa de peptidoglicano altamente ligada entre o córtex e o núcleo.

Na fase V, ocorre a formação das membranas (interna e externa), da capa de natureza protéica e do exospório.

Na fase VI é concluída a síntese da capa e ocorre a perda de água no núcleo, tornando-o mais resistente ao calor e mais refráctil. Nesta fase, observa-se o endósporo maduro sendo difícil a penetração dos fixadores usados em microscopia electrónica.

Na fase VII, a quantidade de água diminui e dá-se a libertação do endósporo por autólise da célula vegetativa, com a acção de autolisinas (Madigan e Martinko, 2006).

A elevada resistência dos endósporos permite que persistam ao longo do tempo geológico e a sobrevivência dos endósporos no espaço extra-terrestre tem sido também amplamente estudada (Nicholson, 2002).

Em 1995, foram isolados endósporos de *B. sphaericus* em amostras de âmbar com 25 a 40 milhões de anos (Cano e Borucki, 1995). No ano de 2000, foi isolado *Virgibacillus* sp. 2-9-3, uma bactéria halo-tolerante formadora de endósporos, em cristais de halite com 250 milhões de anos (Vreeland et al., 2000; Nicholson, 2002). Esta longevidade do endósporo pode relacionar-se com a protecção do material genético durante a fase de dormência e os mecanismos de reparação dos danos do DNA durante a germinação (Setlow, 1995; Nicholson et al., 2000).

Uma vez que os endósporos conservam o material genético das células que os originaram, podem germinar, em condições adequadas, voltando a originar células vegetativas idênticas.

O processo de germinação pode ser espontâneo, quando em condições favoráveis tais como a presença de nutrientes inorgânicos, aminoácidos e açúcares, ou ainda induzido por situações de *stresse* como o calor, a pressão hidrostática, o baixo pH, agentes químicos (mercaptoetanol, dodeciclamina, DPA-Ca<sup>2+</sup>) ou pelo armazenamento durante meses a 4°C ou à temperatura ambiente (Gould, 2006). É um processo rápido e

irreverssível que envolve a degradação do córtex e a excreção do dipicolinato de cálcio para o meio exterior por activação das autolisinas, ocorrendo também a degradação das SASP que permitem a libertação do DNA do endósporo (Paidhungat et al., 2001). A absorção de água e a síntese de DNA, RNA e proteínas também fazem parte do processo de germinação. A célula vegetativa é libertada por rebentamento das membranas e inicia-se o seu crescimento.

#### **4. Endósporos e actividades humanas**

Os endósporos bacterianos apresentam-se como entidades biológicas altamente resistentes e que sobrevivem a condições adversas que destruiriam as células bacterianas correspondentes. Estas estruturas apresentam, por isso, um impacto negativo em áreas como a saúde, a alimentação e o ambiente.

Em consequência da sua persistência e ubiquidade no ambiente, os endósporos bacterianos ocorrem como contaminantes alimentares. O acondicionamento incorrecto dos alimentos permite a germinação, causando danos e intoxicações alimentares (Brul et al., 2006). As espécies *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* são exemplos de patogénicos veiculados por alimentos. As espécies *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Paenibacillus macerans* e *Paenibacillus alvei*, também já foram associadas a infecções e intoxicações alimentares (Drobniewski, 1993). Outras espécies produtoras de endósporos são causadoras de doenças como a gangrena gasosa (*Clostridium perfringens*); o tétano (*Clostridium tetani*); e o botulismo (*Clostridium botulinum*) (Setlow, 2005).

Os endósporos bacterianos podem ainda ser utilizados como potentes armas biológicas. *Bacillus anthracis*, agente do *antrax* (carbúnculo) é um dos exemplos mais relevantes. Os recentes ataques bio-terroristas nos Estados Unidos da América, com a utilização dos endósporos de *antrax*, justificaram uma nova era de pesquisas com *B. cereus*, que é considerado próximo de *B. anthracis* em termos filogenéticos (Rasko et al., 2004).

Também no ambiente, os endósporos bacterianos têm assumido uma crescente importância, na avaliação sanitária dos meios receptores de contaminação fecal. Em ambientes marinhos, são persistentes no tempo e no espaço para além dos indicadores bacterianos clássicos, sendo mais resistentes do que estes, às alterações ambientais e

podendo ser detectados até um ano após o fim das descargas poluentes (Hill et al., 1996, Skanavis e Yanko, 2001).

Estas situações ilustram a importância dos endósporos, enquanto estruturas biológicas e tornam óbvia a necessidade da sua detecção e inactivação num contexto de segurança microbiológica.

## 5. Inactivação de endósporos

Os endósporos são muito resistentes a danos provocados por substâncias químicas como alcoóis, fenóis, clorohexidina e compostos benzalcóides que podem facilmente destruir as células vegetativas de bactérias (Demidova e Hamblin, 2005a). Por este motivo, são muitas vezes utilizados como indicadores biológicos para testar a eficácia de processos de esterilização. Por outro lado, compostos como o formaldeído, o glutaraldeído, soluções fortes de hipoclorito, o dióxido de cloro e ainda as radiações ionizantes ou ultra-violeta, são considerados agentes esporicidas (Russel, 2003).

Existem outros organismos capazes de produzir esporos, mas os endósporos bacterianos são únicos, pela sua capacidade de resistência ao calor, ainda que o mecanismo que a confere, não esteja ainda completamente esclarecido (Setlow, 2005; Gould, 2006).

Em vários estudos de aplicação de radiação UV como processo de desinfeção de águas residuais constatou-se que os endósporos bacterianos apresentam uma grande resistência, ao contrário das células de estirpes não formadoras de endósporos, sendo por isso necessário fluências mais elevadas para atingir a mesma taxa de inactivação (Hijnen et al., 2006).

Os endósporos bacterianos também revelaram elevada resistência à desinfeção solar (SODIS - Solar Water Disinfection) e à desinfeção fotocatalítica (SPC - DIS - Solar and Photocatalytic Disinfection) com dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), em reactores. Nesta última abordagem, os factores de redução dos endósporos de *Bacillus subtilis* não ultrapassaram 1.7 unidades logarítmicas (log), enquanto que para Protistas produtores de formas de resistência (trofozoítos of *Acanthamoeba polyphaga*), para fungos (*Candida albicans*, *Fusarium solani*) e para bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) os factores de redução obtidos foram na ordem de 4 log (Lonnen et al., 2005).

O conteúdo em água nos endósporos bacterianos é cerca de de 20 a 30% do teor nas células vegetativas. Este baixo teor em água aumenta a sobrevivência dos



endósporos em condições de secura e confere-lhes resistência a compostos químicos como os peróxidos (Setlow, 2005).

Da constituição dos endósporos fazem parte compostos que conferem resistência a agentes químicos, destacando-se o ácido dipicolínico (DPA) e as proteínas SASP (Small Acid-Soluble Spore Proteins). O dipicolinato de cálcio pode levar à redução da quantidade de água e indirectamente à resistência do calor sendo libertado durante a germinação (Paidhungat, 2001; Melly, 2002). As SASP protegem o material genético do efeito nocivo das radiações, da dessecação, do calor seco e disponibilizam carbono e energia durante o processo germinativo (Gould, 2006). A queratina é outra das substâncias envolvidas na resistência a agentes químicos e encontra-se na capa do endósporo (Madigan e Martinko, 2006).

Os mecanismos de actuação dos diferentes agentes esporicidas não são ainda completamente conhecidos. Contudo, têm sido formuladas várias hipóteses explicativas tais como a destruição do material genético causada por raios gama, ultra violeta, agentes alquilóides, formaldeído e calor seco ou os danos na membrana interna dos endósporos devido a alterações na permeabilidade que interrompem o processo germinativo, pelo dióxido de cloro, hipoclorito, peroxinitrito e outros peróxidos (Setlow et al., 2002).

Nos anos 70 e 80, com o avanço dos métodos em microbiologia molecular, *Bacillus subtilis* 168, uma espécie produtora de endósporos, foi o primeiro organismo modelo não patogénico, acessível para estudo, cujo genoma foi totalmente sequenciado (Hornstra et al., 2006). Na actualidade, as bactérias modelo formadoras de endósporos usadas em estudos de inactivação, são principalmente o *B. cereus* e o *B. megaterium*, uma vez que são espécies cujas células e endósporos têm grandes dimensões (Errington, 2003).

## **6. Fototerapia, efeito fotodinâmico e terapia fotodinâmica**

A fototerapia utiliza a luz no tratamento e prevenção de doenças. A civilização Egípcia já estabelecia uma associação entre a luz solar e os benefícios que advinham para a saúde, devido ao seu potencial antiraquítico e bactericida (helioterapia). A evolução do conceito científico de fototerapia, iniciou-se com as descobertas sobre a refacção da luz solar no prisma óptico, tendo sido demonstrado que os raios infravermelhos e ultravioleta da luz solar não eram visíveis ao olho humano. Já no fim do século XIX, foi mostrado que a radiação ultravioleta era letal para bactérias e outros

microrganismos, permitindo a associação entre a luz solar e a sua aplicação clínica no tratamento de certas doenças (Ackroyd et al., 2001). Posteriormente, começou a ser utilizada esta técnica de fototerapia no tratamento de várias doenças de pele e surgiram tratamentos para o sarampo, que foram bem sucedidos utilizando luz vermelha. As radiações ultra-violeta também foram utilizadas para tratar a tuberculose cutânea (Ackroyd et al., 2001). A associação da luz ultra-violeta e o aparecimento do cancro da pele e a utilização rotineira de antibióticos levou ao seu abandono em aplicações clínicas (McDonagh, 2001).

A fotoquimioterapia ou Terapia Fotodinâmica (Photodynamic Therapy - PDT) difere da fototerapia na medida em que utiliza a combinação da luz e fotossensibilizadores (PS) no tratamento de doenças (McDonagh, 2001).

A aplicação de corantes fotossensíveis é considerada ancestral. Os Egípcios tratavam lesões de pele como a despigmentação (vitiligo) utilizando psoralenos, compostos fotorreactivos existentes em plantas (McDonagh, 2001). As plantas geralmente eram secas e reduzidas a pó e posteriormente eram aplicadas nas lesões de pele. Com a exposição ao sol, esses compostos eram activados e a pele lesada readquiria a pigmentação normal (McDonagh, 2001).

A Terapia Fotodinâmica é uma abordagem que tem sido utilizada em tratamentos de cancro e outras doenças sobretudo em dermatologia e oftalmologia, com boa aceitação, estando regulamentada em vários países como abordagem terapêutica.

Os maiores avanços da PDT surgiram associados à luta contra o cancro, em 1976. Os primeiros estudos realizados envolveram pacientes de cancro na bexiga, utilizando um derivado de hematoporfirina (HpD) (Ackroyd et al., 2001). Posteriormente, a HpD foi aplicada ao tratamento de outros tipos de cancro e a técnica tem vindo a expandir-se em áreas tão diferentes como a dermatologia, oftalmologia, virologia, imunologia e microbiologia (Luksiene, 2005).

O efeito fotodinâmico resulta da combinação de três factores que conduzem à destruição das células: luz, fotossensibilizador e oxigénio molecular (Luksiene, 2005). Os compostos utilizados como fotossensibilizadores (PS) são geralmente não tóxicos na ausência de luz, absorvem luz na gama visível ou ultra-violeta sofrendo uma excitação electrónica e transferem posteriormente a energia absorvida para as moléculas de oxigénio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), originando desta forma espécies reactivas de oxigénio como é o caso do oxigénio singuleto ( $^1\text{O}_2$ ) (Wainwright, 1998; Ackroyd et al., 2001).

A PDT tem vantagem sobre outras abordagens terapêuticas, uma vez que as substâncias fotossensibilizadoras podem ser aplicadas quer topicamente na área

afectada, quer ministradas por via intravenosa, apresentando geralmente, selectividade para os tecidos alvo.

No que diz respeito ao tratamento do cancro, a administração do fotossensibilizador é feita de modo intravenoso ou tópico, no caso do cancro de pele. O fotossensibilizador geralmente liga-se às lipoproteínas de baixa densidade da corrente sanguínea. As células tumorais apresentam um número mais elevado de receptores destas lipoproteínas do que as células normais, para além de uma drenagem linfática diminuída. O composto usado como fotossensibilizador concentra-se preferencialmente nesses tecidos e não é tão rapidamente eliminado. O fotossensibilizador é activado com luz de comprimento de onda adequado e converte oxigénio no estado de tripleto (estado fundamental) em oxigénio no estado singuleto (estado excitado). Este último é altamente reactivo e ao ligar-se aos componentes celulares, causa modificações estruturais tais que acarretam a destruição e morte das células (Luksiene, 2005).

## **7. Abordagem fotodinâmica em tratamentos antimicrobianos – PACT**

A destruição dos microrganismos patogénicos (bactérias, fungos, vírus) permanece como um desafio permanente ao longo dos tempos para o Homem. Neste sentido, diversas linhas de investigação procuram inactivar microrganismos, de modo a eliminar e a prevenir doenças e assegurar o controlo desses microrganismos no ambiente. No entanto, os meios disponíveis neste combate nem sempre são os mais inócuos e o desenvolvimento de resistências nos microrganismos, é um desafio a ultrapassar.

O desenvolvimento de aplicações do efeito fotodinâmico e a pesquisa de novos fotossensibilizadores trouxe perspectivas interessantes noutras áreas, para além da medicina, destacando-se o desenvolvimento de abordagens antimicrobianas (Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy - PACT) mais eficientes, ecologicamente sustentáveis, aplicáveis ao ambiente, à segurança alimentar, à medicina veterinária e à fitopatologia (Wainwright, 1998; Jori e Brown, 2004; Demidova e Hamblin, 2005b; Winekler, 2007).

Investigações recentes nesta área, têm procurado relacionar a eficácia antimicrobiana de diversos PS com a sua estrutura química e com algumas das suas propriedades físico-químicas como sejam lipofilidade, grau de ionização, máximos de absorvância e eficácia na produção de oxigénio singuleto.

A inactivação fotodinâmica de microrganismos (PACT) tal como a PDT baseia-

se na utilização de um PS, localizado no microrganismo, que é activado pela luz visível e é capaz de gerar espécies reactivas de oxigénio ou oxigénio singuleto que são igualmente tóxicas para os microrganismos (Maisch, 2007).

Um bom PS, como agente de PACT, deve ter capacidade de se acumular no microrganismo e ser eficiente na sua morte, não induzindo a mutagénesse ou genotoxicidade (Luksiene, 2005).

Desde 1900 que é conhecida a possibilidade de destruir *in vitro* certos microrganismos através de uma combinação adequada de corante e luz, mas nos últimos 15 anos muitos progressos têm sido conseguidos no sentido de aumentar a eficiência das substâncias fotossensíveis, permitindo maior afinidade na ligação e destruição de microrganismos patogénicos como bactérias, fungos e vírus (Wainwright, 1998; Makowsky e Wardas, 2001; Jori e Brown, 2004; Hamblin e Hassan, 2004; Maisch, 2007). Em 1897, conseguiu-se a inactivação de *Paramecium caudatum* após a exposição à luz na presença de laranja de acridina (Luksiene, 2005). Posteriormente, em 1907, demonstrou-se que os efeitos tóxicos na presença de luz, não se deviam ao calor e foi introduzido o termo reacção fotodinâmica. Investigações posteriores com corantes fluorescentes, mostraram que a presença de oxigénio era importante na destruição de bactérias (Ackroyd et al., 2001). No início do século vinte, foi testado o efeito do corante anilina em animais e bactérias. Observou-se também, que a incubação de bactérias, com o corante azul de metileno foi a causa provável da morte das mesmas, após a exposição luminosa (Ackroyd et al., 2001).

Como os principais alvos dos PS são as paredes e as membranas celulares, estes não precisam de penetrar nas células. Estando adsorvidas à superfície são activados pela luz e induzem a destruição da célula alvo. Não são por isso desenvolvidos mecanismos de resistência que envolvem a diminuição de absorção do composto PS (Winekler, 2007).

As substâncias fotossensíveis têm sido nas últimas décadas, testadas *in vivo* e *in vitro*, com o objectivo de avaliar quais as modificações estruturais óptimas para a obtenção de compostos de elevado potencial antimicrobiano (Luksiene, 2005). O aumento da resistência a antibióticos por parte de bactérias patogénicas e a crescente preocupação face às limitações das abordagens quimioterapêuticas no tratamento de infecções, vem motivando a procura de soluções alternativas tais como a PACT, admitindo que as bactérias não desenvolvem resistência à fotoinactivação. A PACT restringe-se actualmente ao tratamento de infecções localizadas, devido às limitações da penetração da luz. Esta terapia localizada contribui para a diminuição da resistência aos

antibióticos. A PACT tem mostrado eficiência em testes *in vitro* com bactérias (incluindo estirpes mais resistentes), fungos, vírus, designadamente bacteriófagos e protozoários (Wainwright, 1998; Makowski e Wardas, 2001). A nível clínico a PACT tem sido aplicada, no tratamento de doenças de pele (psoríase, acne, infecções fúngicas), infecções orais e desinfecção de sangue ou produtos sanguíneos (Wainwright, 1998; Bonnett, 2000; Wainwright, 2000).

Certos PS poderão ser utilizados como herbicidas, antifúngicos/fungicidas (Calzavara-Pinton et al., 2005; Peloi et al., 2008) e pesticidas e ainda no tratamento de águas residuais. Em ensaios *in vitro*, as porfirinas catiónicas *meso*-substituídas demonstraram, para diferentes espécies, terem um elevado potencial antifúngico (Takemoto et al., 2003).

## 8. Fotossensibilizadores e mecanismos de actuação

As substâncias fotossensibilizadoras mais comuns em PACT, distribuem-se por várias famílias de compostos heterocíclicos: fenotiazinas (azul de toluidina B, azul de metileno), acridinas, cianinas, merocianinas, macrociclos tetrapirrólicos (porfirinas, clorinas, ftalocianinas, naftalocianinas), psoralenos (furanocoumarinas), entre outros (Wainwright, 1998).

As fenotiazinas, atendendo à sua estrutura e dimensão, intercalam-se nos ácidos nucleicos. Em *E. coli*, o corante azul de toluidina B aumenta a permeabilidade da membrana, enquanto que o azul de metileno quebra as cadeias dos ácidos nucleicos (Wainwright, 1998). As acridinas foram descritas pela primeira vez em 1900 como tendo potencial fotossensibilizador (Ackroyd et al., 2001). Os mecanismos de actuação destes compostos continuam a ser estudados e apontam no sentido da sua possível acção como intercalantes do DNA e agentes mutagénicos em fungos e bactérias (Wainwright, 1998). As cianinas resultaram de uma evolução da utilização das acridinas e foram utilizadas como antimicrobianos durante a I Guerra Mundial. Ainda hoje fazem parte da constituição de muitos medicamentos anti-helmínticos (Wainwright, 1998).

As porfirinas (Figura 6) são macrociclos tetrapirrólicos formados por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por pontes metínicas.

Os compostos porfirínicos têm sido amplamente utilizados em tratamentos de PDT e o seu potencial antimicrobiano tem vindo a ser

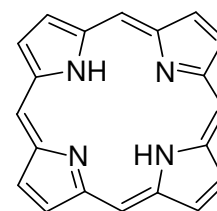


Figura 6 - Estrutura da porfirina.

intensamente explorado (Jori e Brown, 2004).

As porfirinas são compostos importantes em vários processos celulares e na maioria dos casos estão associadas a iões metálicos, formando metaloporfirinas. Os quatro átomos de azoto no interior do macrociclo porfirínico podem complexar com catiões metálicos. Alguns exemplos são os grupos heme da hemoglobina, a mioglobina (pigmento respiratório presente nos músculos com função de armazenar oxigénio), os citocromos, a catalase e a peroxidase (componentes importantes para a defesa biológica contra a toxicidade de oxigénio, removendo espécies reactivas, como peróxidos e superóxidos).

Pertence a este grupo o primeiro fotossensibilizador autorizado pela FDA para tratamento de cancro por PDT, designado de Photofrin®. É constituído por uma mistura de macrociclos porfirínicos derivados da hematoporfirina (HpD). Continuam a ser alvo de estudo as propriedades dos derivados porfirínicos como agentes intercalantes de DNA, no tratamento de problemas dermatológicos (acne, eczema, psoríase), artrites, degeneração da mácula da retina, entre outras (Demidova e Hamblin, 2004).

As ftalocianinas (Figura 7) são derivados análogos às porfirinas (tetrabenzotetraazoporfirinas) em que o carácter aromático é aumentado. Em vez dos 4 anéis pirrólicos se encontrarem unidos por átomos de carbono metínicos, como acontece nas porfirinas, nas ftalocianinas as 4 unidades isoindole estão ligadas por átomos de azoto (Ackroyd et al., 2001). As ftalocianinas apresentam intensa absorção da radiação na região do vermelho e infravermelho do espectro electromagnético, quando comparado com as porfirinas. Esta característica é particularmente útil quando o propósito é tratar áreas/lesões de maior extensão e profundidade, uma vez que a penetração da luz vermelha ou infravermelha é superior à luz de menor comprimento de onda (ex: azul). O potencial antimicrobiano destes compostos, tem sido direccionado para a desinfeccção de produtos sanguíneos. Existem já resultados sobre a actuação das ftalocianinas na inactivação do vírus HIV e também no tratamento de diversos tipos de cancro (Wainwright, 1998).

Existem ainda alguns PS naturais em plantas e também em fungos e que funcionam como agentes de defesa antimicrobianos e herbicidas, podendo facilitar o parasitismo (Wainwright, 1998; Maisch, 2007).

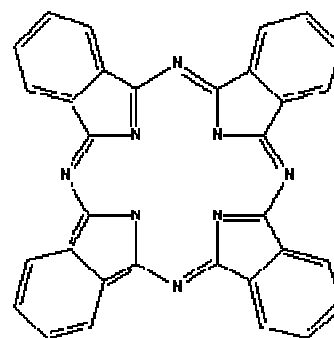


Figura 7 - Estrutura da ftalocianina.

Os psorolenos (Figura 8) têm sido utilizados em África no tratamento de doenças de pele e mais recentemente no tratamento de linfomas. Têm capacidade de intercalar o DNA vírico (Wainwright, 1998).

Os perilenequinonóides são pigmentos naturais obtidos a partir de várias plantas, e que levavam ao aparecimento de uma doença de pele (hipericismo) em gado que se alimenta de *Hipericum perforatum*. A hipericina (Figura 9) entra na corrente sanguínea ao nível da epiderme e reage com o sol, levando à formação de manchas na pele. Os chineses na sua medicina tradicional também usam extratos da planta *Hypocrella bambusae*, cujo agente fotossensibilizador é a hipocrelina, para o tratamento de doenças de pele. Estes

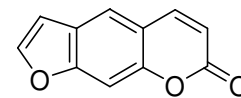


Figura 8 - Estrutura do psoroleno.

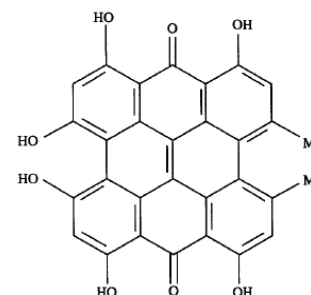


Figura 9 - Estrutura da hipericina.

compostos estão actualmente a ser objecto de investigação para avaliar a sua eficácia *in vitro* quer em PDT quer em PACT (Wainwright, 1998).

Tanto em PDT quer em PACT, a destruição dos componentes celulares pode ocorrer por dois mecanismos distintos. O mecanismo denominado de tipo I envolve a transferência de electrões ou átomos de hidrogénio do fotossensibilizador, quando no estado electrónico excitado de tripleto, para moléculas de substrato, produzindo espécies radicais muito reactivas. Estas espécies podem reagir com oxigénio formando peróxidos, iões superóxido ou radicais hidroxilo, que iniciam cascatas de reacções com radicais livres induzindo efeitos citotóxicos (Luksiene, 2005). No mecanismo denominado de tipo II, os estados excitados de tripleto do fotossensibilizador transferem directamente a sua energia para o oxigénio molecular e originam moléculas de oxigénio no estado excitado de singuleto. O oxigénio no estado excitado singuleto é um forte oxidante e tem acção citotóxica (Figura 10). Este é o tipo de mecanismo mais comum quando há elevadas concentrações de oxigénio nos locais alvo e na ausência de agentes redutores fortes (Martin e Logsdon, 1987).

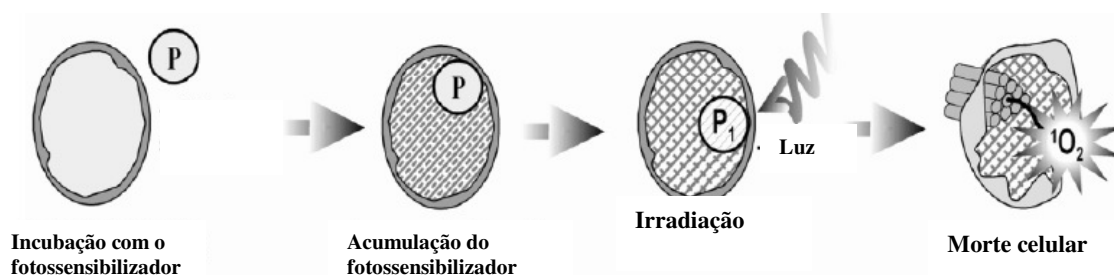


Figura 10 - Mecanismo de acção do fotossensibilizador (P) na célula; P - fotossensibilizador; P<sub>1</sub> - estado excitado do fotossensibilizador após ter absorvido luz;  $^1O_2$  - oxigénio singuleto (Adaptado de Luksiene, 2005).

Um bom PS para aplicação em PDT deve ser um composto puro e estruturalmente bem caracterizado, de síntese fácil e economicamente viável, fotoquimicamente eficiente e com capacidade de absorção na região vermelha do espectro electromagnético visível ( $650 < \lambda < 800$  nm). A presença de cromóforos endógenos, como a hemoglobina, reduz a penetração da luz nos tecidos para comprimentos de onda abaixo dos 650 nm. Um composto que absorva acima dos 800 nm, pode não ter um intervalo de energia suficientemente grande entre o estado tripleto e o estado singuleto ( $> 94 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Deve ainda produzir eficientemente oxigénio singuleto *in vivo*, ser selectivamente retido por tecidos tumorais comparativamente com os tecidos normais e ser pouco tóxico nos tecidos circundantes e na ausência de luz. Deve também ser solúvel nos fluídos corporais ou ser facilmente incorporado em suspensões de lipossomas, sofrer eliminação rápida do organismo após o tratamento, não se degradar facilmente sob a acção da luz e provocar eficientemente a necrose ou apoptose dos tecidos neoplásicos (Ackroyd et al., 2001).

## 9. Inactivação de células bacterianas

Os mecanismos envolvidos na inactivação por fotossensibilização das células bacterianas dependem da acumulação de PS na superfície da célula, bem como da sua distribuição/translocação pelo citoplasma uma vez que ambas as situações podem conduzir à destruição da bactéria, através de danos no DNA ou na membrana (Luksiene, 2005).

Os danos por PDI podem libertar o conteúdo celular ou impedir o transporte de substâncias pela membrana, inactivando enzimas. Alguns PS podem intercalar-se na cadeia dupla de DNA causando danos estruturais. Os radicais de guanina são os mais facilmente oxidados. Porém, os danos ao nível dos ácidos nucleicos podem ser



corrigidos por sistemas de reparação de DNA, por isso este tipo de inativação não parece ser suficiente (Hamblin e Hasan, 2004).

Até ao momento, várias substâncias fotossensíveis têm mostrado ser eficientes na inativação de bactérias Gram positivas, enquanto que as Gram negativas parecem ser mais resistentes a este processo, provavelmente devido à menor eficiência de adsorção do fotossensibilizador (Hamblin e Hassan, 2004).

A estrutura e composição química das células bacterianas apresentam algumas variações de espécie para espécie, podendo conduzir a diferentes modos de ligação e

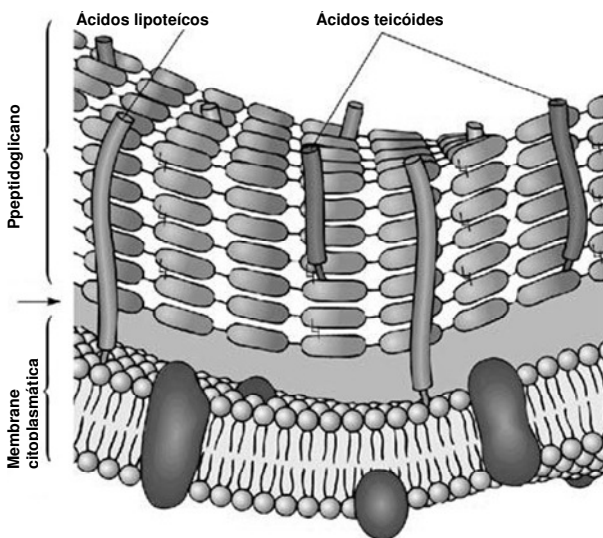


Figura 11 - Estrutura da parede bacteriana das Gram positivas (<http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes>)

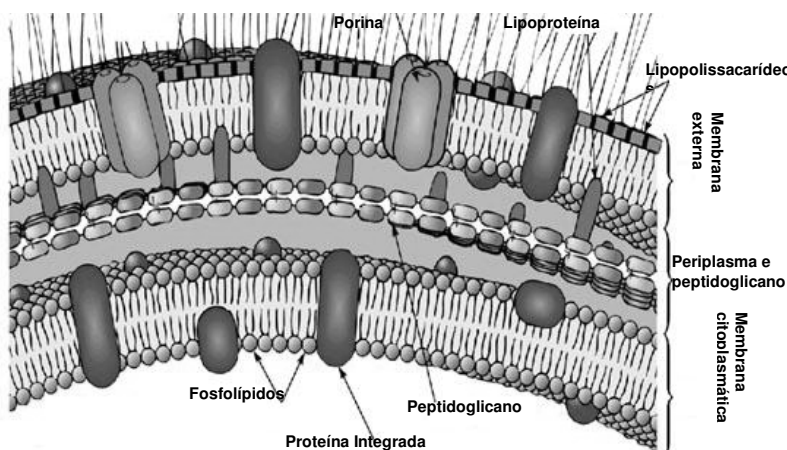


Figura 12 - Estrutura da parede bacteriana das Gram negativas (<http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes>)

membrana está rodeada por uma camada porosa de peptidoglicano e ácidos lipotéicos. (Figura 11).

As bactérias Gram positivas são mais susceptíveis à PACT uma vez que a

acumulação das substâncias fotossensibilizadoras, bem como influenciar os tempos de adsorção necessários para a acumulação do composto antes da irradiação (Wainwright, 1998). Um PS que penetre lentamente no microrganismo pode causar danos na sua parede celular, ou mesmo afectar os ácidos nucleicos, quebrando as ligações entre as moléculas (Wainwright, 1998).

A parede das bactérias Gram positivas apresenta uma camada de peptidoglicano (N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico e aminoácidos) adjacente à parte mais externa da membrana

Este arranjo permite que o PS se acumule na parede e possa mesmo atravessá-la e aceder ao citoplasma.

Após a irradiação, o PS origina espécies reactivas na parede bacteriana que podem levar à sua rápida ruptura e à penetração do PS no interior da célula, levando à inibição da replicação de DNA e síntese de RNA (Luksiene, 2005).

Nas bactérias Gram negativas, a camada de peptidoglicano é menos espessa e a parede apresenta uma camada externa de lipopolissacarídeos (LPS) que diminui a permeabilidade selectiva associada a proteínas – porinas. Estas, permitem a passagem de pequenas moléculas do exterior para o espaço periplasmático, entre a camada de peptidoglicano e a LPS. As substâncias podem ficar retidas neste espaço (Figura 12), não chegando a aceder ao citoplasma em concentrações eficazes, o que pode explicar a maior resistência destas bactérias à PACT (Luksiene, 2005).

## **10. Porfirinas como fotossensibilizadores em PDI de endósporos**

As porfirinas têm vindo a ser testadas como fotossensibilizadores uma vez que absorvem radiação na região do visível, apresentando uma energia no estado tripleto relativamente baixa.

A maior ou menor eficiência dos derivados porfirínicos na inactivação de microrganismos está muito relacionada com a estrutura química desses compostos (Merchat et al., 1996; Reddi, 2002; Hamblin e Hassan, 2004; Tomé et al., 2004; Magaraggia et al., 2006; Tomé et al., 2007; Costa et al., 2008). As porfirinas catiónicas têm-se revelado mais eficazes do que as neutras e aniónicas na inactivação de células bacterianas, actuando eficazmente em concentrações menores (Demidova e Hamblin, 2004, Tomé et al., 2004). As alterações estruturais introduzidas nas moléculas consistem frequentemente na introdução de cargas positivas e/ou grupos funcionais específicos capazes de aumentar a sua afinidade para com as bactérias Gram negativas (Hamblin e Hassan, 2004; Costa et al., 2008). Agentes desestabilizadores da membrana externa, como o  $\text{CaCl}_2$ , o EDTA ou a polimixina B, quando associados a PS neutros, tornam estes compostos mais eficientes na destruição das bactérias Gram negativas (Ehrenberg, 1993; Jori e Brown, 2004)

A abordagem fotodinâmica aplicada à inactivação de endósporos tem revelado que esta pode ser encarada como uma estratégia promissora. Fenotiazinas (azul de dimetilmetileno, azul de metileno, novo azul de metileno, azul de toluidina O-TBO), rosa de bengal, polilisisina clorina (e6) conjugada, porfirina tricatiónica com um grupo fenilo na posição *meso* e derivado de benzoporfirina, foram testadas na inactivação de

endósporos de várias espécies do género *Bacillus*. Os resultados mostraram uma baixa eficácia da porfirina tricatiónica testada em relação à elevada actividade de outros compostos, designadamente do TBO, que produziu os melhores resultados (Demidova e Hamblin, 2005a).

Neste trabalho, procurou-se testar a aplicabilidade de derivados porfirínicos na inativação dos endósporos bacterianos de diferentes espécies do género *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis*, *Bacillus liqueniformis* e *Bacillus sphaericus*), na tentativa de encontrar modificações estruturais conducentes à optimização do efeito fotodinâmico.

Foram comparados os efeitos de porfirinas catiónicas e neutras, bem como o efeito do aumento do número de cargas positivas e a modificação de grupos de *meso*-substituição, através da caracterização da cinética da inativação.

Pretendeu-se ainda comparar a cinética de inativação de endósporos e células vegetativas de diferentes espécies do género *Bacillus* no sentido de encontrar um derivado porfirínico de consenso que, com as modificações estruturais adequadas, possa vir a ser utilizado com sucesso na inativação de endósporos em materiais contaminados, tecidos vivos, ou águas residuais.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores testados neste trabalho estão representados na Figura 13: **(1)** 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina (Tri-Py-COOH, neutra); **(2)** iodeto de 10,15,20-tris(4-carboxifenil)-5-(1-metilpiridinio-4-il)porfirina (Mono-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, monocatiónica); **(3)** di-iodeto 5,10-bis(4-carboxifenil)-15,20-bis(1-metilpiridinio-4-il)porfirina (Di-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, dicatiónica); **(4)** tri-iodeto de 10,15,20-tris(1-metilpiridinio-4-il)-5-(fenil)porfirina (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph, tricatiónica), **(5)** 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(1-metilpiridinio-4-il)porfirina (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, tricatiónica); **(6)** tri-iodeto de 10,15,20-tris(1-metilpiridinio-4-il)-5-(pentafluorofenil)porfirina (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, tricatiónica), **(7)** tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetrakis(1-metilpiridinio-4-il)porfirina (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, tetracatiónica) e **(8)** azul de toluidina O (TBO). O corante azul de toluidina O (TBO, Acrós), do grupo das fenotiazinas, foi testado como fotossensibilizador de referência, uma vez que a sua eficiência na inactivação de endósporos de *B. cereus* já tinha sido documentada em estudos anteriores (Demidova e Hamblin, 2005a).

Para as experiências de fotoinactivação das células vegetativas foram testados os compostos porfirínicos **5** e **6** (tricatiónicos), o derivado **7** (tetracatiónico) e ainda o corante TBO.

Os derivados porfirínicos foram sintetizados pelo grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro. O método seleccionado para a síntese das porfirinas neutras consiste na condensação de pirrol com o(s) aldeído(s), na presença de uma mistura de ácido acético e nitrobenzeno, em refluxo, a 120 °C, durante cerca de uma hora. Depois de purificados cromatograficamente, os grupos piridilo de cada porfirina são quaternizados por reacção com iodeto de metilo.

Foram preparadas soluções stock a 500 µM de todos os fotossensibilizadores. Estas, foram esterilizadas por filtração e armazenadas a 4 °C, no escuro, até serem utilizadas.

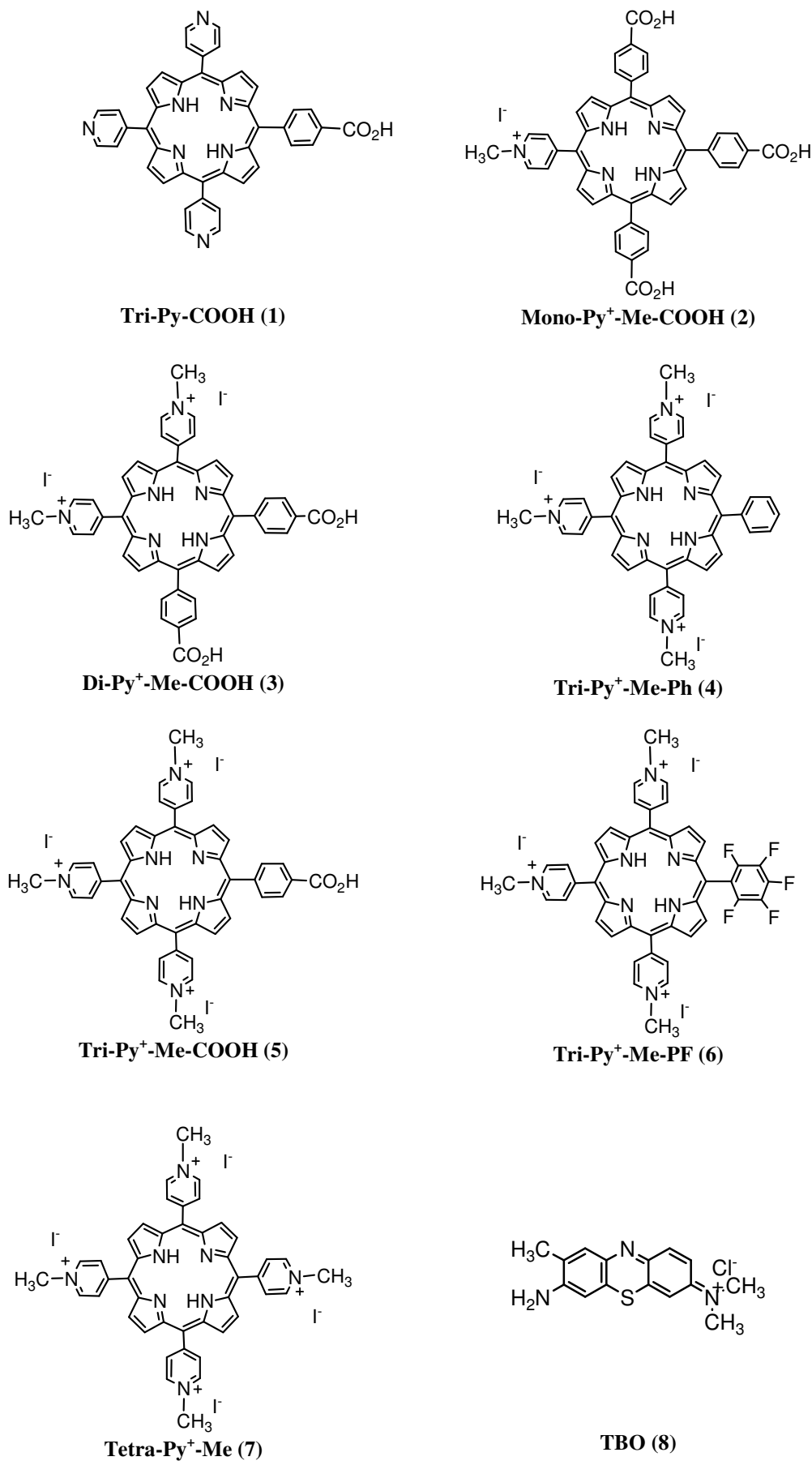


Figura 13 - Estrutura dos fotossensibilizadores testados.

## 2. Material biológico

Como material biológico foram utilizadas culturas puras de *Bacillus cereus* (ATCC14579), *Bacillus subtilis* (ATCC 31324), *Bacillus liqueniformis* (ATCC 14580) e *Bacillus sphaericus* (ATCC 53969). *B. cereus* foi cultivado a partir de Culti-Loops® (Unipath, Basingstoke, UK). As restantes estirpes foram adquiridas à DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

### 2.1. Condições de cultura e preparação das suspensões-stock de endósporos

As culturas puras foram preparadas, mantidas e repicadas regularmente em meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth, Merck). Para a preparação das suspensões-stock de endósporos seguiu-se a metodologia proposta por Demidova e Hamblin, 2005a. As diferentes estirpes foram cultivadas em meio de esporulação contendo 16.0 g L<sup>-1</sup> de TSB, 2.0 g L<sup>-1</sup> de KCl e 0.5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>. O pH foi ajustado a 7.0 e o meio foi distribuído em frascos de 100 mL, autoclavado a 121 °C e arrefecido. Imediatamente antes da inoculação, a cada frasco de meio de cultura foi adicionado de 100 µL de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1M, 100 µL de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1 M, 100 µL de FeSO<sub>4</sub> 1 mM e 200 µL de solução de glucose a 50 %. As soluções de suplementos foram esterilizadas por filtração imediatamente antes de serem adicionadas ao meio de cultura. Após a inoculação, as culturas em esporulação foram incubadas durante 3 dias a 30 °C, no escuro (Sanyo Incubator). Após a incubação, procedeu-se à inativação das células vegetativas. Para tal, o volume total da cultura de esporulação foi dividido em alíquotas de 10 mL que foram aquecidas a 85 °C durante 10 minutos num bloco de aquecimento (VWR Digital Heat Block) e imediatamente arrefecidas em banho de gelo durante 5 minutos.

A suspensão dos endósporos foi concentrada por centrifugação a 1,300 x g durante 20 minutos (Centrifuge IECB-22M) e o sedimento formado foi submetido a 5 lavagens com 5 mL de uma solução contendo 1M KCl e 0.5 M NaCl e 5 mL de água destilada esterilizada. Após este tratamento, o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de tampão Tris-HCl (pH 7.2) ao qual se adicionou 600 µL de uma solução contendo 50 µg mL<sup>-1</sup> de lisozima. Após 8 a 12 horas de incubação a 4 °C com agitação, a lisozima foi removida por centrifugação a 1,300 x g durante 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 2 mL de água destilada esterilizada e lavado do mesmo modo, outras 5 vezes. Os endósporos foram finalmente ressuspenso em tampão fosfato salino (PBS 0.01M, pH 7.4), sem Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>, com glicerol a 10 %, e congelados em azoto

líquido. Foram depois armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até serem utilizados. Para evitar a germinação, as suspensões de endósporos foram mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até 1 hora antes da sua utilização em experiências de fotoinactivação. A concentração de endósporos viáveis nas suspensões-stock foi determinada em cada ensaio. Após a descongelação, o stock foi sujeito a diluições decimais em soluto de Ringer e procedeu-se à sementeira por incorporação em TSA (Tryptic Soy Agar, Merck) de 2 réplicas de alíquotas de  $100\mu\text{L}$ . Após 48 horas de incubação a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  efectuou-se a contagem de colónias.

Todos os reagentes utilizados são da marca Fluka excepto aqueles para os quais se indica uma marca diferente.

## **2.2. Condições de cultura e preparação das suspensões de células vegetativas**

As culturas puras foram preparadas e mantidas em meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth, Merck), por repicagens regulares de culturas prévias. As culturas frescas foram obtidas por repicagem para TSB após 18 horas de incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  com agitação constante (200 rpm) (Shel Lab Shaking Incubator).

## **2.3. Controle do material biológico**

### **2.3.1. Pureza da cultura de *B. cereus***

A pureza da cultura foi verificada aquando da preparação das suspensões stock de endósporos. Em cada experiência, uma alíquota de  $100\ \mu\text{L}$  da suspensão de endósporos em soluto de Ringer foi semeada em meio MYP (Mannitol Egg Yolk Agar, Oxoid), com o suplemento de sulfato de polimixina S 0.1% (Sigma). As contagens das colónias características obtidas no meio selectivo foram comparadas com as contagens obtidas em TSA.

### **2.3.2. Teor residual de células vegetativas**

A pureza das suspensões-stock de endósporos relativamente à presença de células vegetativas foi verificada por observação ao microscópio óptico de fundo claro após coloração de endósporos com verde malaquite e safranina pela técnica de Wirtz-Conklin (modificada por Schaeffer e MacDonald, 1933). O esfregaço foi preparado colocando uma gota da suspensão de endósporos numa lâmina de vidro e fixando à chama. Cortou-se um rectângulo de papel de filtro com as dimensões aproximadas da lâmina de vidro que se sobrepôs ao esfregaço e colocou-se o conjunto (lâmina-esfregaço-papel de filtro), sobre a superfície do bloco de aquecimento (VWR Digital



Heat Block) a 100 °C. Sobre o papel de filtro foi colocado o corante verde malaquite. O papel de filtro foi mantido sempre em contacto com o esfregão e reabastecido periodicamente com corante. Deixou-se actuar o corante a quente, durante 5 minutos, ao fim dos quais se retirou o papel de filtro com uma pinça e se lavou o esfregão com água destilada. Posteriormente, aplicou-se safranina sobre o esfregão. Deixou-se actuar durante 15 segundos e lavou-se com água destilada para remover o excesso de corante. Deixou-se secar ao ar e observou-se a preparação ao microscópio óptico de fundo claro (Leitz).

### **2.3.3. Germinação durante a experiência**

A ocorrência de germinação dos endósporos durante a etapa de adsorção do fotossensibilizador no escuro também foi avaliada, durante os ensaios da inativação. Conjuntos de duas alíquotas foram recolhidas após 0, 1, 2 e 3 horas de adsorção no escuro. De cada conjunto, uma das alíquotas foi inactivada por aquecimento a 85 °C durante 10 minutos. As alíquotas inactivadas e não inactivadas, foram diluídas em soluto de Ringer e semeadas por incorporação em TSA. Procedeu-se à contagem de colónias após 48 horas de incubação a 37 °C no escuro. A inexistência de germinação apreciável foi inferida através da comparação entre as contagens das alíquotas inactivadas (apenas endósporos) e não inactivadas (endósporos e células vegetativas).

## **3. Fontes de luz**

Numa primeira fase experimental utilizou-se como fonte luminosa uma luminária equipada com 13 lâmpadas OSRAM 21 de 18 W emitindo na gama 380-700 nm, com uma potência total de 40 Wm<sup>-2</sup>. Posteriormente, foram realizados ensaios usando luz solar natural, em dias de céu limpo, em que a radiação UV foi filtrada por interposição de uma placa de vidro, e cuja potência média foi de 80 Wm<sup>-2</sup>. Finalmente, utilizou-se um sistema de iluminação (LC-122 LumaCare, London) equipado com uma lâmpada tipo quartzo/halogénio de 250 W. A luz utilizada (400-800 nm) foi focada por meio de um feixe de fibra óptica e colocada de forma a que as amostras fossem irradiadas com uma luz de potência 1690 Wm<sup>-2</sup>.

## **4. Montagens experimentais**

### **4.1. Otimização do protocolo de fotoinativação dos endósporos**

Numa fase preliminar do trabalho experimental procedeu-se a uma série de ensaios com objectivo principal de escolher a fonte de luz adequada e definir as condições de irradiação para a realização das experiências de fotoinativação. Foram testadas três fontes de luz (luminária, luz solar e sistema de iluminação com fibra óptica) e duas condições de irradiação (contínua e descontínua).

#### **4.1.1. Experiências preliminares de irradiação em luminária**

Nos ensaios preliminares de optimização do protocolo experimental, os endósporos foram obtidos por inactivação das células vegetativas de uma cultura de *B. cereus* em meio de esporulação, imediatamente antes dos ensaios. Procedeu-se à inactivação de 15 mL de cultura pura, num bloco de aquecimento (VWR Digital Heat Block) a 85 °C durante 10 minutos, seguido de um arrefecimento em banho de gelo, durante 5 minutos.

Para obter uma diluição de 1:10 adicionou-se a 3 mL de cultura inactivada o volume correspondente à concentração final de 10, 30 e 60 µM de fotossensibilizador (concentração final) Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e fez-se com PBS até um volume total de 30 mL. As suspensões foram transferidas para copos de vidro de 500 mL, protegidas da luz com folha de alumínio e incubadas no escuro a 37 °C, durante 60 minutos para permitir a adsorção do fotossensibilizador. Não foi efectuada a remoção do fotossensibilizador após o passo de adsorção no escuro e os copos contendo as suspensões foram directamente colocados sob a luminária e sujeitos a irradiação durante 180 minutos, na presença do PS em solução.

A cinética de fotoinativação foi avaliada por recolha, diluição seriada em soluto de Ringer e sementeira por incorporação em TSA de alíquotas de 100 mL, no início da irradiação, e ao fim de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. A contagem de colónias foi efectuada após 48 horas de incubação no escuro a 30 °C. A inactivação foi estimada a partir da variação da concentração de unidades formadoras de colónias (UFC) relativamente ao teor inicial. Cada ensaio de irradiação incluiu um controle claro (CC) sujeito às mesmas condições de irradiação das amostras, mas sem PS adicionado e um controle escuro (CE) contendo a concentração mais elevada de fotossensibilizador testada em cada ensaio, mas mantido ao abrigo da luz durante toda a experiência.

#### **4.1.2. Experiências preliminares de irradiação com luz solar**

Para obtenção dos endósporos, preparação das suspensões e adsorção do fotossensibilizador Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e procedeu-se de modo idêntico ao descrito na alínea 4.1.1, não tendo sido efectuada a remoção do fotossensibilizador após o passo de adsorção. Durante a irradiação com luz solar, os copos de vidro contendo as suspensões de endósporos em PBS, na presença do PS em solução, foram tapados com uma placa de vidro para filtrar a gama ultra-violeta e expostos durante 180 minutos na presença das várias concentrações de fotossensibilizador.

A cinética de fotoinativação foi avaliada de modo idêntico ao descrito na alínea 4.1.1 e foram também incluídos um controle claro e um controle escuro.

#### **4.1.3. Experiências preliminares de irradiação com fibra óptica**

Nas experiências de irradiação do sistema de iluminação com fibra óptica foi testada a irradiação aplicada de forma contínua e a irradiação descontínua, em que a suspensão foi protegida da luz durante um curto intervalo entre dois períodos de irradiação consecutivos. Pretendeu-se desta forma verificar se a dissipação de calor ocorrido durante o período escuro permitiria melhorar o funcionamento do fotossensibilizador e aumentar a eficiência de inativação.

##### **4.1.3.1. Irradiação contínua**

Alíquotas de 1 mL de suspensões de endósporos congeladas obtidas segundo o procedimento descrito no ponto 2.1 foram transferidas para microtubos e adicionadas das várias concentrações de fotossensibilizador. As suspensões foram incubadas durante 3 horas no escuro para permitir a adsorção. Após a incubação, as amostras foram sujeitas a uma lavagem para remover o fotossensibilizador não adsorvido e diminuir a intensidade da cor da suspensão reduzindo o efeito de auto-sombreamento. Para isso, procedeu-se à sua centrifugação a 1,550 x g (Eppendorf Microcentrifuge 5414) durante 10 minutos. Com uma micropipeta, retirou-se 900 µL de sobrenadante adicionou-se 900 µL de PBS. O sedimento foi ressuspenso por agitação em vórtex.

Para a irradiação, o conteúdo de cada microtubo foi adicionado a 9 mL de PBS e transferido para um dos poços de placas *6-well*, sendo irradiado durante 10 minutos de forma contínua. A fibra óptica foi montada numa garra e ajustada de modo a manter uma distância fixa (6 cm) entre a superfície frontal da fibra óptica e a superfície do líquido a irradiar sendo sujeita a uma irradiação com uma potência de 1690 Wm<sup>-2</sup>.

#### **4.1.3.2. Irradiação descontínua**

Num dos ensaios em que se usou TBO como fotossensibilizador de referência, a irradiação foi aplicada de modo descontínuo. Após a fase de adsorção e lavagem descrita na alínea 4.1.3.1, as amostras foram sujeitas a 6 pulsos de 15 segundos de irradiação com uma potência de  $1690 \text{ Wm}^{-2}$ , separados por 1 minuto no escuro. As restantes condições experimentais foram mantidas de acordo com o descrito no ponto 4.1.3.1.

### **4.2. Experiências padronizadas de fotoinativação de endósporos**

Após as experiências preliminares, foi definido um protocolo padronizado para a realização das experiências de fotoinativação para os diferentes fotossensibilizadores porfirínicos aplicados em várias concentrações.

#### **4.2.1. Cinética de inativação**

Nos ensaios de inativação dos endósporos, os tratamentos foram iniciados com o passo da adsorção no escuro. Alíquotas de 1 mL da suspensão stock de endósporos foram transferidas para uma série de microtubos esterilizados, correspondentes às diferentes concentrações de fotossensibilizador a testar em cada ensaio. Foram realizadas experiências com concentrações de 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  (gama alta) de todos os fotossensibilizadores e também com concentrações de 0.5, 1 e 5  $\mu\text{M}$  (gama baixa) para as porfirinas tricatiónicas e tetracatiónica. Os microtubos foram incubados na presença de PS, no escuro a 37 °C, durante 3 horas. Após a incubação, as suspensões foram lavadas para remoção do fotossensibilizador. Para isso procedeu-se à sua centrifugação a  $1,550 \times g$  (Eppendorf Microcentrifuge 5414) durante 10 minutos. Com uma micropipeta, retirou-se 900  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e adicionou-se 900  $\mu\text{L}$  de PBS. O sedimento foi ressuspensão e homogeneizado por agitação em vórtex.

Para a irradiação, transferiu-se para um poço de uma placa *6-well* 1 mL da suspensão de endósporos previamente sujeita aos passos de adsorção e lavagem e adicionou-se 9 mL de PBS. A irradiação foi conduzida de forma contínua, mantendo-se a suspensão de endósporos sobre um banho de gelo, por sua vez colocado sobre um agitador magnético, de modo a assegurar a dissipação de calor e a homogeneidade da suspensão durante o período de irradiação.

A cinética de inativação durante a irradiação foi seguida por recolha, diluição em soluto de Ringer e sementeira por incorporação em TSA de alíquotas de 100  $\mu\text{L}$ , no início da irradiação e a intervalos de tempo seleccionados. A contagem das colónias foi

efectuada após 48 horas de incubação no escuro e a inactivação foi estimada a partir da variação concentração de unidades formadoras de colónias (UFC) relativamente ao teor inicial na suspensão.

Cada ensaio de irradiação incluiu um controle claro (CC) sujeito às mesmas condições de irradiação que as amostras, mas sem fotossensibilizador adicionado e um controle escuro (CE) contendo a concentração mais elevada de fotossensibilizador testada em cada ensaio mas resguardado da luz com folha de alumínio.

Para cada fotossensibilizador e para cada concentração, foram realizados 2 ou 3 ensaios independentes dos quais se calculou o perfil médio de inactivação.

#### **4.2.2. Estimativa da adsorção de fotossensibilizador aos endósporos**

Para estimar a quantidade de fotossensibilizador fixada aos endósporos bacterianos durante o procedimento da adsorção no escuro, foi feito um ensaio em que se reproduziu as condições deste passo experimental.

Em tubos de ensaio com 9 mL de PBS foram adicionadas alíquotas de 1 ml de stock de endósporos e as porfirinas tri- e tetracatiónicas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, na concentração final de 10, 30 e 60 µM.

Para cada tratamento recolheu-se uma alíquota de 2 mL imediatamente após a adição do fotossensibilizador e outra de igual volume após 3 horas de incubação no escuro. Os endósporos foram recolhidos por centrifugação a 1,200 x g (Eppendorf Microcentrifuge 5414) durante 15 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em 2 mL de uma solução de digestão contendo NaOH 0.1 M e SDS 1% (Demidova and Hamblin, 2005a) e manteve-se no escuro, a 37 °C, cerca de 24 h até à obtenção de uma solução límpida. A concentração de material porfirínico presente nos extractos digeridos foi determinada por fluorescência (Fluoromax 3 - Horiba Jovin Yvon). Para obter os respectivos espectros de fluorescência, as amostras foram excitadas no comprimento de onda correspondente à banda Soret ( $\lambda = 420$  nm) e a emissão de fluorescência das diferentes porfirinas foi registada na gama de 600-750 nm. Todos os espectros de fluorescência foram registados à temperatura ambiente (~20 °C) utilizando uma célula de quartzo com um percurso óptico de 1 cm.

A intensidade de fluorescência obtida para as diferentes amostras foi convertida em concentração, por interpolação para uma recta de calibração para cada um dos fotossensibilizadores utilizados. As rectas de calibração foram obtidas utilizando concentrações conhecidas de fotossensibilizador dissolvidas na solução de digestão

utilizada. Os resultados obtidos permitiram calcular a função linear que relaciona a intensidade de fluorescência com a concentração do fotossensibilizador.

Paralelamente, no início e no fim da adsorção foi também colhida uma alíquota 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensão, que se diluiu em soluto de Ringer e se semeou por incorporação em TSA para determinação da concentração de endósporos viáveis. A quantidade de material porfirínico adsorvido foi expressa em molécula.  $\text{UFC}^{-1}$ .

#### **4.2.3. Detecção de alterações morfológicas (TEM e SEM)**

Nos ensaios de inactivação de endósporos de *B. cereus* com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF na concentração 60  $\mu\text{M}$ , foram recolhidas amostras antes e após a irradiação para detecção de alterações na morfologia do endósporo por microscopia electrónica de varrimento (SEM) e de transmissão (TEM). Para a observação em SEM, alíquotas de 1 mL foram depositadas sobre o suporte metálico adaptado ao microscópio (Scanning Electron Microscope-JEOL-JSM 5400). As amostras foram secas na estufa (Sanyo Incubator) durante 24 horas e recobertas com uma mistura de ouro-paládio. Foram observadas em SEM amostras dos seguintes tratamentos: (a) controlo claro (CC) no tempo inicial; (b) amostra irradiada durante 5 minutos na presença de 60  $\mu\text{M}$  de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (com adsorção prévia e lavagem). As condições de irradiação das amostras foram descritas em 4.2.1.

Para observação em TEM alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de amostra foram colocadas em tubos de ultra-centrífuga preenchidos, no fundo dos quais tinha sido previamente montada uma grelha para microscopia electrónica (Formvar Carbon Support Film-Electron Microscopy Sciences). Os tubos foram completamente cheios com soluto de Ringer esterilizado e os endósporos em suspensão foram recolhidos na grelha por ultra-centrífuga a 1,300 x *g* (Beckman Optima LE-80K Ultracentrifuge), durante 20 minutos. Após a centrifugação as grelhas foram removidas, coradas com uma solução a 1.5 % de acetato de uranilo (Agar Scientific) durante 1 minuto e procedeu-se à respectiva observação em TEM (H9000-NA, operado a 100 kV). Foram observadas em TEM amostras dos seguintes tratamentos: (a) controlo claro (CC) no tempo inicial; (b) amostra irradiada durante 5 minutos na presença de 60  $\mu\text{M}$  de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (com adsorção prévia e lavagem). As condições de irradiação das amostras foram as descritas em 4.2.1.

### **4.3. Experiências de fotoinativação de células vegetativas**

Para os ensaios de fotoinativação de células vegetativas, as culturas frescas foram diluídas 1:10 em PBS obtendo-se suspensões de células que foram transferidas para os poços de placas *6-well*. Nestes ensaios não foi realizado o passo de adsorção no escuro. Imediatamente antes do início da irradiação, procedeu-se à adição dos fotossensibilizadores nas concentrações de 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$ . A irradiação foi levada a cabo de modo idêntico ao descrito na alínea 4.2.1 para as experiências de fotoinativação de endósporos, sem o passo da adsorção no escuro. A cinética de inativação foi seguida através da recolha, diluição em soluto de Ringer e sementeira por incorporação em TSA de alíquotas de 100  $\mu\text{L}$ , no início da experiência e a intervalos de tempo seleccionados, durante os 15 minutos de irradiação. A contagem das colónias foi efectuada após 48 horas de incubação no escuro e a inativação foi estimada a partir da variação concentração de unidades formadoras de colónias (UFC) relativamente ao teor inicial na suspensão.

Tal como nas experiências de fotoinativação de endósporos, cada ensaio de irradiação incluiu um controle claro (CC) sujeito às mesmas condições de irradiação que amostras, mas sem fotossensibilizador adicionado e um controle escuro (CE) contendo a concentração mais elevada de fotossensibilizador testada em cada ensaio mas resguardado da luz com folha de alumínio.

Para cada fotossensibilizador e para cada concentração, foram realizados 2 ou 3 ensaios independentes dos quais se calculou o perfil médio de inativação.





## RESULTADOS

### 1. Experiências de inativação de endósporos de *B. cereus*

#### 1.1. Qualidade do material biológico

A concentração de endósporos nos stocks utilizados nos ensaios de irradiação situou-se na ordem dos  $10^7$  e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Considerando que a preparação da suspensão para os tratamentos de PDI, necessitou da diluição de 1:10 em PBS, a quantidade inicial encontrou-se entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

As observações microscópicas confirmaram que a ocorrência de células vegetativas era insignificante (<1%). A germinação dos endósporos durante a adsorção no escuro, foi também considerada insignificante, uma vez que a contagem das colónias foi semelhante entre as amostras sujeitas a inativação (só endósporos) e as amostras não inactivadas (endósporos e células vegetativas).

#### 1.2. Experiências preliminares com luminária e com luz solar

As montagens experimentais iniciais foram feitas no sentido de otimizar o protocolo de fotoinativação dos endósporos. Utilizando a luminária (luz artificial) com uma intensidade de  $40 \text{ W.m}^{-2}$  e com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me como PS, os valores de fotoinativação dos endósporos não atingiram 1 log, ao fim de 180 minutos (Figura 14).

A concentração máxima de porfirina ( $60 \mu\text{M}$ ) permitiu a redução em cerca de 1 log em relação ao teor inicial, ao fim de 3 horas de irradiação contínua com luz solar.

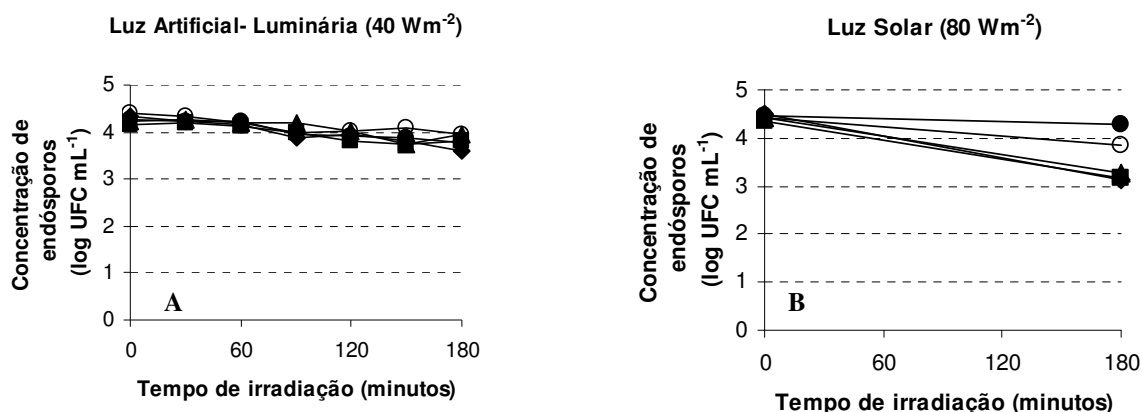


Figura 14 - Sobrevivência de endósporos de *B. cereus* em ensaios de PDI com 10, 30 e  $60 \mu\text{M}$  da porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. A - Irradiação com luz artificial da luminária com intensidade  $40 \text{ W.m}^{-2}$ . B - Irradiação com luz solar com uma intensidade de  $80 \text{ W.m}^{-2}$ .

—○— CC, —●— CE, —■—  $10 \mu\text{M}$ , —▲—  $30 \mu\text{M}$ , —◆—  $60 \mu\text{M}$ .

### 1.3. Irradiação descontínua e irradiação contínua com fibra óptica

Utilizando o TBO como PS, a inativação de endósporos de *B. cereus* obteve factores semelhantes aos obtidos pela irradiação contínua e descontínua, atingindo uma redução próxima de 3 log, ao fim de 75 segundos, com uma concentração de 60  $\mu\text{M}$  (Figura 15).

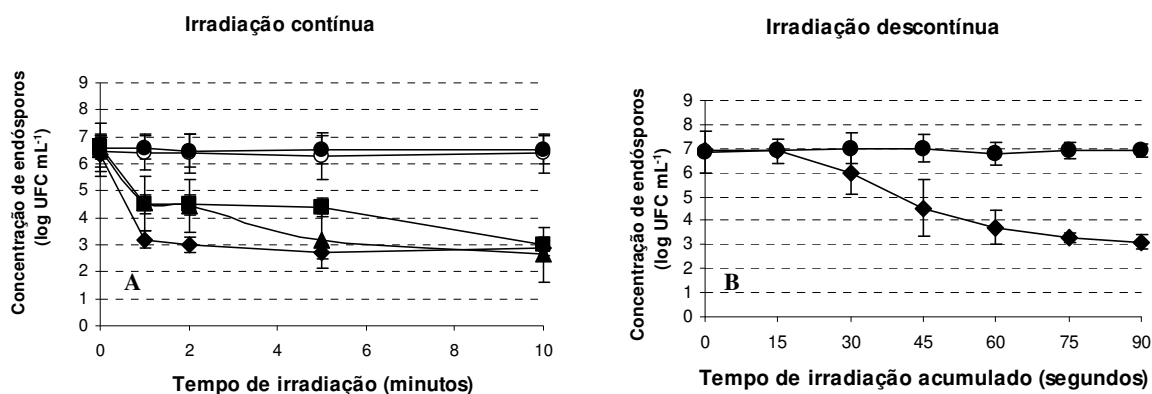


Figura 15 – **A** - Sobrevivência de endósporos de *B. cereus* em ensaios de PDI com irradiação descontínua na presença de 60  $\mu\text{M}$  do corante TBO. **B** - Sobrevivência de endósporos de *B. cereus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  de corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa contínua de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. —○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ .

### 1.4. Experiências com luz de fibra óptica e irradiação contínua

#### 1.4.1. Experiências com 10 a 60 $\mu\text{M}$ de fotossensibilizador (gama alta)

Os resultados dos ensaios de PDI com *B. cereus* são apresentados nas Figuras 16 e 17. A inativação máxima foi atingida com o fotossensibilizador de referência TBO. Com a concentração de 30  $\mu\text{M}$ , e 10 minutos de irradiação, obteve-se uma redução máxima de 3.9 unidades logarítmicas (log) em relação ao teor inicial de endósporos. Com 60  $\mu\text{M}$  de TBO, observou-se uma redução superior a 3 log no teor de endósporos viáveis, após o primeiro minuto de irradiação. O derivado porfirínico neutro Tri-Py-COOH causou apenas a redução de 0.3 log com a máxima concentração testada de PS. As porfirinas monocatiónicas e dicatiónicas provocaram reduzidos valores de inativação, 0.4 e 0.5 log, respectivamente.

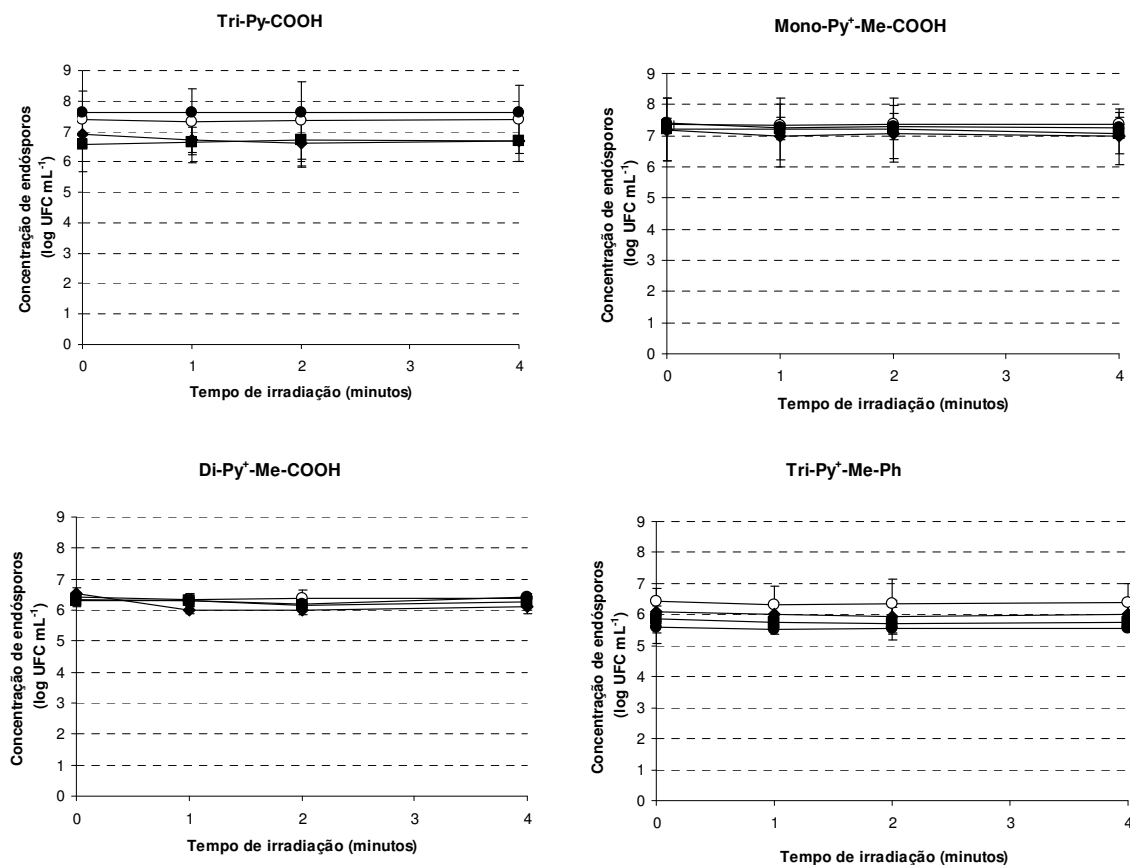


Figura 16 - Sobrevivência de endósporos de *B. cereus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py-COOH, Mono- Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Di-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph. Irradiação com luz branca (400-800 nm) de intensidade 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores representados correspondem à média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. —○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ .

Com a porfirina tricatiónica Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph, mesmo na concentração mais elevada (60  $\mu\text{M}$ ), não se observaram reduções significativas. Pelo contrário, as outras porfirinas tricatiónicas usadas causaram reduções significativas na concentração de endósporos viáveis. O decréscimo foi cerca de 3.1 unidades logarítmicas para a Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, na concentração de 10  $\mu\text{M}$  e 3.5 log com a Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, na concentração de 60  $\mu\text{M}$ .

Com a concentração mais elevada de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF testada nestes ensaios (60  $\mu\text{M}$ ), foi possível obter uma redução superior a 3 log, após o primeiro minuto de irradiação. Com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, a concentração de 10  $\mu\text{M}$  provocou uma inativação equivalente à obtida com a concentração de 60  $\mu\text{M}$ , após 5 minutos de irradiação. A porfirina tetracatiónica Tetra-Py<sup>+</sup>-Me causou uma redução máxima de 3.2 log, com a concentração de 60  $\mu\text{M}$ , após 5 minutos de irradiação.

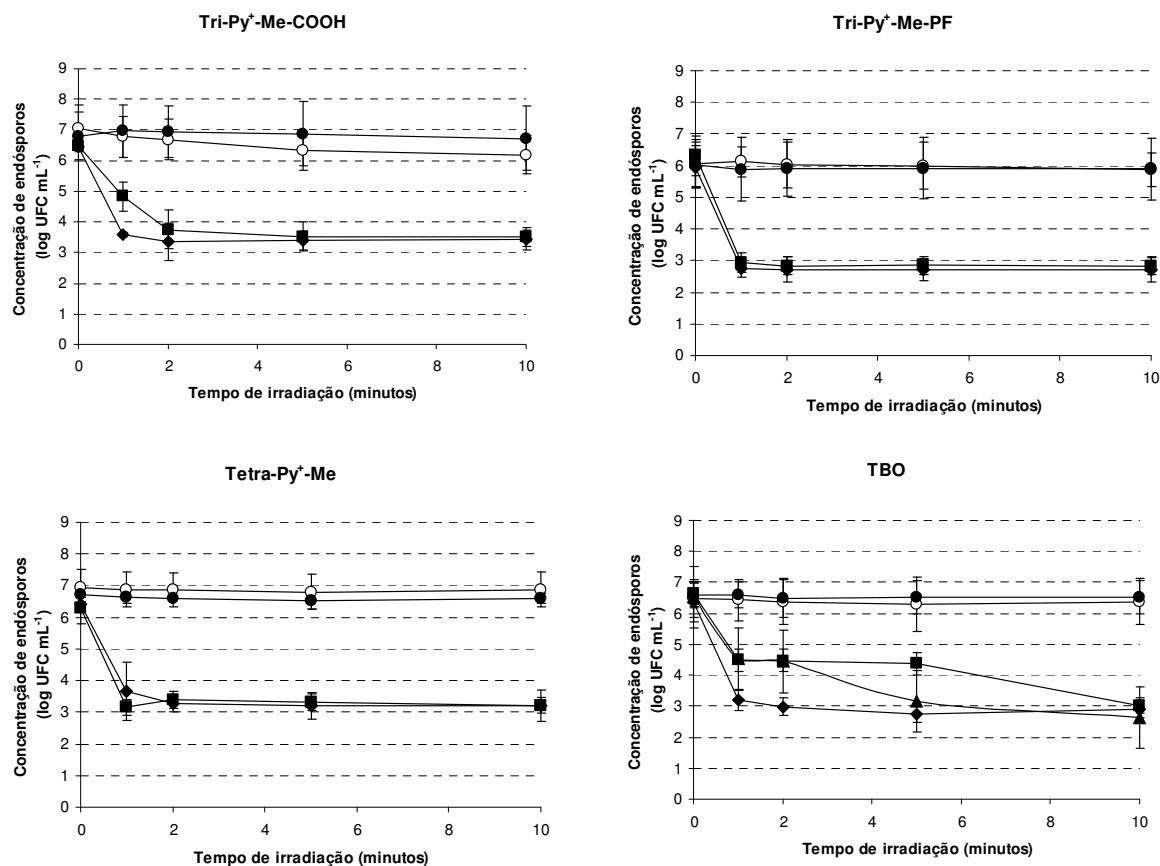


Figura 17 - Sobrevivência de endósporos de *B. cereus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e do corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800 nm) de intensidade 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores representados correspondem à média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ .

#### 1.4.2. Experiências com as concentrações de 0.5 a 5 $\mu\text{M}$ dos fotossensibilizadores Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (gama baixa)

Os resultados dos ensaios de PDI com a gama baixa de concentrações (0.5, 1 e 5  $\mu\text{M}$ ) das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me são apresentados na Figura 18.

A concentração de 5  $\mu\text{M}$  de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me levou a uma redução de 1.9 log após 2 minutos de irradiação. Concentrações inferiores deste PS não inativaram significativamente, após 4 minutos de irradiação (40.7  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

De modo semelhante, as concentrações de 0.5 e 1  $\mu\text{M}$  de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH não causaram fotoinativação apreciável dos endósporos de *B. cereus*. Com 5  $\mu\text{M}$  deste fotossensibilizador, a redução do teor de endósporos viáveis foi de 2.7 log, ao fim de

4 minutos de irradiação. A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF causou redução máxima de 3.3 log na concentração de 5 µM.

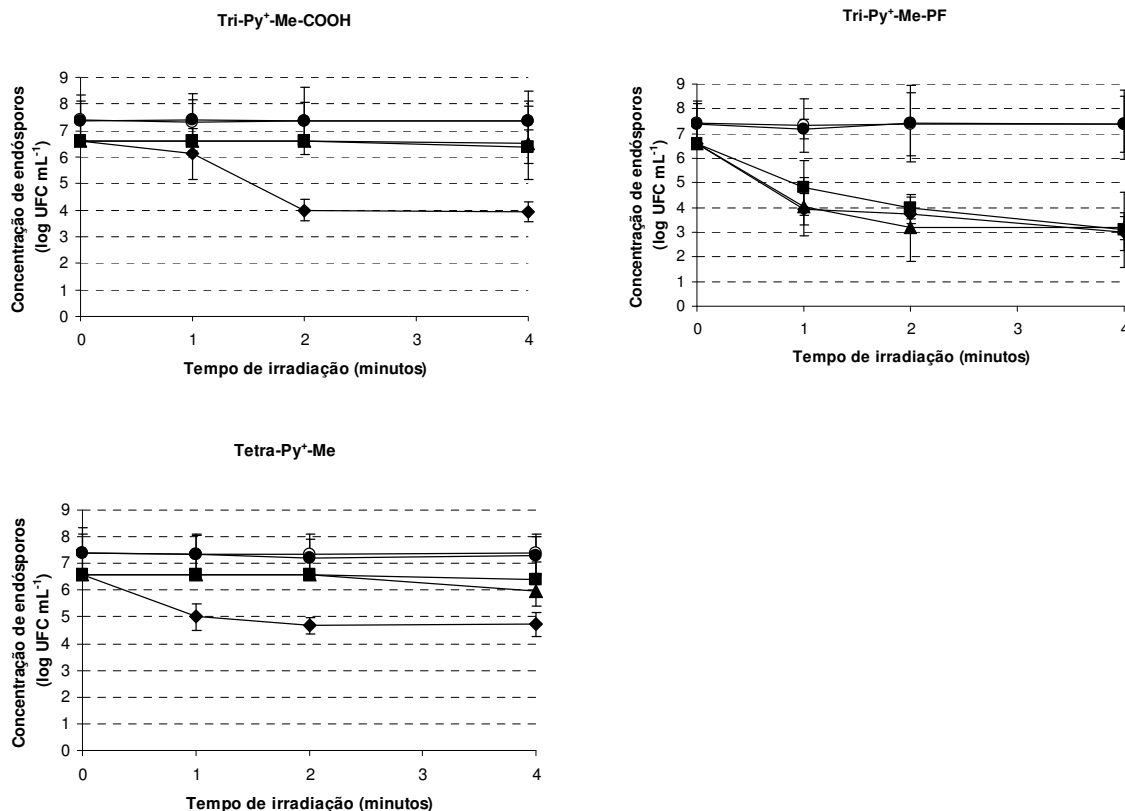


Figura 18 - Sobrevivência de endósporos de *B. cereus* em ensaios de PDI com 0.5, 1 e 5 µM das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Irradiação com luz branca (400-800 nm) a uma intensidade de 1690 Wm<sup>-2</sup>. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 0.5 µM, —▲— 1 µM, —◆— 5 µM.

### 1.5. Alterações morfológicas resultantes do efeito fotodinâmico sobre os endósporos de *Bacillus cereus* (TEM e SEM)

As Figuras 19 e 20 correspondem a fotografias obtidas em microscópio electrónico de varrimento (SEM) e de transmissão (TEM), respectivamente. Em cada conjunto, as imagens referenciadas com A correspondem ao controle claro e as imagens representadas por B correspondem a endósporos submetidos a irradiação após a incubação (adsorção) no escuro na presença de 60 µM de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF. As imagens de SEM põem em evidência a alteração da morfologia com desenvolvimento de forma arredondada ou roseta. Nas imagens de TEM é visível a desorganização do interior/conteúdo do endósporo, a diminuição da sua densidade, bem como a alteração da forma e contorno.

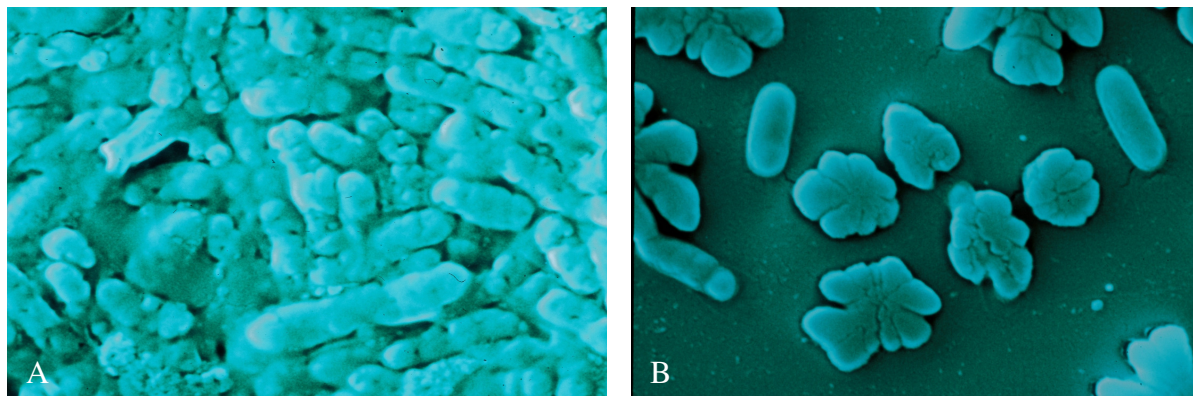


Figura 19 - Imagens de endósporos de *B. cereus* observados em SEM. Após cada tratamento: A - Controle claro; B - Endósporos expostos a 60  $\mu\text{M}$  de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF irradiados com luz branca (400-800 nm) de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ , durante 4 minutos.

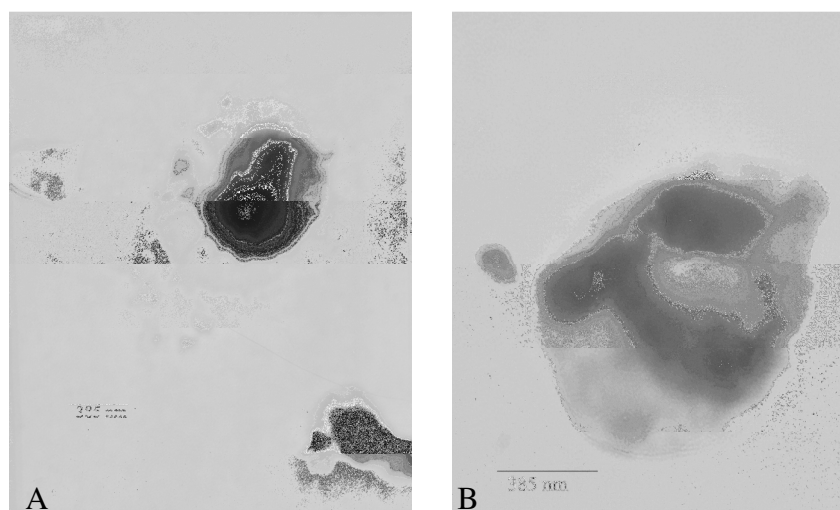


Figura 20 - Imagens de endósporos de *B. cereus* observados em TEM. A – Controle claro; B - Endósporos expostos a 60  $\mu\text{M}$  de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF irradiados com luz branca (400-800 nm) de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ , durante 4 minutos.

### 1.6. Adsorção do PS pelos endósporos de *Bacillus cereus*

Os valores referentes à quantidade dos diferentes fotossensibilizadores porfirínicos adsorvida aos endósporos de *B. cereus* durante as 3 horas de pré-exposição no escuro, na presença de 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me encontra-se resumidos na Tabela 1. A concentração média de PS adsorvido na superfície dos endósporos aumentou com o aumento da concentração de PS. Os valores de PS adsorvido em 3 horas variaram entre  $3.26 \times 10^6$  e  $3.18 \times 10^7$  moléculas por UFC, sendo o valor máximo correspondente à concentração de 60  $\mu\text{M}$  da porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF.

Tabela 1- Quantidade de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me adsorvida a endósporos de *B. cereus* após incubação no escuro, durante 3 h a 37°C, na presença de 10, 30 e 60 µM de fotossensibilizador (moléculas de PS. UFC<sup>-1</sup>).

Fotossensibilizador	Concentração adicionada		
	10 µM	30 µM	60 µM
Tri-Py <sup>+</sup> -Me-COOH	3.26E+06	1.16E+07	2.28E+07
Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF	1.96E+07	1.87E+07	3.18E+07
Tetra-Py <sup>+</sup> -Me	7.32E+06	1.03E+07	1.63E+07

## 2. Inativação de endósporos de outras espécies do género *Bacillus* com TBO e com fotossensibilizadores porfirínicos

### 2.1. *Bacillus subtilis*

Os resultados dos ensaios da fotoinativação de endósporos de *B. subtilis* são apresentados na Figura 21.

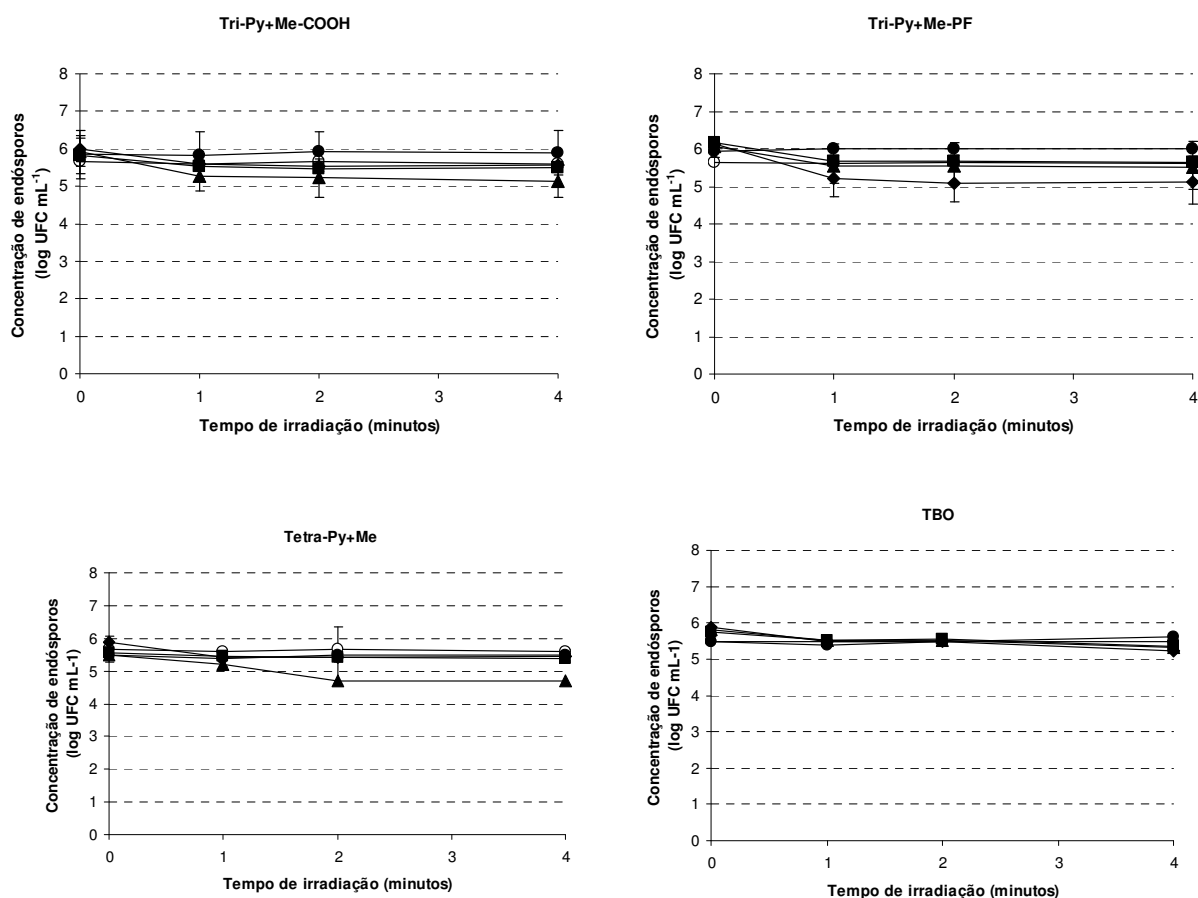


Figura 21 - Sobrevivência de endósporos de *B. subtilis* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60 µM das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e do corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690 Wm<sup>-2</sup>. Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10 µM, —▲— 30 µM, —◆— 60 µM.

A redução máxima de 1 log, na concentração de endósporos, foi obtida com 60  $\mu\text{M}$  de porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF após 2 minutos de irradiação. Com 30  $\mu\text{M}$  de porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH a verificou-se uma inativação máxima de 0.7 log, após 4 minutos de irradiação. Com 30  $\mu\text{M}$  de porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, a redução máxima obtida foi de 0.5 log ao fim de dois minutos de irradiação. O corante TBO revelou-se também com baixo poder de fotoinativação dos endósporos desta espécie. A redução máxima foi de 0.6 log, com 60  $\mu\text{M}$ , após 4 minutos de irradiação.

## 2.2. *Bacillus licheniformis*

Os resultados das experiências de fotoinativação de endósporos de *B. licheniformis* são apresentados na Figura 22.

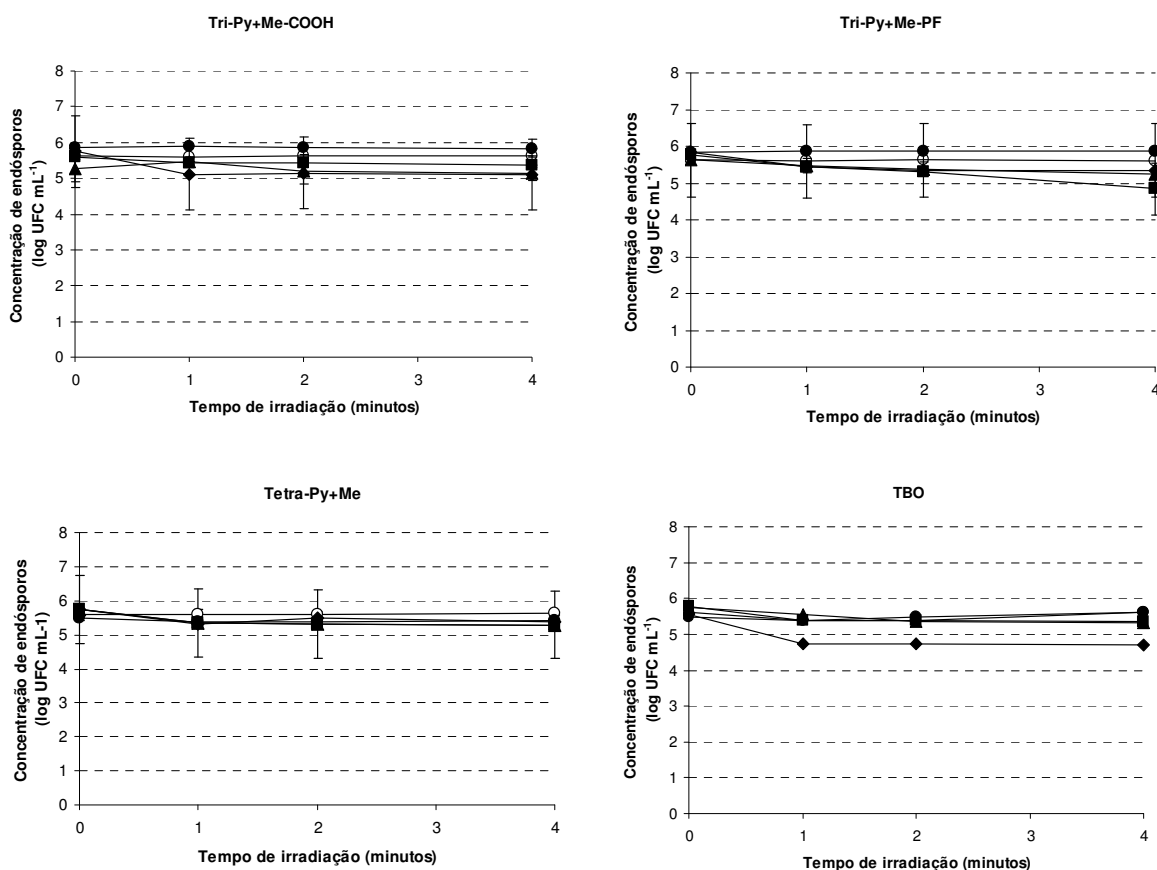


Figura 22 - Sobrevivência de endósporos de *B. licheniformis* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e do corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ .

Com 60  $\mu\text{M}$  da porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, foi observada uma redução de 0.7 log após o primeiro minuto de irradiação. No entanto, com concentrações mais



baixas desta porfirina, os valores de redução da concentração de endósporos viáveis foram muito baixos ( $< 1$  log).

A concentração de  $60 \mu\text{M}$  da porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, levou a uma redução máxima de 0.5 log em relação ao valor inicial de concentração de endósporos, após 4 minutos de irradiação. A porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me conduziu a reduções inferiores a 0.4 log. O corante TBO causou uma redução ligeiramente superior às porfirinas ( $0.9$  log), com a concentração de  $60 \mu\text{M}$ , após 4 minutos de irradiação.

### 2.3. *Bacillus sphaericus*

Os resultados das experiências de fotoinativação de endósporos de *B. sphaericus* são apresentados na Figura 23.

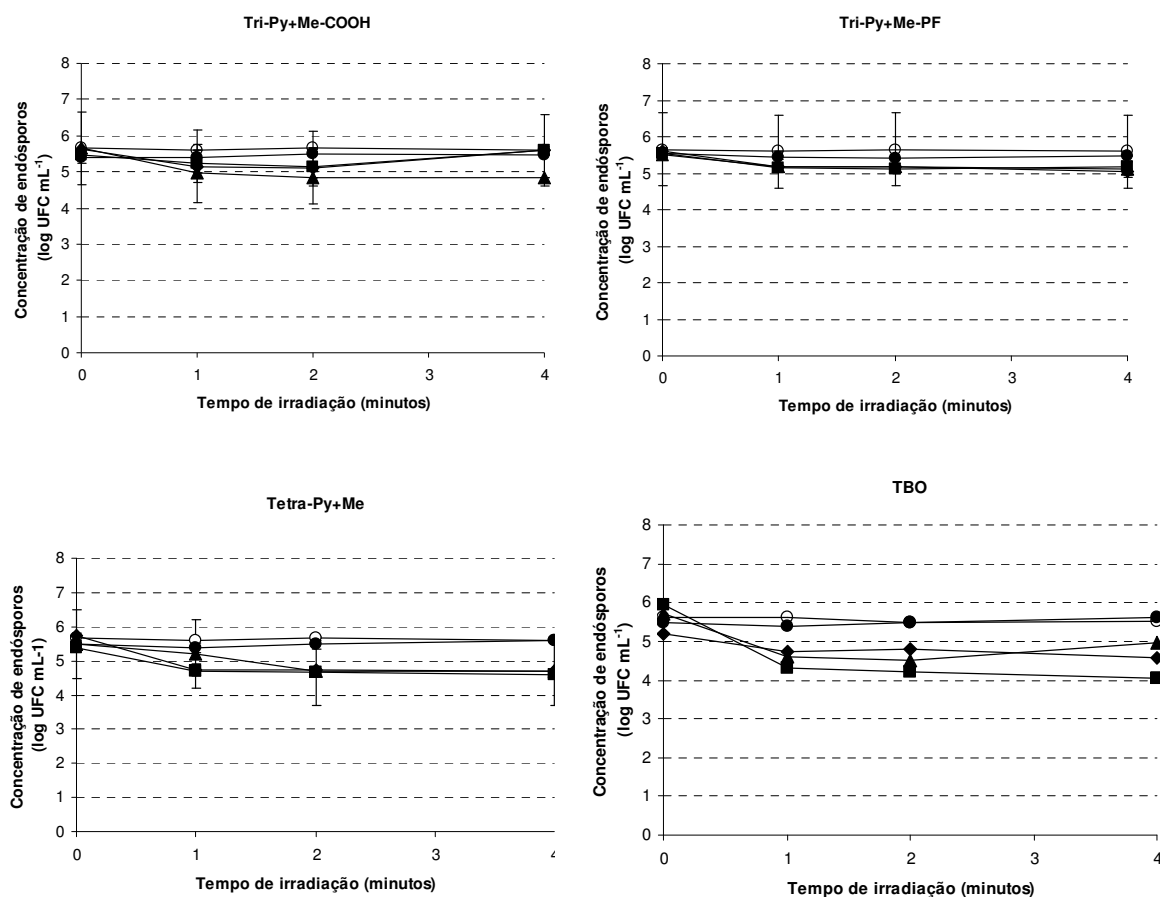


Figura 23 - Sobrevivência de endósporos de *B. sphaericus* em ensaios de PDI com 10, 30 e  $60 \mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de  $1690 \text{ Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.—○— CC, —●— CE, —■—  $10 \mu\text{M}$ , —▲—  $30 \mu\text{M}$ , —◆—  $60 \mu\text{M}$ .

Com  $10 \mu\text{M}$  de TBO foi observada uma redução máxima ( $1.9$  log) na concentração de endósporos viáveis, após 4 minutos de irradiação.

A porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me na concentração de  $60 \mu\text{M}$  e após 4 minutos de

irradiação causou um decréscimo de 1.1 log. A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, na concentração de 30 µM causou uma redução máxima de 0.8 log, após 4 minutos de irradiação. As reduções produzidas pela porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, na concentração de 60 µM foram muito baixas (inferiores a 0.6 log).

Na Tabela 2 encontram-se compilados os valores máximos de fotoinativação obtidos com diferentes fotossensibilizadores porfirínicos sobre endósporos produzidos por espécies do género *Bacillus* após exposição a Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO.

Tabela 2 - Valor máximo de fotoinativação de endósporos produzidos por espécies do género *Bacillus*, com compostos porfirínicos bem como o fotossensibilizador correspondente à inativação máxima.

Amostra de endósporos	Redução máxima (log)	
	Fotossensibilizador porfirínico	Fotossensibilizador porfirínico de referência (TBO)
<i>B. cereus</i>	3.5 (Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF)	3.9
<i>B. subtilis</i>	1.0 (Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF)	0.6
<i>B. licheniformis</i>	0.7 (Tri-Py <sup>+</sup> -Me-COOH)	0.9
<i>B. sphaericus</i>	1.1 (Tetra-Py <sup>+</sup> -Me)	1.9

### 3. Inativação de células vegetativas de espécies do género *Bacillus* com TBO e fotossensibilizadores porfirínicos

#### 3.1. *Bacillus cereus*

Os resultados obtidos nos ensaios de fotoinativação de células vegetativas de *B. cereus* com, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO são apresentados na Figura 24. A redução máxima obtida foi de 6.5 log, obtida com 60 µM de porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, após 15 minutos de irradiação (152.1 J/cm<sup>2</sup>). Com uma concentração semelhante de TBO, a inativação foi da mesma ordem de grandeza (6.4 log). Com os compostos Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, os valores de redução foram menores, (5.7 e 5.3 log, respectivamente). A inativação máxima foi obtida após 10-15 minutos de irradiação.

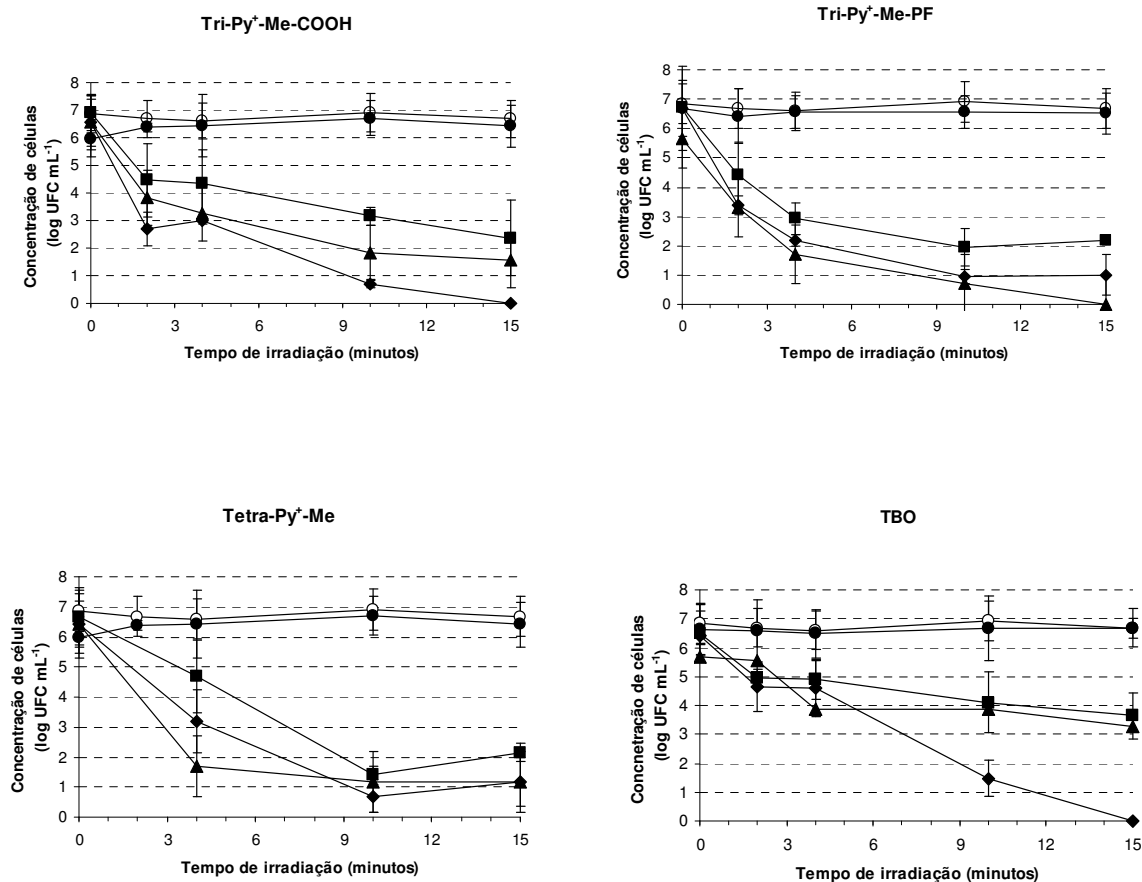


Figura 24 - Sobrevivência de células vegetativas de *B. cereus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60 μM das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690 Wm<sup>-2</sup>. Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.  
 —○— CC, —●— CE, —■— 10 μM, —▲— 30 μM, —◆— 60 μM.

### 3.2. *Bacillus subtilis*

Os resultados das experiências de fotoinativação de células vegetativas de *B. subtilis* com Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO são apresentados na Figura 25. A redução máxima obtida foi de 2.2 log, com 60 μM de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, após 15 minutos de irradiação. A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, na concentração de 30 μM, causou a redução de 2 log, após 15 minutos de irradiação. Com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, os valores de redução foram inferiores a 1.6 log, para a concentração de 60 μM e após 15 minutos de irradiação.

No entanto, para a concentração de 10 μM da porfirina tetracatiônica, foram atingidos valores de redução na ordem dos 2 log, ao fim de 2 minutos de irradiação. TBO foi o fotossensibilizador mais eficaz, causando uma redução de 3.6 log com 10 e

30  $\mu\text{M}$ , após 15 minutos de irradiação.

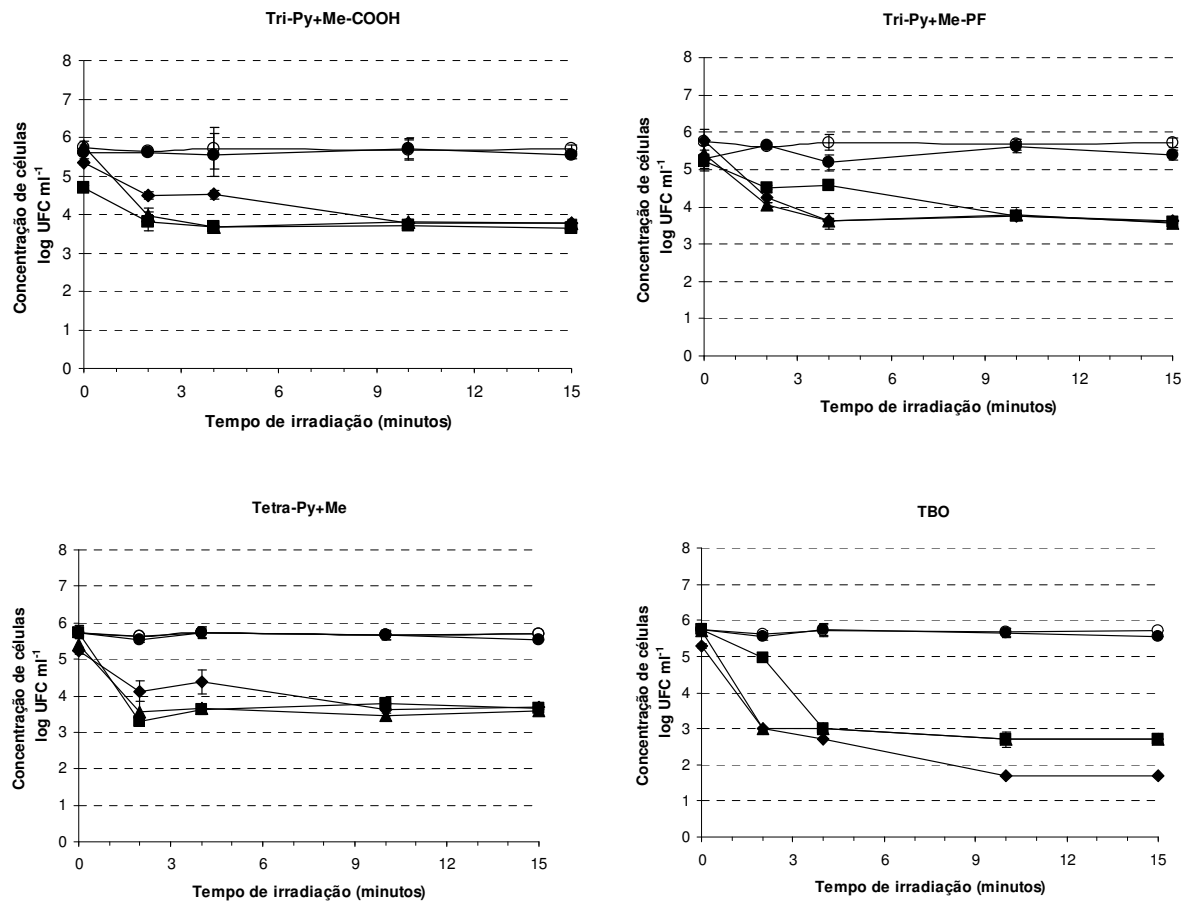


Figura 25 - Sobrevivência de células vegetativas de *B. subtilis* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60  $\mu\text{M}$  das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690  $\text{Wm}^{-2}$ . Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.  
 —○— CC, —●— CE, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ .

### 3.3. *Bacillus licheniformis*

Os resultados obtidos nos ensaios de fotoinativação de células vegetativas de *B. licheniformis* com Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO são apresentados na Figura 26.

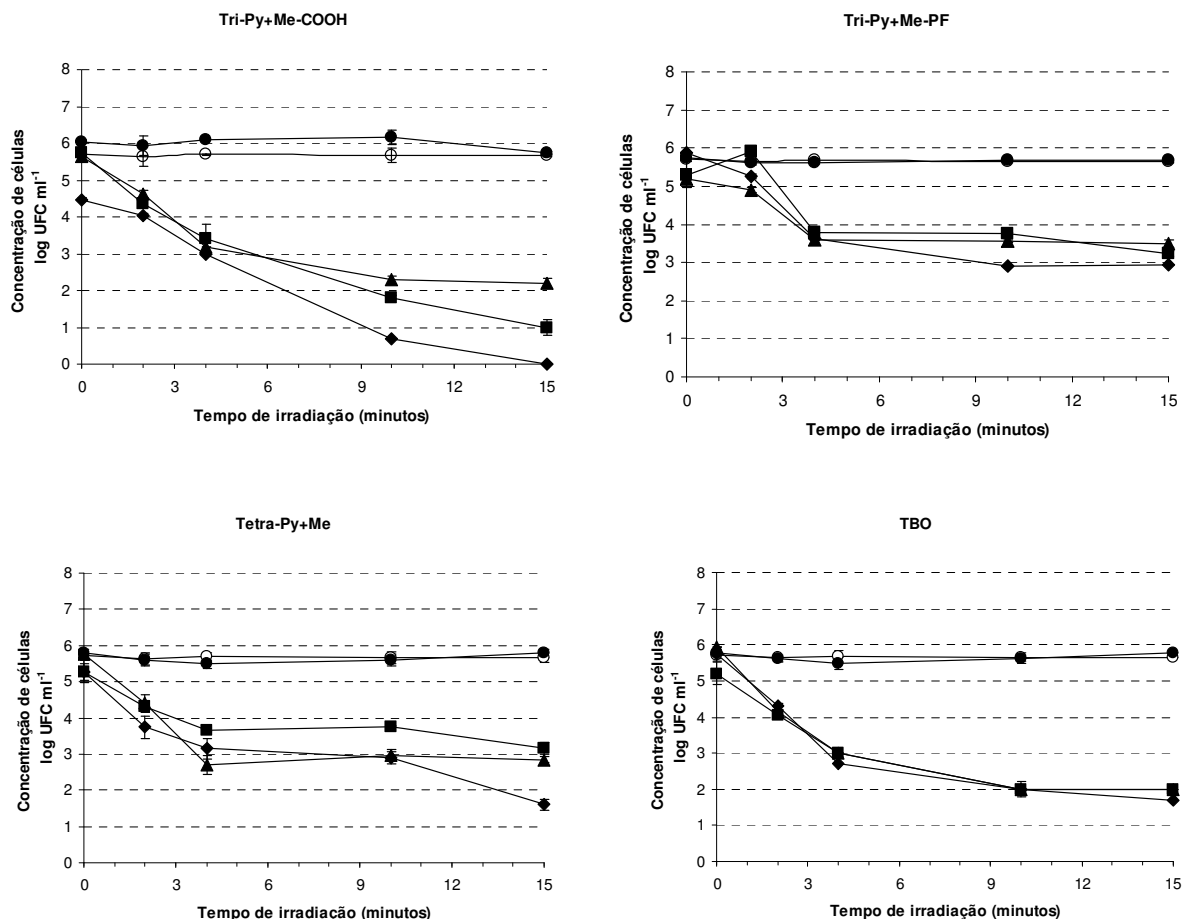


Figura 26 - Sobrevivência de células vegetativas de *B. licheniformis* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60 μM das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690 Wm<sup>2</sup>. Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

—○— CC, —●— CE, —■— 10 μM, —▲— 30 μM, —◆— 60 μM.

A maior redução do teor de células viáveis foi de 4.5 log, obtida com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, após 15 minutos de irradiação. Todas as concentrações testadas para este composto produziram inativação da mesma ordem de grandeza. A porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me aplicada na concentração de 60 μM causou uma redução máxima de 3.7 log, após 15 minutos de irradiação. Para a máxima concentração testada, a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF causou uma redução de 2.9 log, em relação à concentração inicial de células vegetativas. O corante TBO na concentração de 60 μM causou reduções elevadas (4.0 log), após 15 minutos de irradiação.

### 3.4. *Bacillus sphaericus*

Os resultados obtidos nos ensaios de fotoinativação das células vegetativas de *B. sphaericus* com Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO são apresentados na Figura 27.

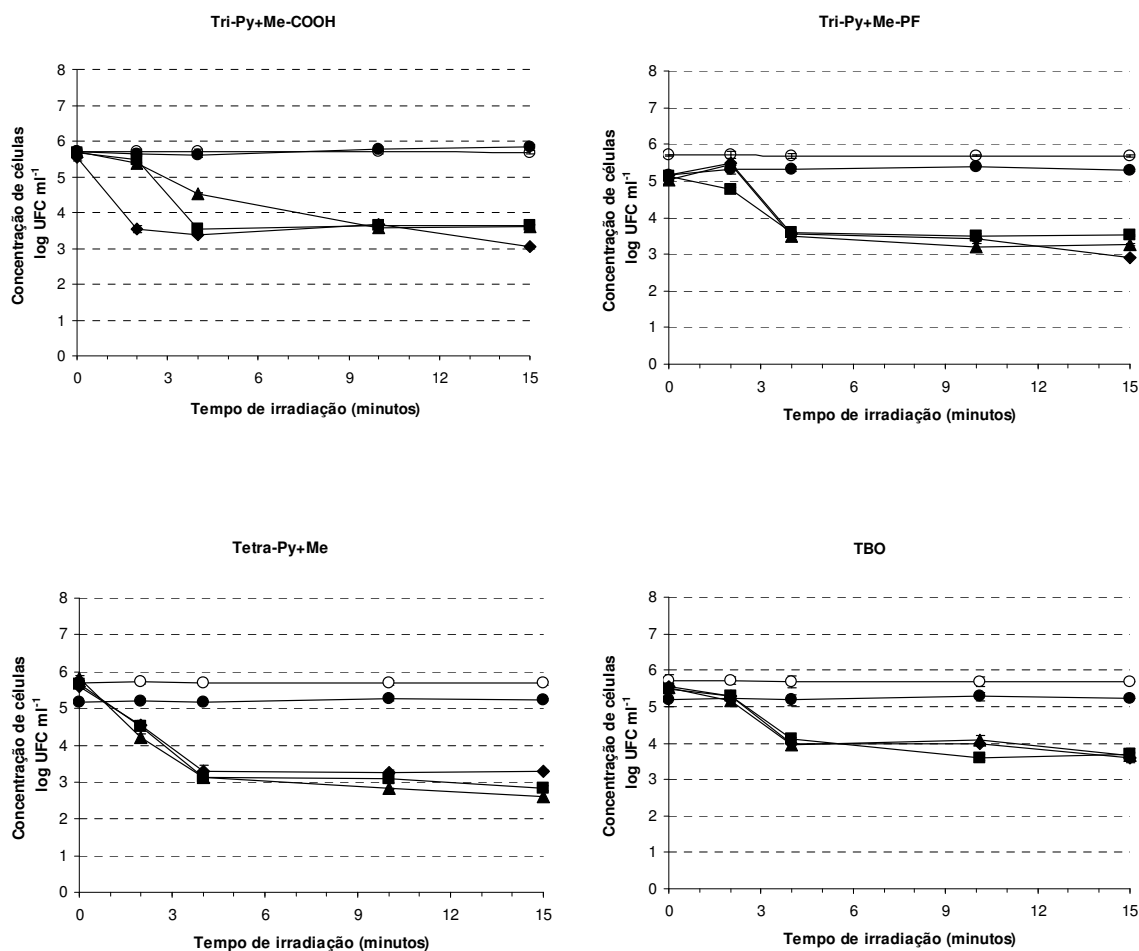


Figura 27 - Sobrevivência de células vegetativas de *B. sphaericus* em ensaios de PDI com 10, 30 e 60 μM das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e o corante TBO. Irradiação com luz branca (400-800nm) a uma intensidade luminosa de 1690 Wm<sup>-2</sup>. Os valores correspondem a uma média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.  
—○— CC, —●— CE, —■— 10 μM, —▲— 30 μM, —◆— 60 μM.

A porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me na concentração de 30 μM, provocou uma redução de 3.2 log após 15 minutos de irradiação. Com 60 μM da porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, obteve-se uma redução de 2.5 log, após 15 minutos de irradiação. As concentrações mais baixas causaram taxas de redução inferiores a 2 log. A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF na concentração de 60 μM resultou numa redução de 2.2 log após 15 minutos de irradiação. O TBO levou a uma redução máxima de 1.9 log, após 15 minutos de irradiação e na concentração máxima testada.

Na Tabela 3 encontram-se compilados os valores máximos de fotoinativação obtidos com diferentes fotossensibilizadores porfirínicos sobre células vegetativas de espécies do género *Bacillus*, na presença de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e TBO.

Tabela 3 - Valor máximo de fotoinativação de células vegetativas, de espécies do género *Bacillus*, com compostos porfirínicos bem como o fotossensibilizador correspondente à inativação máxima.

Redução máxima (log)		
Amostra de células vegetativas	Fotossensibilizador porfirínico	Fotossensibilizador porfirínico de referência (TBO)
<i>B. cereus</i>	<b>6.5</b> (Tri-Py <sup>+</sup> -Me-COOH)	<b>6.4</b>
<i>B. subtilis</i>	<b>2.2</b> (Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF)	<b>3.6</b>
<i>B. licheniformis</i>	<b>4.5</b> (Tri-Py <sup>+</sup> -Me-COOH)	<b>4.0</b>
<i>B. sphaericus</i>	<b>3.2</b> (Tetra-Py <sup>+</sup> -Me)	<b>1.9</b>





## DISCUSSÃO

### 1. Eficácia das porfirinas como fotossensibilizadores na inativação de endósporos de *Bacillus cereus*

Este trabalho foi desenvolvido sobre a hipótese de que as modificações introduzidas nos derivados porfirínicos, anteriormente testados

noutros estudos, poderiam melhorar o potencial fotoinibitório sobre endósporos e células bacterianas correspondentes. As técnicas de PDI já aplicadas, revelam sucesso limitado no que diz respeito ao uso de derivados porfirínicos como fotossensibilizadores de endósporos. Está no entanto demonstrada que a eficiência na inativação de microrganismos (bactérias e vírus) por fotossensibilizadores, em particular os de tipo porfirínico, é dependente da estrutura das moléculas, número de cargas presentes, natureza de grupos substituídos em posição *meso* e a sua natureza anfifílica (Merchat et al., 1996; Reddi, 2002; Hamblin e Hasan, 2004; Tomé et al., 2004; Tomé et al., 2007; Magaraggia et al., 2006, Costa et al., 2008).

Vários derivados porfirínicos diferindo no número de cargas e nos grupos presentes em *meso* foram testados e os seus efeitos fotoinibitórios interpretados em comparação com os obtidos com o corante azul de toluidina (TBO), um fotossensibilizador eficaz sobre endósporos de *B. cereus*, e com um derivado porfirínico tricatiónico Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph, não eficaz como PS (Demidova e Hamblin, 2005a). Os compostos tri e tetracatiónicos seleccionados como promissores foram posteriormente testados em células vegetativas e endósporos de diferentes espécies do género *Bacillus*, de modo a confirmar o seu efeito fotossensibilizador em situações de contaminação com células e endósporos.

Tal como já descrito na bibliografia para a inativação de bactérias e vírus, os compostos catiónicos, em particular os tri e tetra-catiónicos, revelaram maior eficiência do que os derivados neutros. Confirmou-se ainda a reduzida eficiência da porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph testada por Demidova e Hamblin (2005) na fotoinativação de endósporos. De acordo com a máxima redução obtida da concentração de endósporos viáveis, os derivados porfirínicos fotossensibilizadores (PS) podem ser organizados por ordem decrescente: TBO > Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF > Tetra-Py<sup>+</sup>-Me ≈ Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH >>> Tri-Py-COOH ≈ Mono-Py<sup>+</sup>-COOH ≈ Di-Py<sup>+</sup>-Me-COOH ≈ Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph. As duas porfirinas tricatiónicas com o grupo de substituição na posição *meso*, causaram maior inativação. Contudo, a PDI dos endósporos com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF ocorreu com períodos de irradiação menores, estabelecendo-se este PS como o mais promissor. As diferenças

entre as duas porfirinas tricatiónicas promissoras Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH também foram detectadas nos ensaios com concentrações menores. A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF causou PDI na concentração mais baixa testada (0.5 μM), enquanto que com a Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, a fotoinactivação só ocorre a concentrações iguais ou superiores a 5μM.

As porfirinas catiónicas permitem a fotoinactivação de bactérias Gram positivas, Gram negativas e vírus, de modo mais eficiente do que as neutras, devido à melhoria das interacções com a membrana externa impermeável (Merchat et al., 1996; Lazzeri et al., 2004; Caminos et al., 2005; Demidova e Hamblin, 2005b). Neste trabalho, uma das porfirinas tricatiónicas (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) mostrou-se mais eficaz do que o composto tetracatiónico, pondo em evidência que a relação entre as cargas das moléculas e o seu potencial de fotoinactivação não é sempre linear (Carvalho et al., 2007; Costa et al., 2008).

A quantificação da porfirina ligada ao revestimento dos endósporos teve como objectivo testar a hipótese de que diferenças de eficiência dos derivados porfirínicos poderiam estar relacionadas com diferenças de afinidade do PS em relação ao endósporo. A quantidade de porfirinas tri e tetracatiónicas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me ligadas aos endósporos durante o passo da adsorção, indicou pequenas diferenças de afinidade entre os vários PS. A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF apresentou maior capacidade/afinidade para adsorver ao invólucro do endósporo. A quantidade de PS adsorvido bem como a estabilidade de ligação e a partição do PS entre as diferentes camadas do endósporo, poderão pois ter contribuído para a diferente eficiência dos derivados tri e tetracatiónicos.

Os grupos presentes nas posições *meso* do macrociclo porfirínico parecem desempenhar um papel importante no processo de fotoinactivação dos endósporos. As porfirinas tricatiónicas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph e Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH diferem estruturalmente apenas num dos grupos arilo ligado à posição *meso*. Na Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF o grupo arilo é constituído por um fenilo substituído por cinco átomos flúor enquanto que no derivado Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph é apenas o grupo fenilo que se encontra ligado na posição *meso*. No caso do derivado Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, o grupo arilo é constituído por um grupo fenilo substituído na posição *para* por um grupo carboxilo. Demidova e Hamblin (2005) haviam já testado sem sucesso o derivado tricatiónico Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph na forma de cloreto, num trabalho pioneiro com endósporos bacterianos. No entanto, é reconhecido que alterações estruturais, como é o caso da ligação de uma cadeia de polilisina, aos derivados porfirínicos, podem aumentar a sua eficácia antimicrobiana. O

conjugado porfirina-polilisina é tido como mais eficiente na inativação de bactérias Gram positivas e Gram negativas do que os seus precursores porfirínicos não conjugados (Tomé et al., 2004). Os resultados confirmam que pequenas mudanças na molécula podem afectar significativamente as interações entre os PS e as estruturas e compostos alvo como a parede celular, ácidos nucleicos, péptidos, lípidos entre outros (Lazzeri et al., 2004).

A taxa de inativação observada com os diferentes compostos fotossensibilizadores sugere que o número de cargas positivas, mas também a natureza dos grupos *meso*, influenciam a PDI dos endósporos, sendo o grau de eficiência dos compostos contra endósporos variável entre espécies do mesmo género.

## **2. Cinética da fotoinativação**

Nos ensaios de PDI com os endósporos do género *Bacillus*, a inativação ocorreu maioritariamente nos minutos iniciais (1-2 minutos) de irradiação, atingindo depois um patamar estável, que se manteve com a continuação da irradiação. Nos ensaios com o corante TBO, em que a irradiação foi conduzida de modo descontínuo, em pulsos de 15 segundos separados por intervalos de 1 minuto no escuro, um patamar semelhante de inativação dos endósporos ocorreu após 90 segundos de irradiação. A falta de linearidade temporal no processo de PDI, poderia resultar da baixa estabilidade (photobleaching) dos PS, sob a irradiação. Contudo, ensaios preliminares de análise da fotoestabilidade indicam que as moléculas PS são estáveis (Carvalho, comunicação pessoal), não ocorrendo a destruição do macrociclo tetrapirrólico, sob as condições de irradiação utilizadas nos ensaios de fotoinativação. Os ensaios de PDI em células vegetativas, resultaram em perfis de inativação diferentes dos observados para os endósporos em idênticas condições de irradiação e de concentração de PS. Na inativação de células vegetativas o patamar é atingido, em alguns casos, após 9 minutos de irradiação, ou, noutros casos, não é de todo atingido após 15 minutos de irradiação. Esta observação, confirma a fotoestabilidade dos fotossensibilizadores porfirínicos.

A possibilidade de ocorrer a libertação do PS adsorvido aos endósporos durante a irradiação, por estar adsorvido de forma pouco firme, foi também considerada. No entanto, a ocorrência de uma plataforma de inativação foi observada em ensaios preliminares, em que a irradiação, decorreu na presença de PS em solução no meio de suspensão, sem que tenha sido feita uma lavagem após o período de pré-adsorção no

escuro. Nestas condições, seria de esperar durante a experiência, um equilíbrio entre adsorção e desadsorção do PS não se justificando assim, a perda de fotossensibilizador na parede dos endósporos.

A interferência da acumulação de produtos resultantes dos danos da fotoinativação no invólucro dos endósporos, pode estar relacionada com o efeito de estabilização de inativação. Estes resíduos podem funcionar como *quencher*s de radicais hidroxilo e de oxigénio singleto (Vohra et al., 2005; Grinshpun et al., 2007), inibindo o efeito fotodinâmico.

### **3. Alvos estruturais envolvidos na inativação**

O mecanismo de inativação dos endósporos com compostos porfirínicos é ainda desconhecido, embora tenha sido já demonstrado que os endósporos de *B. subtilis* são susceptíveis a agentes que produzem espécies reactivas de oxigénio (Setlow et al., 2002; Demidova e Hamblin, 2005a).

Os derivados porfirínicos são moléculas pequenas e planas que podem intercalar-se no DNA (Hamblin e Hasan, 2004). A força da ligação parece aumentar com o número de cargas positivas e os danos letais foto-oxidativos podem resultar da quebra e perda de fragmentos das cadeias de DNA (Ramos et al., 2005). No caso dos endósporos bacterianos, o acesso do PS ao DNA poderá ser limitado pela permeabilidade da parede dos seus invólucros a cada PS. A susceptibilidade aos efeitos fotoinibitórios pode resultar da intensidade de ligação do PS ao endósporo, da sua penetração numa extensão suficiente para provocar danos nos componentes principais e também da possibilidade de afectar o processo germinativo do endósporo, diminuindo a sua viabilidade e durabilidade (Russel, 2003).

As imagens de SEM e TEM de endósporos de *B. cereus* sujeitos a PDI, evidenciam que após os tratamentos, uma fracção significativa dos endósporos fica destruída e que estes mostram sinais de aglomeração e de desorganização do invólucro. A capacidade dos endósporos rapidamente alterarem o seu volume, expandido ou contraíndo, em resposta ao stresse químico, sem quebrar a dormência, tem sido já referida em diferentes estudos (Dricks, 2003; Westphal et al., 2003; Plomp et al., 2005). O exospório, capa e córtex podem suportar estas variações sem ocorrer a destruição do endósporo, podendo no entanto em extremo levar à perda de viabilidade. Não tendo sido estudados os efeitos ao nível do DNA, as observações de microscopia apontam para a ocorrência de alterações visíveis ao nível do invólucro dos endósporos, designadamente do exospório.

#### 4. Variação inter-específica da susceptibilidade à inativação fotodinâmica com porfirinas

##### 4.1. Inativação de endósporos

A cinética de inativação fotodinâmica das diferentes espécies de *Bacillus* com as diferentes porfirinas foi variável. De acordo com a eficiência sobre as várias espécies testadas, os PS podem ser organizados do seguinte modo: *B. cereus* - TBO > Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF > Tetra-Py<sup>+</sup>-Me ≈ Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH ; *B. subtilis* - Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF > Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH > TBO > Tetra-Py<sup>+</sup>-Me; *B. licheniformis* - TBO > Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH > Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF > Tetra-Py<sup>+</sup>-Me; *B. sphaericus* - TBO > Tetra-Py<sup>+</sup>-Me > Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH > Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF.

A cinética de fotoinativação dos endósporos de *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* foi semelhante, sendo as porfirinas tricatiônicas (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH e Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) os fotossensibilizadores mais eficientes. O efeito do número das cargas positivas parece ter maior influência no potencial fotoinibitório de endósporos de *B. sphaericus*, uma vez que a porfirina tetra-catiônica (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) foi a mais eficiente na sua fotoinativação.

Mais do que reflectir diferenças na afinidade filogenética, a distinta sensibilidade dos endósporos das várias espécies de *Bacillus* usadas neste estudo, poderá estar relacionada com as particularidades estruturais do próprio endósporo, característica da espécie. Enquanto que o tipo de processo fotodinâmico é determinado pela classe do PS, o modo de actuação ao nível celular está mais relacionado com os componentes celulares pelos quais exhibe mais afinidade (Wainwright, 1998). Algumas espécies produzem endósporos que se caracterizam pela presença de exospório. Esta estrutura, em *B. cereus*, é composta por duas camadas principais: uma camada mais externa que é constituída por uma rede de projecções semelhantes a pêlos e uma camada interna com um padrão superficial de orifícios hexagonais (Gerhardt e Ribí, 1964). É possível que a presença do exospório esteja envolvida na elevada acumulação de fotossensibilizadores nos endósporos de *B. cereus* e de *B. sphaericus*. Esta pode ser uma possível explicação para a elevada taxa de PDI observada para *B. cereus*. A presença de exospório permitiria reter mais PS e potenciar a sua penetração no endósporo, aumentando o efeito fotodinâmico letal, tornando esta espécie mais susceptível aos efeitos da PDI. As espécies não possuidoras de exospório como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Bailey-Smith et al., 2005) foram mais resistentes à PDI do que *B. cereus*.

Para além das diferenças estruturais relacionadas com a presença de exospório,

existem outros factores bioquímicos que podem modelar a resposta de endósporos das diferentes espécies à fotoinactivação. A permeabilidade do núcleo do endósporo, o teor de água, a concentração intracelular de minerais, a concentração de proteínas  $\alpha$  e  $\beta$  associadas ao DNA, a concentração de SASP e a eficácia dos mecanismos de reparação, são factores que, embora não analisados neste estudo, podem contribuir de forma decisiva para a variabilidade interespecífica da susceptibilidade à PDI (Nicholson et al., 2000).

#### **4.2. Inactivação de células vegetativas**

As células vegetativas foram, como o esperado, muito mais susceptíveis à PDI do que os endósporos produzidos pela mesma espécie. A taxa de inactivação variou para cada espécie do género *Bacillus* estudada, com a carga da porfirina e também com os grupos *meso*.

A PDI de bactérias Gram positivas com derivados porfirínicos catiónicos e neutros tinha sido já demonstrada (Caminos et al., 2005; Hamblin e Hasan, 2004; Demidova e Hamblin, 2005 b; Lazzeri et al., 2004; Carvalho et al., 2007). Nos anos 90, demonstrou-se a diferença na resistência à PDI entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Foi concluído que, em geral, os compostos PS neutros ou aniónicos se ligavam eficazmente e eram fotodinamicamente activos nas bactérias Gram positivas. Esta maior susceptibilidade das espécies Gram positivas tem sido relacionada com a sua constituição, uma vez que têm uma membrana citoplasmática rodeada por uma camada porosa de peptidoglicano e ácidos lipotéticos que permitem uma ligação mais forte com as moléculas de PS. As bactérias Gram negativas apresentam uma camada de peptidoglicano menos espessa e uma membrana externa de lipopolissacarídeos. A membrana externa actua como uma barreira física e funcional entre a célula e o exterior, e contém proteínas, que podem funcionar como poros permitindo a passagem de nutrientes, ter uma função enzimática, ou uma função estrutural preservando a integridade a forma da célula. A molécula de oxigénio singuleto resultante da PDI pode causar danos na membrana citoplasmática da bactéria, libertando para o exterior o conteúdo celular, conduzindo à destruição da bactéria (Dahl et al., 1989). Os danos no DNA também podem levar à perda de viabilidade das células bacterianas (Hamblin et al., 2002). Os danos directos na membrana celular das células vegetativas foram já demonstrados com utilização de corantes da família das fenotiazinas, como o TBO (Demidova e Hamblin, 2005b).

Nas experiências com células vegetativas de *B. cereus*, a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH causou a maior inativação (redução de 6.5 log). Contudo, a reação não estabilizou durante os 15 minutos de irradiação, indicando que valores mais elevados de inativação poderiam ter sido atingidos. O efeito do número de cargas positivas, na inativação de células vegetativas, não pode ser estabelecido de forma inequívoca, uma vez que os resultados são muito variáveis entre espécies. Dos compostos porfirínicos testados em células vegetativas, a porfirina tetracatiônica apresentou valores mais baixos de fotoativação em *B. cereus* e foi também pouco eficaz em *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Na inativação de *B. sphaericus*, a porfirina tetracatiônica apresentou uma maior taxa de fotoativação, atingindo cerca de 3 log. Tal como na inativação de endósporos, também na inativação de células vegetativas houve diferenças entre os dois compostos tricatiônicos Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH e Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, o que aponta novamente para a relevância da natureza dos grupos de *meso*-substituição (Boyle e Dolphin, 1996; Lazerry et al., 2004). As células vegetativas de *B. subtilis* e *B. licheniformis* apresentaram idêntica susceptibilidade à fotoativação com porfirinas tricatiônicas, o que pode estar relacionado com a sua proximidade em termos filogenéticos, com base na análise da região V1 a V3 do gene 16S do rRNA (Blackwood et al., 2004).

O género *Bacillus* engloba cerca de 83 espécies. A identificação molecular tem vindo a progredir, no sentido de otimizar técnicas que permitam relacionar filogeneticamente as espécies (Blackwood et al., 2004). Métodos baseados na análise de sequências do gene 16S do RNA ribossomal, ou RAPD, são bastante limitadores na discriminação de grandes grupos de espécies. Actualmente, não há consenso sobre o método mais eficiente para usar a filogenia como ferramenta da classificação de espécies do género *Bacillus* (Blackwood et al., 2004). Os resultados obtidos com padrões de restrição de genes de RNA ribossomal são incongruentes com os obtidos por sequenciação de genes 16S rRNA (Joung e Côte, 2002). Com os padrões de restrição do gene 16S rRNA as relações filogenéticas sugerem que as espécies *B. cereus* e *B. licheniformis* são mais próximas do que *B. subtilis* e o *B. sphaericus*. Com os padrões de restrição dos genes 23S e 5S do rRNA, as espécies *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. sphaericus* parecem estar mais próximas entre si do que de *B. subtilis*. Com a combinação das duas técnicas, as espécies de *B. cereus* e *B. licheniformis* estão mais próximas filogeneticamente, do que as espécies de *B. subtilis* e *B. sphaericus* (Joung e Côte, 2002). O estudo da região V1-V3 do gene 16S rRNA aponta para uma maior

proximidade filogenética das espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis* e entre *B. cereus* e *B. sphaericus* (Blackwood et al., 2004).

Ao contrário do que acontece com a cinética de fotoinativação das células vegetativas, que sugere a aproximação entre as espécies de *B. licheniformis* e *B. subtilis* (Blackwood et al., 2004), de acordo com a proximidade filogenética, a cinética de inativação de endósporos, não reflecte as relações filogenéticas.

## **5. Perspectivas quanto à aplicação de porfirinas na inativação de endósporos**

A produção de endósporos permite às bactérias a sobrevivência em condições ambientais extremas, por longos períodos de tempo, sendo por isso de grande importância ecológica (Nicholson, 2002; Demidova e Hamblin, 2005a). Atendendo à sua ocorrência e persistência em todo o tipo de ambientes, os endósporos bacterianos são relevantes como contaminantes alimentares (Cronin e Wilkinson, 2008), agentes infecciosos e até como armas biológicas (Atlas, 2002; Setlow, 2005). A inativação fotodinâmica de endósporos bacterianos tem sido encarada como uma técnica promissora para áreas como na saúde humana, segurança alimentar e qualidade ambiental.

Este estudo revelou que, ao contrário do que até aqui tinha sido demonstrado, as porfirinas têm potencial fotoinibitório sobre endósporos bacterianos. Até ao momento, apenas tinha sido demonstrado a inativação de endósporos por um corante do grupo das fenotiazinas, o TBO. No entanto, as alterações introduzidas nas porfirinas, quer pela adição de cargas, quer por grupos funcionais, podem melhorar o seu potencial fotoinibitório.

*B. cereus* é muitas vezes usado como modelo, em estudos de inativação, uma vez que tem grandes afinidades estruturais com *B. anthracis*, mas não o mesmo grau de risco para a saúde humana (Rasko et al., 2004). Os endósporos de *B. cereus* e *B. anthracis* apresentam uma estrutura superficial muito semelhante entre si e possuem ambos exospório, sendo consideradas espécies próximas em termos filogenéticos (Chada et al., 2003; Rdnædge et al., 2003; Blackwood et al., 2004). Atendendo a esta relação, pode admitir-se que a susceptibilidade dos endósporos de *B. anthracis* aos efeitos fotoinibitórios destes compostos porfirínicos, poderá ser semelhante à de *B. cereus*. Neste contexto, os estudos com *B. cereus* podem servir de rastreio de compostos potencialmente interessantes que, numa fase posterior, teriam que ser testados sobre *B. anthracis*, atendendo à sua importância e elevado risco como agente infeccioso.



## CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que alterações/modificações adequadas na carga e na estrutura das porfirinas podem resultar em aumentos significativos do seu potencial de fotoinactivação de endósporos bacterianos.

Os grupos *meso* na estrutura das porfirinas parecem ter efeitos diferentes na fotoinactivação. Os derivados tricatiónicos com grupos de substituição fenil foram eficientes na fotoinactivação de endósporos de *Bacillus* e células vegetativas, em especial em *B. cereus*, neste estudo utilizado como modelo representativo de outras espécies de maior risco biológico como é o caso de *B. anthracis*. A inactivação de células vegetativas de *Bacillus* foi consideravelmente mais elevada do que a inactivação de endósporos, sendo os factores de inactivação praticamente o dobro dos obtidos com endósporos da mesma espécie, com o mesmo PS e condições de irradiação equivalentes. Os PS testados não revelaram indícios de toxicidade na ausência de luz.

Não foi possível concluir sobre o mecanismo de inactivação dos endósporos, que permanece ainda pouco conhecido. No entanto, as imagens de microscopia electrónica apontam para alterações no invólucro do endósporo. Estas podem afectar a sua viabilidade impedindo a sua germinação.

A afinidade do PS relativamente ao invólucro do endósporo parece ser determinante na eficiência do processo de fotoinactivação. Neste sentido, a optimização das condições de adsorção pode contribuir para melhorar a fixação e a distribuição de PS nos vários compartimentos do endósporo.

Os derivados porfirínicos tri e tetra catiónicos, revelaram propriedades interessantes como fotossensibilizadores, mas apenas com elevados valores de energia radiante. Este facto limita, por enquanto, a sua aplicação a processos de desinfectação em larga escala, como os envolvidos no tratamento de águas residuais e naturais com o aproveitamento da luz solar. Para aplicações em desinfectação de materiais, superfícies ou tecidos vivos, a técnica pode revelar-se promissora. Para estas aplicações, a selecção dos comprimentos de onda mais absorvidos pelo PS e a optimização do protocolo de irradiação, podem permitir o melhor aproveitamento da energia fornecida.

Uma vez que as modificações estruturais introduzidas nos fotossensibilizadores por substituição dos grupos *meso*, conduzem a melhorias significativas no seu potencial de fotoinactivação, é possível que a partir destas estruturas base se obtenham compostos mais eficazes com menores intensidades luminosas. Assim, as porfirinas podem

considerar-se compostos promissores em PDI de bactérias Gram positivas produtoras de endósporos.

## REFERÊNCIAS

1. Ackroyd, R., C. Kelty, N. Brown e M. Reed. 2001. *The History of Photodetection and Photodynamic Therapy*. Photochemistry and Photobiology. 74(5): 656-669
2. Atlas, R. M. 2002. *Responding to the threat of bioterrorism: a microbial ecology perspective – the case of anthrax*. Int. Microbiol. 5:161–167
3. Atrih, A. e S.J. Foster. 2001. *Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species*. Journal of Applied Microbiology. 91(2): 364-372
4. Bailey-Smith, K., S. J. Todd, T. W. Southworth, J. Proctor e A. Moir. 2005. *The ExsA Protein of Bacillus cereus Is Required for Assembly of Coat and Exosporium onto the Spore Surface*. Journal of Bacteriology. 187 (11): 3800–3806
5. Blackwood, K. S. C., Y. Turenne, D. Harmsen e A. M. Kabani. 2004. *Reassessment of Sequence-Based Targets for Identification of Bacillus Species*. Journal of Clinical Microbiology. 42:1626-1630
6. Bonnett, R. 2000. *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Gordon and Breach Science. Amsterdam
7. Boyle, R. e D. Dolphin. 1996. *Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers*. Photochem Photobiol. 64:469-85
8. Brul, S., F. Schuren, R. Montijn, B.J.F. Keijser, H. Spek e S.J.C.M. Oomes. 2006. *The impact of functional genomics on microbiological food quality and safety*. International Journal of Food Microbiology. 112 ( 3):195-199
9. Calzavara-Pinton, P.G., M. Venturini e R. Sala. 2005. *A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 78 :1-6
10. Caminos, D. A., M. B. Spesia e E. N. Durantini. 2005. *Photodynamic inactivation of Escherichia coli by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups*. Photochem. Photobiol. Sci. 5:56-65
11. Cano, R.J. e M.K. Borucki. 1995. *Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber*. Science. 268 (5213):1060-4
12. Carvalho, C. M. , A. T. P. C. Gomes, S. C. D. Fernandes, A. C. B. Prata, M. A. Almeida, M. A. Cunha, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Z. Lin, J. P. Rainho e J. Rocha. 2007. *Photoinactivation of*

- bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial [beta]-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process.* J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 88:112-118
13. Chada, G. R. V., E. A. Sanstad, Wang R. e A. Driks. 2003. *Morphogenesis of Bacillus Spore Surfaces.* J Bacteriol. 185(21): 6255–6261
  14. Costa, L., E. Alves, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, A. Cunha e A. Almeida. 2008. *Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect.* Photochem. Photobiol. Sci. *in press*
  15. Cronin, U. P. e M. Wilkinson. 2008. *Bacillus cereus endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage.* Food Microbiol. 25:235-43
  16. Dahl, T. A., W. R. Midden e P. E. Hartman. 1989. *Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen.* J. Bacteriol. 171:2188-2194
  17. Demidova, T. N. e M. R. Hamblin. 2004. *Photodynamic therapy targeted to pathogens.* J. Immunopathol. Pharmacol. 17(3) :245–54
  18. Demidova, T. N. e M. R. Hamblin. 2005a. *Photodynamic inactivation of Bacillus spores, mediated by phenothiazinium dyes.* Appl. Environ. Microbio. 71: 6918-6925
  19. Demidova, T. N. e M. R. Hamblin. 2005b. *Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation.* Antimicrob. Agents Chemother. 49:2329–2335
  20. Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis Spore Coat.* Microbiol Mol Biol Rev.63:1–20
  21. Driks, A. 2003. *The dynamic spore.* Proceedings of the National Academy of Sciences. 100(6): 3007–3009
  22. Driks, A. 2004. *From Rings to Layers: Surprising Patterns of Protein Deposition during Bacterial Spore.* Assembly Journal of Bacteriology. 186 (14): 4423-4426
  23. Drobniowski, F. 1993. *Bacillus cereus and Related Species.* Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial. Clin. Microbiol Review. 6(4):324-38
  24. Ehrenberg, B., Z. Malik, Y. Nitzan, H. Ladan, F. Johnson, G. Hemmi e J. Sessler. 1993. *The binding and photosensitization effects of tetrabenzoporphyrins and texaphyrin in bacterial cells.* Lasers in Medical Science. 8:197-203
  25. Errington, J. 2003. *Regulation of endospore formation in Bacillus subtilis.* Nat Rev Microbiol 1:117-126

26. Gerhardt, P. e E. Ribí. 1964. *Ultrastructure of the Exosporium Enveloping Spores of Bacillus Cereus*. J Bacteriol. 88 (6): 1774–1789
27. Gould, G.W. 2006. *History of science—spores*. J. Appl. Microbiol. 101 (3): 507–13
28. Grinshpun, S. A., A. Adhikari, T. Honda, K. Y. Kim, M. Toivola, K. S. R. Rao e T. Reponen. 2007. *Control of aerosol contaminant in indoor air: combining the particle concentration reduction with microbial inactivation*. Environ. Sci. Technol. 41:606-612
29. Hamblin, M. R. e T. Hasan. 2004. *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?* Photochem. Photobiol. Sci. 3:436–450
30. Hamblin, M. R., D. A. O'Donnell, N. Murthy, K. Rajagopalan, N. Michaud, M. E. Sherwood e T. Hasan. 2002. *Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria*. J. Antimicrob. Chemother. 49: 941-51
31. Hijnen, W. A., E. F. Beerendonk e G. J. Medema. 2006. *Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review*. Water Res. 40:3-22
32. Hill, R. T., W. L. Straube, A. C. Palmisano, S. L. Gibson e R. R. Colwell. 1996. *Distribution of sewage indicated by Clostridium perfringens at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal*. Appl. Environ. Microbiol. 62:1741-1746
33. Hornstra, L. M., Y. P. Vries, M. H. J. Wells-Bennik, W. M. Vos e T. Abee. 2006. *Characterization of Germination Receptors of Bacillus cereus ATCC 14579*. Applied and Environmental Microbiology. 72 (1): 44-53
34. <http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>
35. Jori, G. e S. B. Brown. 2004. *Photosensitized inactivation of microorganisms*. Photochem. Photobiol. Sci. 3:403-405
36. Joung, K.B. e J.C. Côté. 2002. *A single phylogenetic analysis of Bacillus thuringiensis strains and bacilli species inferred from 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphism is congruent with two independent phylogenetic analyses*. Journal of Applied Microbiology. 93 : 1075-1082
37. Lazzeri, D., M. Rovera, L. Pascual e E. N. Durantini. 2004. *Photodynamic studies and photoinactivation of Escherichia coli using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution*. Photochem. Photobiol. 80:286-293
38. Lonnen, J., S. Kilvington, S. C. Kehoe, F. Al-Touati e K. G. McGuigan. 2005. *Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in*

*drinking water*. Water Res. 39:877-883

39. Luksiene, Z. 2005. *New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization*. Food Technol. Biotechnol. 43 (4): 411-418
40. Madigan, M. T., e J. M. Martinko. 2006. *Brock Biology of Microorganims*. 11th Edition (International Edition). Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River. New Jersey
41. Magaraggia, M., F. Faccenda, A. Gandolfi e G. Jori. 2006. *Treatment of microbiologically polluted aquaculture waters by a novel photochemical technique of potentially low environmental impact*. J. Environ. Monit. 8:923-931
42. Maisch, T. 2007. *Anti-microbial photodynamic therapy: usetul in the future?* Lasers Med. Sci. 22:83-91
43. Makowsky, A. e W. Wardas. 2001. *Photocatalytic degradation of toxins secreted to water by cyanobacteria and unicellular algae and photocatalytic degradation of the cells of selected microorganisms*. Current Topics in Biophysics. 25:19-25
44. Martin, J.P. e N. Logsdon. 1987. *The role of oxygen radicals in dye-mediated photodynamic effects in Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 262(15): 7213-7219
45. Mcdonagh, A.F. 2001. *Phototherapy: From Anciente Egypt to the New Millenium*. Journal of Perinatology. 21:S7-S12
46. Melly, E., P. Genest, M. Gilmore, S. Little, D. Popham, A. Driks e P. Setlow. 2002. *Analysis of the properties of spores of Bacillus subtilis prepared at different temperatures*. Journal of Applied Microbiology. 92: (6) 1105-1115
47. Merchat, M., J. D. Spikes, G. Bertoloni e G. Jori. 1996. *Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins*. J. Photochem. Photobiol. B Biol.. 35: 149–157
48. Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh e P. Setlow. 2000. *Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64 (3): 548–572
49. Nicholson, W. L. 2002. *Roles of Bacillus endospores in the environment*. Cell. Mol. Life Sci. 59:410–416
50. Ohye, D.F. e W.G. Murrel. 1973. *Exosporium and Spore Coat Formation in Bacillus cereus T*. Journal of Bacteriology. 115(3):1179-1190
51. Paidhungat, M., K. Ragkousi e P. Setlow. 2001. *Genetic Requirements for Induction of Germination of Spores of Bacillus subtilis by Ca<sup>2+</sup>-Dipicolinate*. Journal of Bacteriology. 183 (16): 4886-4893

52. Peloi, L.S., R.S.S. Soares, C.E. G. Biondo, V.R. Souza, N. Hioka e E. Kimura. 2008. *Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue*. J.Biosci. 33: 231-237
53. Plomp, M., T. J. Leighton, K.E. Wheeler, A. J. Malkin. 2005. *The High-Resolution Architecture and Structural Dynamics of Bacillus spores*. Biophysical Journal. 88(1): 603-608
54. Radnedge, L., P. G. Agron, K. K. Hill, P. J. Jackson, L. O. Ticknor, P. Keim e G. L. Andersen. 2003. *Genome differences that distinguish Bacillus anthracis from Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 69:2755–2764
55. Ramos, C. I. V., C. M. Barros, A. M. Fernandes, M. G. Santana-Marques, A. Ferrer Correia, J. P. C. Tomé, M. C. T. Carrilho, M. A. F. Faustino, A. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves e J. A. S. Cavaleiro. 2005. *Interactions of cationic porphyrins with double-stranded oligodeoxynucleotides: a study by electron ionisation mass spectrometry*. J. Mass Spectrom. 40:1439-1447
56. Rasko, D.A., J. Ravel, O.A. Økstad, E. Helgason, R.Z. Cer, L. Jiang, K.A. Shores, D.E. Fouts, N.J. Tourasse, S.V. Angiuoli, J. Kolonay, W.C. Nelson, A.B. Kolstø, C.M. Fraser e T.D. Read. 2004. *The genome sequence of Bacillus cereus ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to Bacillus anthracis pXO1*. Nucleic Acids Res. 32(3):977-88
57. Reddi, E., M. Ceccon, G. Valduga, G. Jori, J. C. Bommer, F. Elisei, L. Latterini e U. Mazzucato. 2002. *Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins*. Photochem. Photobiol. 75: 462-470
58. Russel, A. D. 2003. *Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides*. J. Antimicrob. Chemother. 52:750-763
59. Schaeffer, A. B. e F. MacDonald. 1933. *A simplified method of staining endospores*. Science. 77:194
60. Schnepf E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler e D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62 (3): 775–806
61. Setlow, B. e P. Setlow. 1980. *Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores*. Proc Natl Acad Sci. 77: 2474-2476
62. Setlow, B., K. A. McGinnis, K. Ragkousi e P. Setlow. 2000. *Effects of major spore-specific DNA binding proteins on Bacillus subtilis sporulation and spore properties*. J Bacteriol 182: 6906-6912

63. Setlow, B., C. A. Loshon, P. C. Genest, A. E. Cowan, C. Setlow, e P. Setlow. 2002. *Mechanisms of killing of spores of Bacillus subtilis by acid, alkali and ethanol*. J. Appl. Microbiol. 92:362-375
64. Setlow, B., A.E. Cowan e P. Setlow. 2003. *Germination of spores of Bacillus subtilis with dodecylamine*. J. Appl. Microbiol. 95(3): 637–648
65. Setlow, P. 1994. *Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of Bacillus species*. J Appl Bacteriol. 23: 49-60
66. Setlow P. 1995. *Mechanisms for the Prevention of Damage to DNA in Spores of Bacillus Species*. Annual Review of Microbiology. 49: 29-54
67. Setlow P. 2000. *Resistance of spores of Bacillus species to ultraviolet light*. Environmental and Molecular Mutagenesis. 38 (2-3): 97 – 104
68. Setlow, P. 2005. *The bacterial spore: nature's survival package*. Culture. 26:1-4
69. Skanavis, C. e W. A. Yanko. 2001. *Clostridium perfringens as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments*. Mar. Pollut. Bull. 42:31-35
70. Souto, G.I., O. S. Correa, M.S. Montecchia, N.L. Kerber, N.L. Pucheu, M. Bachur e A.F. García. 2004. *Genetic and functional characterization of a Bacillus sp. Strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds*. Journal of Applied Microbiology. 97: 1247–1256
71. Takemoto, J., K. Hiraga e J.C. Bommer. 2003. *Antifungal activities of novel light sensitive meso-substituted cationic porphyrins*. 35<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Sep 14-17, Utah State University, Logan UT, Abstract no. F-1237
72. Tomé, J. P. C., M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, M. Soncin, M. Magaraggia, S. Ferro e G. Jori. 2004. *Synthesis and antibacterial activity of new poly-S-lysine-porphyrin conjugates*. J. Med. Chem. 47:6649-6652
73. Tomé, J. P. C., E. M. P. Silva, A. Pereira, C. M. A. Alonso, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, S. A. P. Tavares, R. R. Duarte, M. F. Caeiro e M. L. Valdeira. 2007. *Synthesis of neutral and cationic tripyridylporphyrin-D-galactose conjugates and the photoinactivation of HSV-1*. Bioorg. Med. Chem. 15:4705-4713
74. Vepachedu, V. R. e P. Setlow. 2007. *Role of SpoVA Proteins in Release of Dipicolinic Acid during Germination of Bacillus subtilis Spores Triggered by Dodecylamine or Lysozyme*. Journal of Bacteriology. 189 (5): 1565-1572



75. Vohra, A., D. Y. Goswami, D. A. Deshpande e S. S. Block. 2005. *Enhanced photocatalytic inactivation of bacterial spores on surface in air*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32:364-370
76. Vreeland, R.H., W.D. Rosenzweig e D.W. Powers. 2000. *Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal*. Nature. 407: 897-900
77. Wainwright, M. 1998. *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. J. Antimicrob. Chemoth. 42:13-28
78. Wainwright M. 2000. *Methylene blue derivatives – suitable photoantimicrobials for blood products disinfection?* International Journal of Antimicrobial Agents 16:381-394
79. Warth, A.D. e Strominger J.L. 1972. *Structure of the peptidoglycan from spores of Bacillus subtilis*. Biochemistry. 11 (8):1389–1396
80. Westphal, A. J., P. B. Price, T. J. Leighton e K. E. Wheeler. 2003. *Kinetics of size changes of individual Bacillus thuringiensis spores in response to changes in relative humidity*. Proc Natl Acad Sci USA. 100 (6): 3461–3466
81. Winekler, K. 2007. *Focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT)*. Journal of Photochemistry and Photobiology. 86: 43-44
82. Young, S. B. e P. Setlow. 2004. *Mechanisms of Bacillus subtilis spore resistance to and killing by aqueous ozone*. Journal of Applied Microbiology. 96 (5):1133-1142



## **ANEXO I**

*Extended abstract* aceite para publicação no livro de resumos das participações, produzido pela BioMicroWorld2007 Conference Proceedings Book: “*Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*”.



# Assessment of the performance of porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of bacterial endospores

A. Oliveira<sup>1</sup>, A. Almeida<sup>1</sup>, C. Carvalho<sup>2</sup>, J. Tomé<sup>2</sup>, M. A. F. Faustino<sup>2</sup>, M. G. Neves<sup>2</sup>, A. C. Tomé<sup>2</sup>, J. Cavaleiro<sup>2</sup> and A. Cunha<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology & CESAM, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

<sup>2</sup> Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

Spore-producing bacteria have proved to be extremely resistant to solar and photocatalytic disinfection techniques. Porphyrin derivatives that produce active oxygen species in the presence of light and molecular oxygen can be an interesting approach for the inactivation of these highly resistant bacterial spores. This work reports on studies of photodynamic inactivation (PDI) of *Bacillus cereus* endospores, taken as model-endospores, using several porphyrin derivatives, differing in the number of positive charges. The results show definitively and contrary to what was previously reported in the literature, that porphyrin derivatives are effective photosensitizers for the inactivation of bacterial endospores making PDI a promising approach for the disinfection of living tissues, contaminated materials and wastewater.

**Keywords** photodynamic inactivation; bacterial endospores; porphyrin derivatives

## 1. Introduction

The production of endospores allows bacteria to survive in extreme environmental conditions for long periods of time, having a major ecological importance [1]. Bacterial endospores have a complex multilayered coating that is highly resistant to inactivation by alcohols, phenols, chlorhexidine and benzalkonium compounds, which easily destroy vegetative cells of bacteria [1]. Photodynamic inactivation (PDI) uses non toxic photosensitive substances, namely phenothiazines and porphyrins [2]. When irradiated with visible or ultraviolet light, these substances absorb radiation of adequate wavelength, suffering an electronic excitement and reacting with oxygen molecules that rapidly react with its environment (cell wall material, nucleic acids, peptides, lipids) leading to cytotoxicity [2]. The use of photosensitizers (PS) is now regarded as an innovative approach in the search for new efficient and ecologically sustainable antimicrobial agents, applied to the environment, human health and food safety. In this work we propose to evaluate the applicability of cationic porphyrin derivatives, differing in the number of positive charges, in the inactivation of bacterial endospores.

## 2. Materials and Methods

*Bacillus cereus* (ATCC14579) pure cultures and endospores stock suspensions were prepared according the procedure used by Demidova and Hamblin [1].

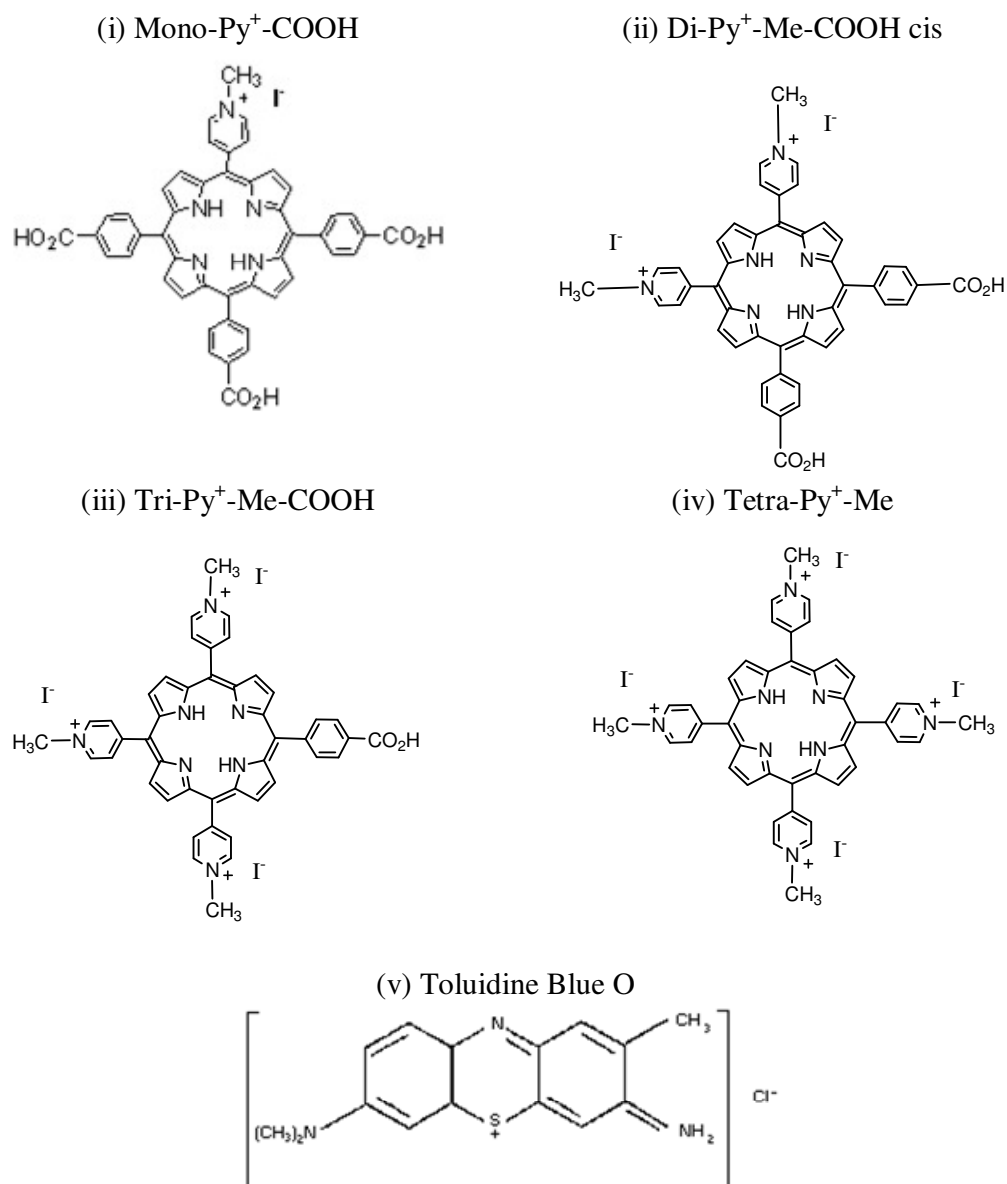
The photosensitizers tested in this study are presented in Figure 1: (i) 5-(1-methylpyridinium-4-yl)-10,15,20-tris(4-carboxyphenyl)porphyrin iodide (Mono-Py<sup>+</sup>-COOH, monocationic), (ii) 5,10-bis(4-carboxyphenyl)-15,20-bis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin di-iodide (Di-Py<sup>+</sup>-Me-COOH cis, dicationic), (iii) 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tri-iodide (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, tricationic); (iv) 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, tetracationic) and (v) toluidine blue O (TBO). TBO was tested as a reference PS, since its effectiveness against *B. cereus* endospores is documented in the literature [1].

As light source, an optical fibre illumination system (LC-122 LumaCare, London) equipped with a halogen 250 W quartz-type lamp (400-800 nm) was used. Irradiation (1690 w m<sup>-2</sup>) was conducted continuously during 4-10 minutes.

---

\*

Corresponding author: e-mail: acunha@ua.pt, Phone: +351 234 370 784



**Fig. 1** Structures of the tested photosensitizers.

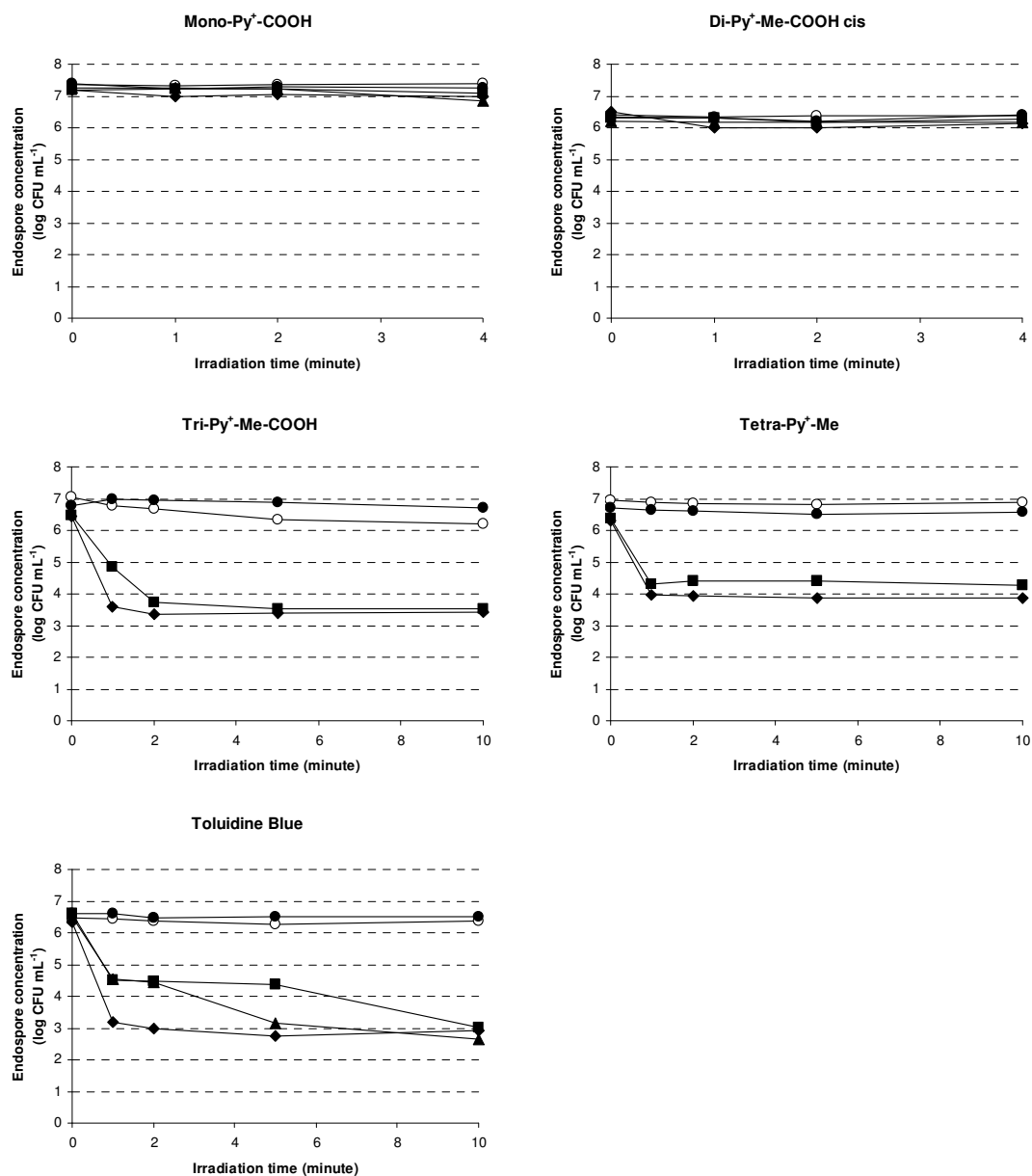
Treatments were initiated with a pre-exposure step, with the aim of maximizing the adsorption of PS material to the spore surface and simultaneously reduce colour intensity during the irradiation and minimize self-shading. Aliquots of 1 mL of spore stock-suspension were transferred to a series of sterile microtubes and incubated in the dark, at 37 °C, for 3 hours in the presence of 10, 30 and 60  $\mu$ M of PS. After incubation, suspensions were centrifuged 10 minutes at 1,550 x g (Eppendorf Microcentrifuge 5414). The pellet was resuspended in 1 mL of PBS and homogenised in the vortex. For the irradiation, the content of each microtube, corresponding to the different treatments/concentrations, was added to 9 mL of PBS and irradiated under magnetic stirring. During the irradiation, samples were kept in ice to prevent heating. Two controls were included in each irradiation experiment: one light control (LC) submitted to the same irradiation conditions as the samples but in the absence of PS and one dark control (DC) containing the highest concentration of PS tested in each experiment, but protected from the light with aluminium foil. The inactivation was followed by collecting, serial-diluting and pour-planting in TSA (Tryptic Soy Agar, Difco Laboratories) triplicate 100  $\mu$ L aliquots at the beginning of the experiment and at selected time intervals during the irradiation. Colonies were counted after 48 hours of incubation at 30 °C, in the dark and the inactivation was estimated from the relative variation of the concentration of colony forming units (CFU).

### 3. Results

The results of the PDI experiments with *B. cereus* are presented in Figure 2. The maximum inactivation was achieved with TBO. A maximum reduction of 3.9 log units relatively to the initial concentration of endospores was observed with a concentration of 30  $\mu\text{M}$  and an irradiation period of 10 minutes. With 60  $\mu\text{M}$  of TBO, a reduction  $>3$  log units was observed immediately after the first minute of irradiation. Monocationic and dicationic porphyrins induced minor endospore inactivation, respectively 0.4 and 0.5 log units. Tricationic porphyrin caused marked reductions of the concentration of viable endospores. A 3.1 log unit reduction was obtained with the tricationic compound. With the highest PS concentration (60  $\mu\text{M}$ ) a reduction of 3 log units was obtained after 1 minute of irradiation. With Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, the 10  $\mu\text{M}$  concentration caused an inactivation that was equivalent to that of the 60  $\mu\text{M}$  concentration, after 5 minutes of irradiation. The tetracationic porphyrin Tetra-Py<sup>+</sup>-Me caused a maximum reduction of 2.4 log units with a 60 $\mu\text{M}$  concentration, after 2 minutes of irradiation. The profiles of inactivation of all tested PS show that the effects occurred mostly during the first 2 minutes of irradiation.

### 4. Discussion

The inactivation of bacterial endospores has been regarded as a challenge for human health, environmental quality and food safety. PDI approaches had been already attempted but with limited success as to the use of porphyrin derivatives as photosensitizers. However, the effects of modifications in the molecule charge and in the nature of the meso-substituent groups on its effectiveness and selectivity towards different bacterial groups are well documented [3]. For this study we started with the hypothesis that modifications of the porphyrin derivatives could improve their photo induced inhibitory potential towards bacterial endospores. Several porphyrin derivatives differing in the number of charges were tested and the PDI effects were interpreted in comparison with those obtained with TBO, an effective PS for *B. cereus* endospores [1]. According to the maximum reduction in the concentration of viable endospores, the tested PS could be organized by the following order of decreasing effectiveness: TBO>Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH>Tetra-Py<sup>+</sup>-Me>>Mono-Py<sup>+</sup>-COOH=Di-Py<sup>+</sup>-Me-COOH. Cationic porphyrins have been found to photoinactivate gram positive bacteria and also gram negative strains, better than the neutral molecules [4-6], because of improvement of the interactions with the rather impermeable outer membrane [4-5]. However the relation with the molecule's charge is not linear. In this study, the tricationic derivative was more effective than the tetracationic one. Demidova and Hamblin [1] had tested without success, a tricationic porphyrin [5-Phenyl-10,15,20-tris(N-methyl-4-pyridil)porphyrin chloride] in their pioneer work of PDI directed to bacterial endospores. The tricationic compound used in our study differs considerably from the former product confirming that changes in the molecule significantly affect interactions between the PS and the target structures or compounds [4].



**Fig. 1** Survival of *B. cereus* endospores during PDI experiments with 10, 30 and 60  $\mu\text{M}$  of PS. —○— LC, —●— DC, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —▲— 30  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ .

## 5. Conclusion

From this work we can anticipate that suitable modifications of the porphyrin charge and structure may significantly improve its PDI potential for endospores inactivation. Since the tricationic derivative was the most effective against *B. cereus* endospores and showed no signs of toxicity in the absence of light, it should be regarded as worthy to explore for PDI of spore-producing gram-positive bacteria.

**Acknowledgements** Thanks are due to the University of Aveiro, FCT and FEDER for funding the Organic Chemistry Research Unit, and to the project POCI/CTM/58183/2004 and CESAM for funding the Microbiology Research Group. C. Carvalho and J. Tomé are also grateful to FCT for their grants (SFRH/BPD/5630/2001).



## References

- [1] T. N. Demidova and M.R. Hamblin, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6918- 6925 (2005a).
- [2] M. Wainwright, *J. Antimicrob. Chemoth.*, **42**, 13-28 (1998).
- [3] J. P. C. Tome, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tome, J. A. S. Cavaleiro, M. Soncin, M. Magaraggia, S. Ferro and G. Jori, *J. Med. Chem.* **47**, 6649-6652 (2004).
- [4] D. Lazzeri, M. Rovera, L. Pascual and E. N. Durantini, *Photochem. Photobiol.* **80**, 286-293 (2004).
- [5] D. A.Caminos, M. B. Spesia and E. N. Durantini, *Photochem. Photobiol. Sci.* **5**, 56-65 (2006).
- [6] T. N. Demidova and M. R. Hamblin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2329–2335 (2005b).



## **ANEXO II**

Manuscrito aceite para publicação na revista Journal of Applied Microbiology



**Title:** Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores

**Authors:** Anabela Oliveira<sup>1</sup>, Adelaide Almeida<sup>1</sup>, Carla M. B. Carvalho<sup>2</sup>, João P. C. Tomé<sup>2</sup>, Maria Amparo F. Faustino<sup>2</sup>, Maria Graça P. M. S. Neves<sup>2</sup>, Augusto C. Tomé<sup>2</sup>, José A. S. Cavaleiro<sup>2</sup>, Ângela Cunha<sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Department of Biology & CESAM, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

<sup>2</sup>Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

**Running title:** Photoinactivation of *Bacillus cereus* endospores

**\*Corresponding author:**

Ângela Cunha

Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro,

Campus de Santiago, 3810-193 AVEIRO, PORTUGAL

e-mail: [acunha@ua.pt](mailto:acunha@ua.pt)

Phone: + 351 234 370 784

Fax: + 351 234 372 587

## ABSTRACT

Porphyrin derivatives producing active oxygen species in the presence of light and molecular oxygen, can be used for the inactivation of highly resistant bacterial endospores. This work presents the study of photodynamic inactivation (PDI) of *Bacillus cereus* endospores, taken as model-endospores, using porphyrin derivatives differing in the number of positive charges and in the *meso*-substituent groups. The effect on *B. cereus* vegetative cells was also evaluated.

Neutral, monocationic and dicationic porphyrins were relatively ineffective in the inactivation of *B. cereus* endospores (<1 log unit reduction). The most effective porphyrin derivative is a tricationic porphyrin with a *meso*-pentafluorophenyl group. With this photosensitizer, at 0.5  $\mu\text{M}$ , a reduction of 3.5 log units occurs after only 4 minutes of irradiation. The tetracationic and the tricationic porphyrin with a carboxyl group also reduced the concentration of viable spores by more than 3 log units. Under identical conditions, tricationic and tetracationic derivatives caused reductions of 5 to 7 log units in the concentration of *B. cereus* vegetative cells. None of the porphyrin derivatives showed toxicity in the absence of light.

The results show that some porphyrin derivatives are efficient photosensitizers for the inactivation of bacterial endospores and should be considered as interesting molecules for further studies.

Keywords: photodynamic inactivation, *Bacillus cereus*, bacterial endospores, porphyrins.

## INTRODUCTION

Bacterial endospores have assumed increasing relevance in the sanitary evaluation of natural environments, particularly those that receive residues of faecal material. Once introduced in the aquatic environment, they persist in time and space, further than the classic bacterial indicators and are more resistant to ambient stress, being detectable up to 1 year after the termination of discharges (Hill *et al.* 1996; Skanavis and Yanko 2001).

Bacterial endospores have a multilayered, highly resistant and complex coating. They are composed of a central cell surrounded by protective layers. In some species, there is an additional external layer, the exosporium, consisting essentially of protein, water and carbohydrates. Endospores have only 20-30% of the water content of vegetative cells, so they are enzymatically dormant and able to resist long periods of desiccation (Setlow 2005).

Several compounds present in endospores contribute to the high resistance to chemical agents. Dipicolinic acid (pyridine-2,6-dicarboxylic acid) corresponds to approximately 20% of core dry weight and is present in all types of bacterial endospore. This acid reacts with calcium ions and forms calcium dipicolinate, which appears to be important in reducing spore core water levels and also in promoting and maintaining spore dormancy (Setlow 2005). SASP (small acid-soluble spore proteins) protect DNA against radiation, desiccation, and dry heat and also serve as a carbon and energy source during the germination process. Keratin is also responsible for resistance to chemical agents (Madigan and Martinko 2006).

Endospores resist inactivation by alcohols, phenols, chlorhexidine and benzalkonium compounds, which easily destroy vegetative cells of bacteria (Demidova and Hamblin 2005a). For this reason, they are often used as biological indicators to test

the effectiveness of sterilization processes. Agents commonly cited as being sporicidal include heat, formaldehyde or glutaraldehyde, concentrated hypochlorite solutions, chlorine dioxide and ionizing radiation (Russel 2003).

Numerous studies of the application of UV radiation in water disinfection have shown that bacterial endospores have an increased resistance to UV-induced inactivation, in comparison with the non-spore forming strains of bacteria, and higher energy fluencies are required to achieve an equivalent level of inactivation (Hijnen *et al.* 2006). Bacterial endospores have also revealed high resistance to solar disinfection (SODIS) and solar photocatalytic disinfection (SPC-DIS) with TiO<sub>2</sub> (Lonnen *et al.* 2005). With this latter process, the reduction of bacterial endospores (*Bacillus subtilis*) did not exceed 1.7 log units whereas for trophozoites of the protist *Acanthamoeba polyphaga*, fungi (*Candida albicans*, *Fusarium solani*) and bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) the reduction obtained was at least 4 log units (Lonnen *et al.* 2005).

The inactivation of bacterial endospores has been regarded as a challenge for human health, environmental quality and food safety. In the last decade, photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) has been shown to be an effective approach to inactivate bacteria (including drug-resistant strains), yeasts, viruses and protozoa (Wainwright 1998; Makowsky and Wardas 2001; Hamblin and Hasan 2004; Jori and Brown 2004; Maisch 2007). This technique takes advantage of non-toxic photosensitive substances, namely phenothiazines and porphyrins. The photodynamic destruction of microorganisms is based on the ability of these compounds, when activated by light, to generate reactive oxygen species that are able to destroy or affect biological structures (cell wall material, nucleic acids, peptides, lipids) leading to cytotoxicity (Bonnett 2000; Jori and Brown 2004; Maisch 2007).



With the adequate photosensitizer (PS), photodynamic inactivation (PDI) of endospores can occur (Demidova and Hamblin 2005b). It has been demonstrated that *Bacillus* endospores are susceptible to photoinactivation by phenothiazinium dyes and low doses of red light (Demidova and Hamblin 2005b). The same study indicates that spores are resistant to photoinactivation by porphyrinic type photosensitizers. However, it is recognized that the efficiency of porphyrin derivatives on microorganism photoinactivation (*e.g.* bacteria and viruses) is strongly related to their structure (Carvalho *et al.* 2007; Tomé *et al.*, 2007; Costa *et al.* 2008). It has been demonstrated that structural alterations consisting of the addition of positive charges and/or functional groups to a PS may increase its effectiveness in the inactivation of particular bacterial groups (Merchat *et al.* 1996; Reddi *et al.* 2002; Hamblin and Hasan 2004; Tomé *et al.* 2004; Magaraggia *et al.* 2006).

In this work we propose (a) to study the PDI efficiency of neutral and cationic porphyrin derivatives, (b) to characterize the kinetics of the inactivation process using *Bacillus cereus* as a model endospore-producing bacterium and (c) determine the applicability of porphyrin derivatives for the inactivation of bacterial endospores.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains, culture conditions and preparation of endospore stock-suspensions**

*Bacillus cereus* (ATCC14579) pure cultures were prepared and maintained routinely in Tryptic Soy Broth (TSB, Merck). Culture purity was checked before the preparation of stock-suspensions of endospores by cultivating the strain in Mannitol Egg Yolk Agar (MYP, Oxoid) supplemented with polymixin B sulfate 0.1% (Sigma). Stock-

suspensions of endospores were prepared according to literature (Demidova and Hamblin 2005a). The purity of the stock suspensions was verified by microscopic observation after endospore staining with malachite green and safranin (Wirtz-Conklin modified technique according to Schaeffer and MacDonald (1933)). The concentration of viable spores in the stock-suspensions was determined in triplicate for each experiment by serial-dilution in Ringer solution, immediately after thawing, and pour-plating 100  $\mu$ L aliquots in TSA medium. Colonies were counted after 48 hours of incubation at 30°C.

### **Photosensitizers**

The photosensitizers used in this study (Figure 1) were: (i) 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(4-pyridyl)porphyrin (Tri-Py-COOH, neutral), (ii) 10,15,20-tris(4-carboxyphenyl)-5-(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin iodide (Mono-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, monocationic), (iii) 5,10-bis(4-carboxyphenyl)-15,20-bis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin di-iodide (Di-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, dicationic), (iv) 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tri-iodide (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, tricationic), (v) 10,15,20-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-5-(pentafluorophenyl)porphyrin tri-iodide (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, tricationic) and (vi) 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, tetracationic). In these studies the phenothiazinium dye toluidine blue O (TBO, purchased from Acrös) and 10,15,20-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-5-(phenyl)porphyrin tri-iodide (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph, tricationic) were also tested for comparison. In the literature, TBO is described as an efficient PS against *B. cereus* endospores and Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph as a non-effective PS against the same bacterial endospores (Demidova and Hamblin 2005a).

Porphyrin derivatives were prepared according to the literature (Sirish *et al.* 2002; Tomé *et al.* 2004). First, the neutral compounds were obtained from the reaction of pyrrole

and the adequate aldehydes (pyridine-4-carbaldehyde and 4-formylbenzoic acid or benzaldehyde or pentafluorobenzaldehyde) in refluxing acetic acid and nitrobenzene. These reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid). The resulting porphyrins, after purification by column chromatography (silica), were quaternized by reaction with methyl iodide. All porphyrins were purified by crystallization from chloroform/methanol/petroleum ether and their purities were confirmed by thin layer chromatography and by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. The PS stock solutions (500  $\mu\text{M}$  in DMSO) were filter-sterilized and stored at 4°C in the dark until they were used.

### **Irradiation conditions**

For the experimental PDI studies, the spore suspensions were irradiated, for defined time periods, with white light from a interchangeable fiber optic probe (400-800 nm) coupled to a 250 W quartz/halogen lamp (LC-122 LumaCare, USA). The light was delivered at a fluence rate of 1690  $\text{W}/\text{m}^2$ , measured with a radiometer LI-COR Model LI-250.

Irradiation was carried out continuously for 4 or 10 minutes for PDI experiments with endospores and for 15 minutes for experiments with vegetative cells.

### **PDI experimental setup**

In the assessment of endospore photoinactivation, the experiments were initiated with an adsorption step, with the aim of maximizing the adsorption of the PS to the spore surface and, simultaneously, minimizing self-shading. Spore stock-suspension aliquots (1 mL) were transferred to a series of sterile microtubes and different concentrations of PS (10 and 60  $\mu\text{M}$ ) were added. The tetracationic and the most efficient tricationic porphyrins were also tested over a lower range of concentrations (0.5, 1.0 and 5.0  $\mu\text{M}$ ). The microtubes were incubated in the dark, at 37 °C, for 3 hours. The time of incubation

was chosen after preliminary assays in which longer incubations allowed endospore germination. After incubation, the different suspensions were centrifuged for 10 minutes at 1,550 x g (Eppendorf Microcentrifuge 5414). Each resulting pellet was resuspended in 1 mL of PBS, homogenised by vortexing and added to 9 mL of PBS. This last suspension was irradiated under magnetic stirring in a melting ice bath.

The inactivation kinetics was followed by collecting triplicate 100 µL aliquots, serial diluting in Ringer solution and pour-plating in TSA. Aliquots were collected at the beginning of the experiment and at selected time intervals during the irradiation. Colonies were counted after 48 hours of incubation in the dark and the endospore survival was calculated by dividing the mean number of spores surviving at each time point by the initial concentration.

Two controls were included in each irradiation experiment: a light control (LC), submitted to the same irradiation conditions as the samples but in the absence of PS, and a dark control (DC) containing the PS at the highest concentration, but without exposure to light.

The occurrence of endospore germination during the pre-irradiation period (dark adsorption) was also checked. Double aliquots were collected at 0, 1, 2 and 3 hours and one of the aliquots of each set was heated at 85°C for 10 minutes for inactivation of vegetative cells. Both inactivated and non-inactivated aliquots were serially diluted and pour-plated in TSA. Colonies were counted after 48 hours of incubation at 37°C in the dark. Germination was assessed by comparing the CFU values obtained for the corresponding inactivated and non-inactivated aliquots.

The experiments involving the photoinactivation of vegetative cells, obtained from an overnight culture, were carried out using a similar protocol described for spore photoinactivation but in this case, without the dark incubation period in the presence of the PS. The light and dark controls were also included. The concentration of viable cells

was determined as described for the experiments with spore suspensions. For each tested PS, three independent experiments were performed.

### **Adsorption of the PS to bacterial endospores**

In order to understand if a different affinity towards the endospore material could underlay the differences found between the photoinactivation potential of the most efficient porphyrins, the adsorption of PS bacterial endospores during the dark incubation was measured for Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Aliquots (2 mL) of the spore suspensions were taken after 3 hours of dark incubation in the presence of 10 and 60  $\mu$ M of PS. The endospores were concentrated by centrifugation at 1,550 x g (Eppendorf Microcentrifuge 5414) for 15 minutes and then resuspended in a digestion solution containing 0.1 M NaOH and 1% SDS (Demidova and Hamblin 2005a). The suspension was kept in the dark, at room temperature, for 24 hours. The concentration of the porphyrinic material in the digested extracts was analyzed by fluorimetry with a Fluoromax 3 (Spectrometer Horiba Jovin Yvon). The samples were excited via the Soret band and the fluorescence emission of the porphyrins was monitored over the 600–750 nm range. The measured fluorescence intensity was converted to the corresponding concentration by interpolation with a calibration plot built with known concentrations of PS in the digestion solution.

Parallel aliquots of the incubated spore suspensions were serially diluted and pour-plated in TSA for the determination of the concentration of viable spores (CFU). The adsorption value (PS molecule CFU<sup>-1</sup>) was calculated according to the literature (Demidova and Hamblin 2005a).

## RESULTS

### Quality of the biological material

The average concentration of spores in stock suspensions was of the order of  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. Work suspensions for the PDI experiments were obtained by a ten-fold dilution in PBS. The concentration of spores during PDI experiments was  $10^6$ - $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>. Microscope observations confirmed that the proportion of vegetative cells was negligible (<1%). The germination of endospores during the dark adsorption procedure was also negligible since colony counts were similar in the heat-inactivated (endospores only) and non-inactivated (endospores and vegetative cells) treatments.

### PDI of *Bacillus cereus* endospores with different photosensitizers

The results of the PDI experiments with *B. cereus* are presented in Figure 2. A maximum reduction of 3.6 log units relative to the initial concentration of endospores was observed with TBO and an irradiation period of 10 minutes. With 60  $\mu$ M of TBO, a reduction of >3 log units was observed immediately after the first minute of irradiation.

The neutral porphyrin derivative Tri-Py-COOH caused a reduction of only 0.3 log units with the maximum PS concentration. Monocationic and dicationic porphyrins also induced little endospore inactivation (0.4 and 0.5 log units respectively). No significant reduction was observed for the tricationic porphyrin Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph even at the highest concentration (60  $\mu$ M).

Tricationic porphyrines, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH and Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, caused marked reductions in the concentration of viable endospores. The highest reductions were 3.6 log units with Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and 3.1 log units with Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH. For Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF a reduction of >3 log units was obtained after 1 minute of irradiation. With Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, after 5 minutes of irradiation, the reductions at 10  $\mu$ M and 60  $\mu$ M are

identical (>3 log units). The tetracationic porphyrin Tetra-Py<sup>+</sup>-Me caused a maximum reduction of 3.2 log units after 5 minutes of irradiation.

The results of the PDI experiments over a lower range of concentrations performed with the porphyrins Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me are presented in Figure 3. Concentrations of 0.5 and 1.0 μM for the Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH failed to induce PDI in *B. cereus* endospores and with 5.0 μM the inactivation corresponded to a 2.7 log reduction. Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF caused a PDI of ca. 3.3 log units for all the low range concentrations (0.5-5.0 μM). The concentration of 5.0 μM of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me caused a maximal reduction of 1.9 log units after 2 minutes of irradiation. Lower concentrations of this PS failed to significantly inactivate *B. cereus* endospores with up to 4 minutes of irradiation (40.7 J cm<sup>-2</sup>). The inactivation profiles of all tested PS show that the effects occurred mostly during the first two minutes of irradiation (20.3 J cm<sup>-2</sup>).

#### **Adsorption of PS to *Bacillus cereus* endospores**

The amount of PS that adsorbed to *B. cereus* endospores during 3 hours of dark incubation in the presence of 10 and 60 μM of Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me is presented in Table 1. The average concentration per endospore increased with increasing concentration of PS. The values of PS adsorbed over 3 hours varied between 3.26 x 10<sup>6</sup> and 3.18 x 10<sup>7</sup> molecules CFU<sup>-1</sup> and the maximum value was obtained with 60 μM of Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF.

#### **PDI of *Bacillus cereus* vegetative cells with TBO and cationic porphyrin derivatives**

The results of the experiments of PDI of vegetative cells of *B. cereus* with TBO, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me are presented in Figure 4. The

maximum reduction was 6.5 log units, with 60  $\mu\text{M}$  of Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, after 15 minutes of irradiation (152.1 J cm<sup>-2</sup>). A similar reduction (6.4 log units) was obtained with the equivalent concentration of TBO. Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me caused slightly lower reductions (5.7 and 5.3 log units, respectively). Maximum inactivation occurred after 10-15 minutes of irradiation (101.4-152.1 J cm<sup>-2</sup>).

## DISCUSSION

### Porphyrin derivatives as PS for bacterial endospores

The inactivation of bacterial endospores has been regarded as a challenge for human health, environmental quality and food safety. In this work, *Bacillus cereus* endospores were used as model endospores because, like *Bacillus anthracis*, they have an exosporium. The experimental study of PDI of *Bacillus anthracis* is more difficult because of the biohazard risk involved. PDI approaches have already been attempted but with limited success, namely when porphyrin derivatives were used as photosensitizers. Also, it has been demonstrated that the efficiency of the inactivation of microorganisms by photosensitizers, namely of the porphyrinic type, is strongly dependent on structural features such as charge number, charge distribution and amphiphilicity (Merchat *et al.* 1996; Reddi *et al.* 2002; Hamblin and Hasan 2004; Tomé *et al.* 2004; Costa *et al.* 2008; Magaraggia *et al.* 2006; Tomé *et al.* 2007). This study starts with the hypothesis that other porphyrin derivatives with structural features different from the ones already tested in the photoinactivation of bacterial endospores can have some potential as PS against this type of biological agents. A collection of *meso*-substituted porphyrins with different charges and *meso*-substituent groups have been tested and the PDI effects interpreted and compared with those obtained for TBO,



an effective PS for *B. cereus* endospores, and with the tricationic porphyrin, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph, a non-effective PS (Demidova and Hamblin 2005a).

The maximum PDI effect is obtained with the two tricationic Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH and Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and one tetracationic derivative, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. These porphyrin derivatives are able to inactivate *B. cereus* endospores by the same order of magnitude as TBO, under the same irradiation conditions and using equivalent concentrations. A completely different behavior is found for the neutral, mono- and dicationic porphyrins. These porphyrins are as ineffective as the previously tested tricationic derivative Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph (Demidova and Hamblin 2005a).

Considering the results obtained, the tested porphyrin derivatives can be organized with the following order of decreasing PDI effectiveness: Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF > Tetra-Py<sup>+</sup>-Me ≈ Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH >>> Tri-Py-COOH ≈ Mono-Py<sup>+</sup>-Me-COOH ≈ Di-Py<sup>+</sup>-Me-COOH ≈ Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph. The two tricationic porphyrins with a substituted *meso*-phenyl group cause pronounced inactivation. PDI of endospores with Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF occurs earlier during the irradiation period so this compound can be regarded as a more promising PS. The differences between the two tricationic porphyrins Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH are clearly observed in the experiments over a low range of concentrations. Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF causes PDI even at 0.5 μM whereas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH is only efficient at 5.0 μM.

Cationic porphyrins are usually more efficient against bacteria than neutral molecules due to an improved interaction with their rather impermeable outer membrane and cell wall (Merchat *et al.* 1996; Lazzeri *et al.* 2004; Caminos *et al.* 2005; Demidova and Hamblin 2005b). However it is also recognized that the relationship with the charge of the molecule is not always linear (Carvalho *et al.* 2007; Costa *et al.* 2008).

The results of this work show that the presence and the number of positive charges in the porphyrinic molecule, although important, are not the only factors contributing to

their efficient PDI of bacterial endospores. One of the tricationic derivatives (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) is more efficient than the tetracationic Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. In addition, the tricationic porphyrin, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph tested by Demidova and Hamblin (2005a), in their seminal work of PDI of bacterial endospores, is not an efficient PS. The tricationic porphyrins Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, used in our study, differ structurally from the former compound only in one of the aryl groups attached to the *meso* position. While for Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF the *meso*-group is a phenyl substituted by five fluorine atoms, for Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH the phenyl contains a carboxyl group. The Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph has a phenyl group with no substituents. The presence of these groups in Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH can affect the interactions between the PS and the target structures such as cell walls, nucleic acids, peptides and lipids (Lazzeri *et al.* 2004) and consequently improve the efficiency of the PS. Our results confirm that small modifications in the substituent groups, in addition to charge, significantly modify the effectiveness of the porphyrin derivatives as PS for endospores photoinactivation.

### **Process of endospore PDI**

In the PDI experiments with *B. cereus* endospores, the bulk inactivation occurred during the initial 1-2 minutes of irradiation, subsequently reaching a stable platform rather resistant to further inactivation. The photobleaching of the PS under irradiation could justify this pattern. However, the photostability analysis of the PS indicates that they do not undergo extensive degradation (data not shown). These results are supported by the PDI experiments with vegetative cells, in which similar PS concentrations and light intensities induce different reduction kinetics and the PS are active even after 15 minutes of irradiation. The release of the PS, loosely adsorbed to the spore surface, during the irradiation could also explain the platform of inactivation. However a platform of inactivation was also observed in preliminary experiments in which the

irradiation was performed in the presence of the PS dissolved in the suspension medium (data not shown). Under these conditions, it is likely that an equilibrium between adsorption and desorption of the PS would be established. Other possible explanations are the interference of accumulating products resulting from photodamage of the endospore coating, which could act as quenchers for the reactive oxygen species (Vohra *et al.* 2005; Grinshpun *et al.* 2007) or the existence of a heterogeneous population of endospores, with at least two levels of susceptibility to PDI.

The cellular targets involved in endospore inactivation with porphyrinic compounds are still unknown. It has been demonstrated that *B. subtilis* endospores are susceptible to agents that produce reactive oxygen species but the type of photodynamic mechanism is often determined by the class of PS (Demidova and Hamblin 2005a). Direct damage of the cytoplasmic membrane of vegetative cells has been demonstrated for phenothiazinium dyes (Demidova and Hamblin 2005b). Also, porphyrin derivatives are planar molecules that can intercalate in DNA (Hamblin and Hasan 2004). The binding strength to nucleic acids was found to increase with the number of positive charges and lethal photo-oxidative damage may result from chain breakage and fragment loss (Ramos *et al.* 2005). In the case of bacterial endospores, the access of the PS to the DNA will be influenced by the permeability of the spore coating to each particular PS.

The amount of tri- and tetracationic porphyrins Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me attached to the spores during the adsorption step indicates that there are small differences between the different PS and that Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF shows higher adsorption to the endospore coating. This, in addition to effects related to the strength of the bonding and the partitioning of the PS between different endospores layers may also contribute to the different performance of the tri- and tetracationic derivatives.

Vegetative cells are, as expected, much more responsive to PDI than endospores. PDI of gram positive bacteria with cationic and neutral porphyrin derivatives has already been

demonstrated (Hamblin and Hasan 2004; Lazzeri *et al.* 2004; Caminos *et al.* 2005; Demidova and Hamblin 2005b). In our experiments, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH caused the strongest inactivation (reduction of 6.5 log units). However, a platform is not always reached over the 15 minutes of the experiment, indicating that higher rates of inactivation can be achieved.

This work demonstrates that porphyrins with adequate structural features can be used for the photoinactivation of bacterial endospores. Our results confirm that small modifications in the substituent groups, in addition to charge, significantly change the effectiveness of the molecule as a PS for endospore inactivation and the development of molecules even more effective than TBO can be envisaged. Of the studied PS, the most promising compound for the photoinactivation of *B. cereus* endospores (and vegetative cells) is Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF followed by Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. None of these compounds shows toxicity in the absence of light. Thus, these tetrapyrrolic macrocycles should provide a base for the further exploration of PDI of spore-producing gram-positive bacteria and may constitute an interesting approach for improving human health conditions and environmental quality.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Thanks are due to the University of Aveiro, FCT and FEDER for funding the Organic Chemistry Research Unit, and to the project POCI/CTM/58183/2004 and CESAM for funding the Microbiology Research Group. Carla Carvalho and João Tomé are also grateful to FCT for their grants. We thank Dr. Brian Goodfellow for the English language proofing of the manuscript.

## REFERENCES

- Bonnett, R. (2000) *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Amsterdam: Gordon and Breach Science.
- Camino, D.A., Spesia, M.B. and Durantini, E.N. (2005) Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel *meso*-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photochem Photobiol Sci* **5**, 56-65.
- Carvalho, C.M.B., Gomes, A.T.P.C., Fernandes, S.C.D., Prata, A.C.B., Almeida, M.A., Cunha, M.A., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Lin, Z., Rainho, J.P. and Rocha, J. (2007) Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial [beta]-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *J Photochem Photobiol B: Biol* **88**, 112-118.
- Costa, L., Alves, E., Carvalho, C.M.B., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, A. and Almeida, A. (2008) Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect. *Photochem Photobiol Sci* **7**:415- 422.
- Demidova, T.N. and Hamblin, M.R. (2005a) Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6918-6925.
- Demidova, T.N. and Hamblin, M.R. (2005b). Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2329–2335.
- Grinshpun, S.A., Adhikari, A., Honda, T., Kim, K.Y., Toivola, M., Rao, K.S.R. and Reponen, T. (2007) Control of aerosol contaminant in indoor air: combining the particle concentration reduction with microbial inactivation. *Environ Sci*

*Technol* **41**, 606-612.

Hamblin, M.R. and Hasan, T. (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* **3**, 436–450.

Hijnen, W.A., Beerendonk, E.F., Medema, G.J. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res* **40**, 3-22.

Hill, R.T., Straube, W.L., Palmisano, A.C., Gibson, S.L. and Colwell, R.R. (1996) Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. *Appl Environ Microbiol* **62**,1741-1746.

Jori, G. and Brown, S.B. (2004) Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol.Sci* **3**, 403-405.

Lazzeri, D., Rovera, M., Pascual, L. and Durantini, E.N. (2004) Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using *meso*-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. *Photochem Photobiol* **80**, 286-293.

Lonnen, J., Kilvington, S., Kehoe, S.C., Al-Touati, F. and McGuigan, K.G. (2005) Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Res* **39**, 877-883.

Madigan, M.T. and Martinko, J.M. (2006) *Brock Biology of Microorganisms*, 11th Edition (International Edition). New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Magaraggia, M., Faccenda, F., Gandolfi, A. and Jori, G. (2006) Treatment of microbiologically polluted aquaculture waters by a novel photochemical technique of potentially low environmental impact. *J Environ Monit* **8**, 923-931.

- Maisch, T. (2007) Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci* **22**, 83-91.
- Makowsky, A. and Wardas, W. (2001) Photocatalytic degradation of toxins secreted to water by cyanobacteria and unicellular algae and photocatalytic degradation of the cells of selected microorganisms. *Current Topics in Biophysics* **25**, 19-25.
- Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villanueva, A. and Jori, G. (1996) *Meso*-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B: Biol* **32**, 153-157.
- Ramos, C.I.V., Barros, C.M., Fernandes, A.M., Santana-Marques, M.G., Ferrer Correia, A., Tomé, J.P.C., Carrilho, M.C.T., Faustino, M.A.F., Tomé, A.C., Neves, M.G.P.M.S. and Cavaleiro, J.A. (2005) Interactions of cationic porphyrins with double-stranded oligodeoxynucleotides: a study by electron ionisation mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **40**, 1439-1447.
- Reddi, E., Ceccon, M., Valduga, G., Jori, G., Bommer, J.C., Elisei, F., Latterini, L. and Mazzucato, U. (2002) Photophysical properties and antibacterial activity of *meso*-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol* **75**, 462-470.
- Russel, A.D. (2003) Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J Antimicrob Chemother* **52**, 750-763.
- Schaeffer, A.B. and MacDonald, F. (1933) A simplified method of staining endospores. *Science* **77**, 194.
- Setlow, P. (2005) The bacterial spore: nature's survival package. *Culture*. **26**, 1-4. (<http://www.oxoid.com/culture/26-2.pdf>)
- Setlow, P., Melly, E. and Cowen, A.E. (2002) Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *J Appl Microbiol* **93**, 316-325
- Sirish, M., Chertkov, V. and Schneider, H. (2002) Porphyrin-based peptide receptors:

- Synthesis and NMR analysis. *Chem. Eur J* **8**, 1181-1188.
- Sknavis, C. and Yanko, W.A. (2001) *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments. *Mar Pollut Bull* **42**, 31-35.
- Tomé, J.P.C., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Soncin, M., Magaraggia, M., Ferro, S. and Jori, G. (2004) Synthesis and antibacterial activity of new poly-S-lysine-porphyrin conjugates. *J Med Chem* **47**, 6649-6652.
- Tomé, J.P.C., Silva, E.M.P., Pereira, A., Alonso, C.M.A., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Tavares, S.A.P., Duarte, R.R., Caeiro, M.F. and Valdeira, M.L. (2007) Synthesis of neutral and cationic tripyridylporphyrin-D-galactose conjugates and the photoinactivation of HSV-1. *Bioorg Med Chem* **15**, 4705-4713.
- Vohra, A., Goswami, D.Y., Deshpande, D.A. and Block, S.S. (2005) Enhanced photocatalytic inactivation of bacterial spores on surface in air. *J Ind Microbial Biotechnol* **32**,364-370.
- Wainwright, M, (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemoth* **42**,13-28.



**Table 1.** Adsorption of Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me to *B. cereus* endospores after incubation in the dark for 3 h at 37°C (PS molecules.CFU<sup>-1</sup>).

Photosensitizer	Added concentration	
	10 μM	60 μM
Tri-Py <sup>+</sup> -Me-COOH	3.26E+06	2.28E+07
Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF	1.96E+07	3.18E+07
Tetra-Py <sup>+</sup> -Me	7.32E+06	1.63E+07

## Figure legends:

Figure 1: Structures of the photosensitizers used for the photoinactivation of *B. cereus* endospores and vegetative cells.

Figure 2: Survival of *B. cereus* endospores during PDI experiments with 10 and 60  $\mu\text{M}$  of PS using white light (400-800 nm) at a fluence rate of  $1690 \text{ W/m}^2$ . Values correspond to the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviation. (—○—light control, —●— dark control, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ ).

Figure 3: : Survival of *B. cereus* endospores during PDI experiments with 0.5, 1.0 and 5.0  $\mu\text{M}$  of Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF and Tetra-Py<sup>+</sup>-Me using white light (400-800 nm) at a fluence rate of  $1690 \text{ W/m}^2$ . Values correspond to the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviation. (—○—light control, —●— dark control, —■— 0.5  $\mu\text{M}$ , —▲— 1.0  $\mu\text{M}$ , —◆— 5.0  $\mu\text{M}$ ).

Figure 4: : Survival of *B. cereus* vegetative cells during PDI experiments with 10 and 60  $\mu\text{M}$  of Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH, Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me and TBO, using white light (400-800 nm) at a fluence rate of  $1690 \text{ W/m}^2$ . Values correspond to the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviation. (—○—light control, —●— dark control, —■— 10  $\mu\text{M}$ , —◆— 60  $\mu\text{M}$ ).

Figure 1

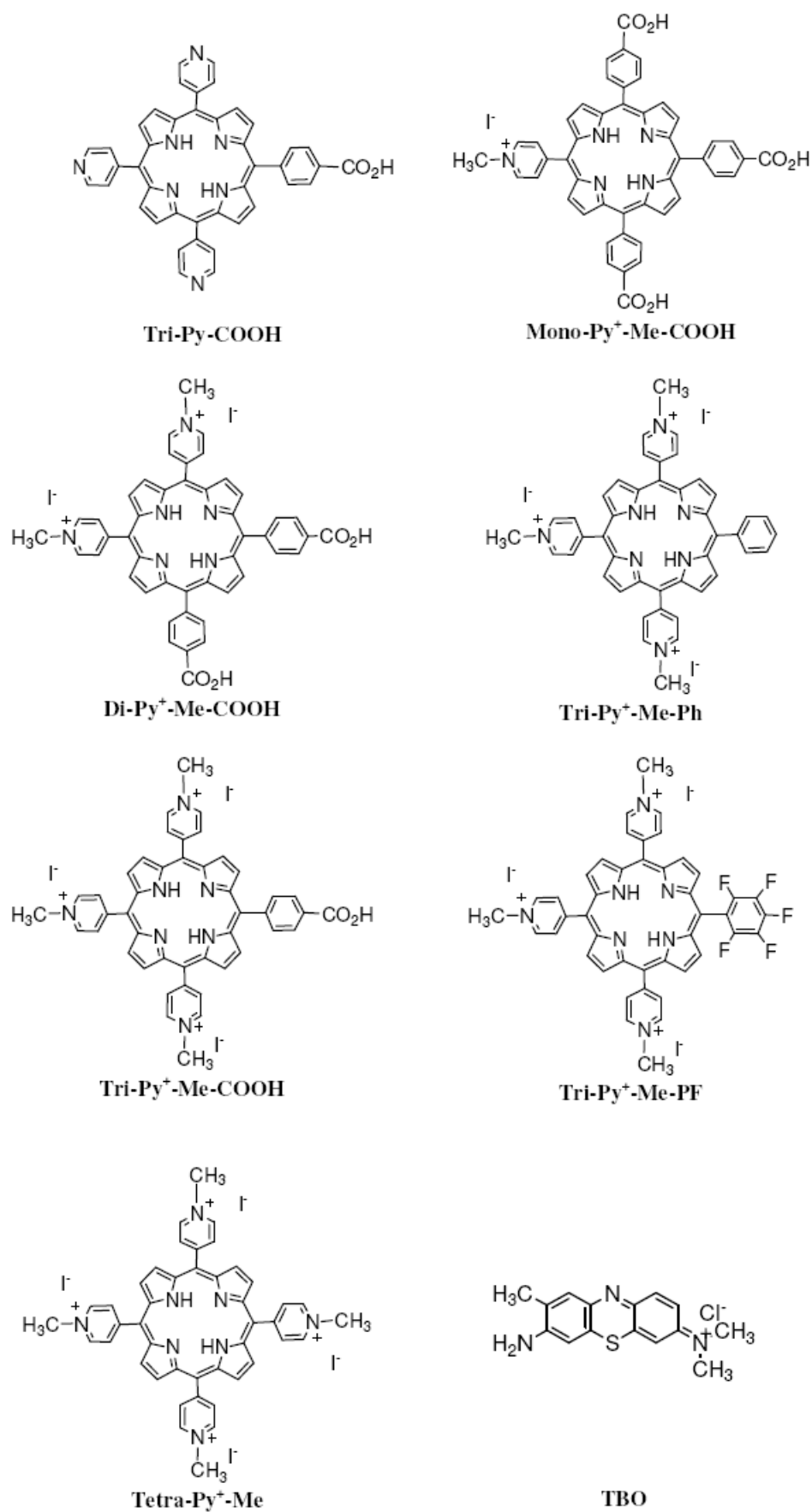


Figure 2

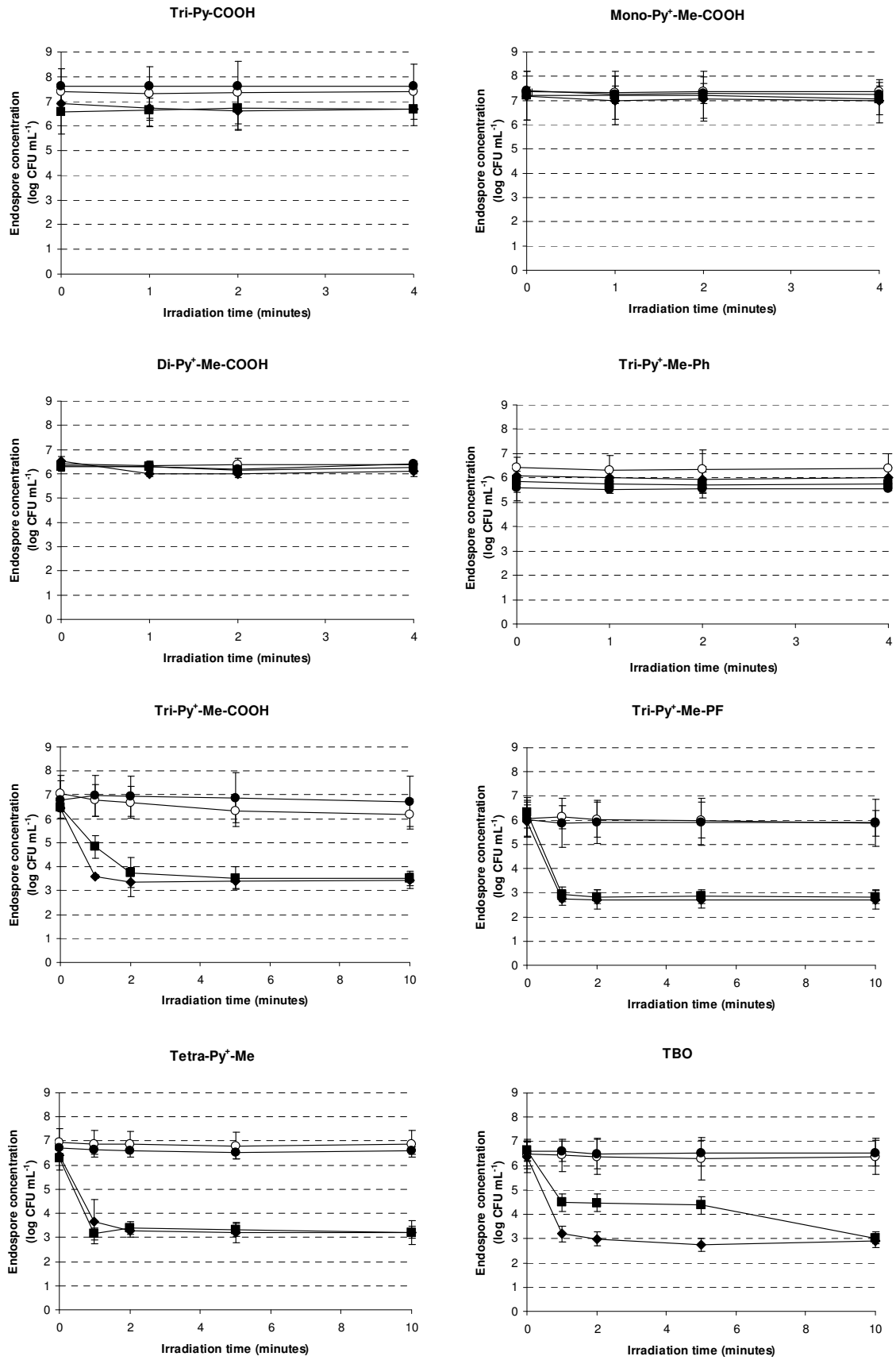
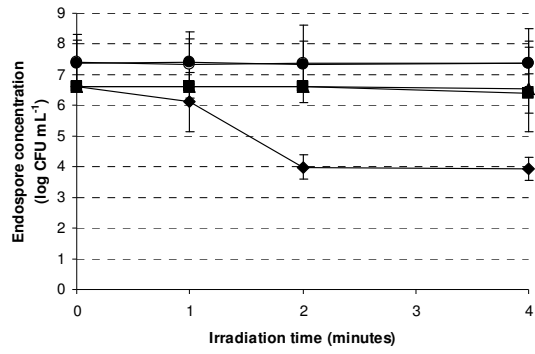
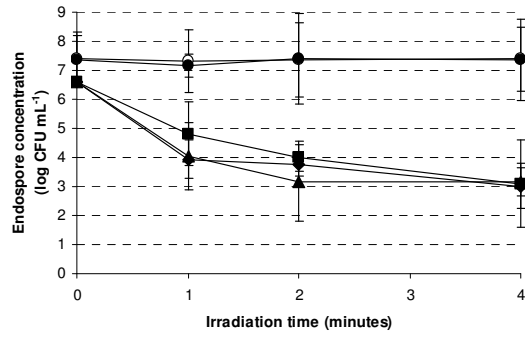


Figure 3

Tri-Py<sup>+</sup>-Me-COOH



Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF



Tetra-Py<sup>+</sup>-Me

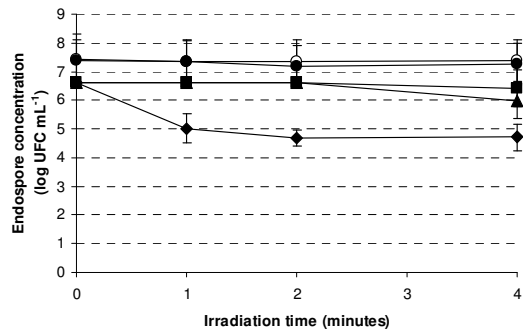


Figure 4

