



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Gabriela Batista Alves

Caracterização química e quantificação das porfirinas produzidas por amostras do complexo *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos de difteria e infecções invasivas e sua utilização como fotossensibilizador em terapia de fotoinativação

Rio de Janeiro

2024

Gabriela Batista Alves

Caracterização química e quantificação das porfirinas produzidas por amostras do complexo *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos de difteria e infecções invasivas e sua utilização como fotossensibilizador em terapia de fotoativação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos-Guaraldi

Coorientadora: Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/ REDE SIRIUS/ CB/A

A474 Alves, Gabriela Batista

Caracterização química e quantificação das porfirinas produzidas por cepas do complexo *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos de difteria e infecções invasivas e sua utilização como fotossensibilizador em terapia de fotoinativação / Gabriela Batista Alves. – 2024.

144 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos-Guaraldi

Coorientador: Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Ciências Médicas.

1. *Corynebacterium diphtheriae* – Teses. 2. Fotoquimioterapia – Métodos – Teses. 3. Porphirinas – Uso terapêutico – Teses. 4. Porphirinas – Química – Teses. I. Mattos-Guaraldi, Ana Luíza de. II. Sant'Anna, Louisy Sanches dos Santos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.873

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Gabriela Batista Alves

Caracterização química e quantificação das porfirinas produzidas por amostras do complexo *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos de difteria e infecções invasivas e sua utilização como fotossensibilizador em terapia de fotoinativação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 06 de novembro de 2024.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos-Guaraldi
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna (Coorientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Lincoln de Oliveira Sant'Anna
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Marta Antunes Pereira Langone
Instituto de Química - UERJ

Prof.^a Dra. Fabiana Cordeiro
Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca

Prof. Dr. Eliezer Menezes Pereira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha Mãe, Rosa Maria, por ter me ensinado a ser uma mulher forte,
ao meu pai Celso, por me ensinar a ver beleza nas coisas mais simples.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro que me acolheu há 30 anos atrás como profissional e estudante.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi, por me receber como aluna de doutorado no seu laboratório, pela orientação, incentivo e pela sabedoria compartilhada ao longo de toda essa jornada.

À minha coorientadora, Prof^a. Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna, pela compreensão, paciência, respeito e dedicação, elementos fundamentais para um relacionamento verdadeiro. Eu realmente aprendi muito com você.

Aos professores e técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas.

À Prof^a. Dra. Mônica Regina da Costa Marques Calderari e ao Farmacêutico MSc. Eduardo Nunes da Fonseca, do Instituto de Química da UERJ, pela colaboração no planejamento e execução das análises de HPLC deste trabalho. Agradeço por terem me recebido na Central Analítica Fernanda Coutinho e pelos valiosos conhecimentos compartilhados.

Aos Professores da Equipe de Química Geral e Inorgânica do IFRJ – Campus Rio de Janeiro – Adriana Pinheiro, Ederson Reis, Diego Lopes, Flávia Garcia, Maria Lúcia, Nelson Nolasco, Rafaela Sant'Anna, Rodrigo Ribeiro, Rodrigo Almeida, Thiago Silva e Wangler Compans – agradeço o apoio e compreensão durante esses 5 anos em que precisei me dividir entre as atividades da equipe e a execução deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC) – Adriane, Arize, Cassius, Cecília, Cynara, Guilherme, José Carlos, Julianna, Fellipe, Lincoln, Marcos, Mariana, Paula, Rose e Walmir - pela amizade, momentos divertidos e principalmente pelo espírito de cooperação que reina no laboratório.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas desta Universidade.

Aos meus pais, Rosa e Celso e minha irmã Tatiana, minhas primeiras referências de carinho e bons afetos. Obrigada pelo amor generoso e incondicional.

Ao meu marido Jorge Eduardo e meus filhos Bernardo e João Pedro agradeço o amor, bom humor, amizade e empenho em manter a nossa casa como um espaço seguro e um local de paz em tempos de tantas tempestades.

Aos meus amigos Ignacio, Soraia e Marcelo e meus sobrinhos Fernanda, Francisco e Rodrigo agradeço pela escuta atenta, pelo carinho e pelas conversas animadas ao redor da mesa de domingo e dias de festa.

À FAPERJ, CNPq, Capes, SR-2/UERJ, e IFRJ pelo apoio financeiro e logístico.

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less."

Marie Curie

RESUMO

ALVES, Gabriela Batista. **Caracterização química e quantificação das porfirinas produzidas por cepas do complexo *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos de difteria e infecções invasivas e sua utilização como fotossensibilizador em terapia de fotoinativação**. 2024. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Corynebacterium diphtheriae, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* são bactérias Gram-positivas do complexo *Corynebacterium diphtheriae*, conhecidas por possuírem potencial para produzir a toxina diftérica e outros fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade em diferentes contextos clínicos. Além da difteria, causada por *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, infecções sistêmicas, geralmente por cepas não-toxigênicas do complexo *C. diphtheriae*, são cada vez mais observadas, incluindo casos com resistência à antibioticoterapia. A elucidação dos mecanismos de virulência desses patógenos, além da toxina diftérica, é fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos e tecnologias de prevenção e tratamento. Porfirinas são moléculas macrocíclicas envolvidas no metabolismo do grupo heme. Células eucarióticas e bacterianas compartilham um precursor comum, o ácido aminolevulínico (ALA), que, ao ser adicionado ao meio de cultura bacteriano, aumenta o metabolismo do heme, provocando a secreção de porfirinas, úteis como fotossensibilizadores endógenos. A inativação fotodinâmica utilizando porfirinas endógenas surgiu como uma abordagem promissora para combater infecções bacterianas, uma vez que essas moléculas, ao interagirem com a luz, produzem espécies reativas de oxigênio que induzem a morte microbiana. Neste estudo, foi realizada a caracterização química e quantificação das porfirinas produzidas por *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, isoladas de casos de difteria e infecções invasivas, utilizando espectrometria de emissão e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores de fluorescência (FL), ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (EM). Foram identificadas três porfirinas: uroporfirina I, protoporfirina IX e coproporfirina III, com predominância desta última. A quantificação mostrou variações entre as amostras. Também foi investigada a influência do ALA, ferro e peróxido de hidrogênio no perfil das porfirinas de cepas de *C. diphtheriae*. A adição de ALA (2 mmol/L) aumentou a produção de porfirinas, enquanto a adição de ferro (2 µg/mL) e H₂O₂ em concentrações subinibitórias (subMIC) reduziu a produção. O perfil das porfirinas não foi alterado. O estudo demonstrou o potencial das porfirinas endógenas de *C. diphtheriae* como fotossensibilizadores para fotoinativação bacteriana em culturas planctônicas e biofilme. Os experimentos mostraram redução significativa das unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL) em todas as amostras após exposição à luz LED (402 nm). A eficiência da fotoinativação correlacionou-se diretamente com a quantidade de porfirinas produzidas. A suplementação de ALA aumentou a eficiência da fotoinativação, e células planctônicas mostraram-se ligeiramente mais susceptíveis à luz do que as células de biofilme. A formação de biofilme correlacionou-se positivamente com a produção de porfirinas, sugerindo uma relação entre o metabolismo do heme e a formação de biofilme.

Palavras-chave: *Corynebacterium diphtheriae*. Porfirinas; terapia fotodinâmica; metabolismo do grupo heme.

ABSTRACT

Alves, Gabriela Batista. *Chemical characterization and quantification of porphyrins produced by strains of the Corynebacterium diphtheriae complex isolated from cases of diphtheria and invasive infections and their use as photosensitizers in photoinactivation therapy*. 2024. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Corynebacterium diphtheriae, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* are Gram-positive bacteria of the *Corynebacterium diphtheriae* complex, known to produce diphtheria toxin and other virulence factors that contribute to their pathogenicity in different clinical contexts. In addition to diphtheria, caused by *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*, systemic infections, usually by non-toxigenic strains of the *C. diphtheriae* complex, are increasingly observed, including cases with resistance to antibiotic therapy. Elucidating the virulence mechanisms of these pathogens, in addition to diphtheria toxin, is fundamental for the development of new drugs and technologies for prevention and treatment. Porphyrins are macrocyclic molecules involved in the metabolism of the heme group. Eukaryotic and bacterial cells share a common precursor, aminolevulinic acid (ALA), which, when added to the bacterial culture medium, increases heme metabolism, causing the secretion of porphyrins, useful as endogenous photosensitizers. Photodynamic inactivation using endogenous porphyrins has emerged as a promising approach to fighting bacterial infections, since these molecules, when interacting with light, produce reactive oxygen species that induce microbial death. In this study, the chemical characterization and quantification of porphyrins produced by *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*, isolated from cases of diphtheria and invasive infections, was carried out using emission spectrometry and high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with fluorescence (FL), ultraviolet (UV) and mass spectrometry (MS) detectors. Three porphyrins were identified: uroporphyrin I, protoporphyrin IX and coproporphyrin III, with the latter predominating. Quantification showed variations between the samples. The influence of ALA, iron and hydrogen peroxide on the porphyrin profile in *C. diphtheriae* strains was also investigated. The addition of ALA (2 mmol/L) increased porphyrin production, while the addition of iron (2 µg/mL) and H₂O₂ at subinhibitory concentrations (subMIC) reduced production. The porphyrin profile was not altered. The study demonstrated the potential of endogenous porphyrins from *C. diphtheriae* as photosensitizers for bacterial photoinactivation in planktonic and biofilm cultures. The experiments showed a significant reduction in colony-forming units/mL (CFU/mL) in all samples after exposure to LED light (402 nm). The efficiency of photoinactivation correlated directly with the amount of porphyrins produced. ALA supplementation increased photoinactivation efficiency, and planktonic cells were slightly more susceptible to light than biofilm cells. Biofilm formation correlated positively with porphyrin production, suggesting a relationship between heme metabolism and biofilm formation.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*; porphyrins; photodynamic inactivation; heme metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de casos e cobertura de vacinação mundial entre 2009 e 2022 de acordo com a Organização Mundial de Saúde	20
Figura 2 - Número de casos e cobertura de vacinação no Brasil entre 2009 e 2022 de acordo com o DataSus.	21
Figura 3 - Estrutura da toxina diftérica.....	23
Figura 4 - Publicações indexadas no PubMed com as palavras-chave “photodynamic therapy” and “bacteria” nos últimos 20 anos.....	30
Figura 5 - Regiões do espectro eletromagnético	31
Figura 6 - Estrutura geral das porfirinas	32
Figura 7 - Estruturas químicas e exemplos de porfirinas e seus derivados	33
Figura 8 - Espectro de absorção da coproporfirina III em HCl (1 mol/L).....	34
Figura 9 - Modelo dos quatro orbitais de fronteira proposto por Gouterman para porfirinas com simetria D_{4h} e D_{2h}	35
Figura 10 - Espectro de emissão da Uroporfirina I em HCl 5%.....	36
Figura 11 - Representação esquemática das possíveis transições eletrônicas após excitação por $h\nu$ (luz) e diagrama de Jablonski simplificado.	37
Figura 12 - Diagrama de Jablonski e o mecanismo de funcionamento da fototerapia.....	38
Figura 13 - Estrutura da catalase de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	39
Figura 14 - Via metabólica de síntese do grupo heme.	40
Figura 15 - Espectros de emissão dos padrões de coproporfirina III, protoporfirina IX, uroporfirina I e do extrato obtido da amostra HC04 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).	55
Figura 16 - Espectros de absorção dos padrões de coproporfirina III, protoporfirina IX, uroporfirina I e do extrato de porfirinas obtido da amostra HC04 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).	55
Figura 17 - Cromatograma obtido na CLAE-FLD dos padrões e do extrato de porfirinas da amostra HC03 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).	57
Figura 18 - Cromatograma obtido na CLAE-UV dos padrões e do extrato de porfirinas da amostra HC03 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).	58

Figura 19 - Cromatograma obtido na CLAE-UV do extrato de porfirinas da amostra HC03, cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L), e espectro de absorção de sinal (no detalhe) a 8,24 minutos.	59
Figura 20 - Cromatogramas do extrato de porfirinas da amostra HC04 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L) obtidos em CLAE-EM.	60
Figura 21 - Curvas de calibração A e B com seus respectivos coeficientes de linearidade obtidas na CLAE-UV.	61
Figura 22 - Quantificação da coproporfirina III produzida pelas amostras estudadas cultivadas em TSB com suplementação de ALA 2 mmol/L.	62
Figura 23 - Espectros de absorção obtidos dos extratos de porfirinas das amostras ATCC 27010 e HC04 nas condições de cultivos estudadas.	63
Figura 24 - Espectros de absorção obtidos dos extratos de porfirinas das amostras ATCC 27010 e HC04 nas condições de cultivos estudadas.	64
Figura 25 - Quantificação da coproporfirina III produzida pelas amostras nas diferentes condições de cultivo.	65
Figura 26 - Fotoativação de células planctônicas e biofilme em culturas com e sem suplementação de ALA.	67
Figura 27 - Via metabólica de síntese do grupo heme para a amostra <i>C. diphtheriae</i> ATCC 27010 (NCTC 11397) e as anotações dos genes <i>hemG</i> , <i>hemH</i> e <i>hemQ</i> da KEGG.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem e principais características das cepas de <i>C. diphtheriae</i> selecionadas para este estudo.....	44
Tabela 2 - Picos de emissão e absorção obtidos nas análises de espectroscopia dos padrões de porfirinas e dos extratos de porfirinas das amostras cultivadas em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).	54
Tabela 3 - Tempos de retenção (min) dos sinais obtidos dos padrões e dos extratos de porfirinas das amostras estudadas, cultivadas em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L), nos cromatogramas da CLAE-FLD e CLAE-UV	56
Tabela 4 - Tempos de retenção dos sinais (min) dos padrões de porfirinas e dos extratos de porfirinas das amostras, cultivadas em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L), obtidos na CLAE-EM	60
Tabela 5 - Picos de absorção e emissão obtidos nas análises de espectroscopia de emissão e absorção dos padrões e dos extratos de porfirinas das amostras nas diferentes condições de cultivo	63
Tabela 6 - Tempos de retenção em minutos dos sinais dos padrões de porfirinas e extratos de porfirinas das amostras nas diferentes condições de cultivos obtidos na CLAE-EM.	65
Tabela 7 - Fração de sobrevivência (N/N ₀) de culturas bacterianas fotossensibilizadas por suas porfirinas endógenas após 90 minutos de iluminação.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato adenosina
ALA	Ácido δ -aminolevulínico
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	Absorbance Units (unidade de absorção)
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa
CLAE-FLD	Cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria de fluorescência
CLAE-UV	Cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria ultravioleta
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CMNR	Grupo <i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia e Rhodococcus</i>
CPIII	Coproporfirina III
DMIP	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
DNA	Ácido desoxirribonucleio
DO ₅₉₀	Densidade óptica a 590 nm
DT-A	Domínio catalítica da toxina diftérica
DT-B	Domínio de translocação da toxina diftérica
DTP	Vacina para difteria e tétano
DtxR	Diphtheria Toxin Repressor
EF-2	Fator de alongamento 2
EM	Espectrometria de massas
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
HEp-2	Células epiteliais de carcinoma de laringe humana
HPLC	High-performance liquid chromatography (inglês)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LDCIC	Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica
LED	Light Emiting Diode
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LU	Luminescence Units (unidade de luminescência)
min	minutos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Não detectado
PBS	Tampão fosfato salino
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potencial hidrogeniônico
PPIX	Protoporfirina IX
RNA	Ácido ribonucleico
SARS-CoV-2	Corona vírus 2 da síndrome respiratória aguda grave.
Spa	Sortase-mediate pilus assembly
TD	Toxina diftérica
TFD	Terapia fotodinâmica
TIC	Total ion chromatogram
<i>tox</i>	Gene tox
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo Soja Tripticaseína
u.a	Unidade absorvância
U-937	Linhagem de células da leucemia monocítica humana
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPI	Uroporfirina I
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USA	United States of America
UV	Ultravioleta
rpm	rotações por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentual
π	pi
$[M+H]^+$	ión molecular carga +1
$[M+H]^{2+}$	ión molecular carga +2
0'	zero minutos
30'	trinta minutos
60'	sessenta minutos
90'	noventa minutos
Å	angstrom
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
FeSO ₄	sulfato ferroso
h	hora
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
Hz	hertz
kDa	kilodalton
kHz	kilohertz
kV	quilovolt
L	litro
m/s	metro por segundo
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
mol	mol
mW	miliwatt
N	UFC/mL após a exposição à luz
N ₀	UFC/mL antes da exposição à luz

nm	nanômetro
nmol	nanomol
O ₂	oxigênio molecular
O ₂ ⁻	íon superóxido
°C	grau Celsius
·OH	radical hidroxil
pH	potencial hidrogeniônico
pm	picômetro
S ₁	estado singleto excitado 1
S ₂	estado singleto excitado 2
T ₁	estado tripleto excitado 1
v	volt
W	watt
α	alfa
β	beta
γ	gama
μg	micrograma
μL	microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	42
1.1. Justificativa e objetivo geral	42
1.2. Objetivos específicos	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Origem, identificação e estocagem das cepas bacterianas	44
2.2. Caracterização química e quantificação das porfirinas	45
2.2.1. <u>Condições de cultivo e preparo das suspensões bacterianas</u>	45
2.2.2. <u>Extração das porfirinas</u>	45
2.2.3. <u>Preparo das soluções padrões</u>	46
2.2.4. <u>Espectroscopia de absorção</u>	46
2.2.5. <u>Espectroscopia de emissão</u>	46
2.2.6. <u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE-FLD)</u>	47
2.2.7. <u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de absorção ultravioleta (CLAE-UV)</u>	48
2.2.8. <u>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detector de massas (CLAE-EM)</u>	48
2.2.9. <u>Análise quantitativa da produção da coproporfirina III entre as amostras e diferentes condições de cultivos</u>	49
2.3. Influência da concentração de ferro na produção de porfirinas	50
2.4. Influência do peróxido de hidrogênio no metabolismo de porfirinas	50
2.4.1. <u>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de peróxido de hidrogênio</u> ..	50
2.4.2. <u>Efeito do peróxido de hidrogênio na produção de porfirinas</u>	51
2.5. Pesquisa <i>in silico</i> pelos genes envolvidos na síntese do grupo heme	51
2.6. Estudo da utilização das porfirinas endógenas produzidas por <i>C. diphtheriae</i> como fotossensibilizador em terapias de fotoinativação	51
2.7. Fotoinativação de células planctônicas	52
2.8. Formação e fotoinativação do biofilme em Thermanox®	52
2.9. Fonte de luz e protocolo de exposição à luz	53
2.10. Análise estatística	53
3. RESULTADOS	54

3.1. Caracterização química das porfirinas produzidas por <i>C. diphtheriae</i>, <i>C. ulcerans</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i>	54
3.2. Quantificação de coproporfirina III produzida por <i>C. diphtheriae</i>, <i>C. ulcerans</i> e <i>C. pseudotuberculosis</i>	61
3.3. Influência do ácido aminolevulínico (ALA), FeSO₄ e peróxido de hidrogênio na produção de porfirinas	62
3.4. Estudo da utilização das porfirinas endógenas utilizadas por <i>C. diphtheriae</i> como fotossensibilizador em terapias de fotoinativação	66
3.5. Pesquisa <i>in sílico</i> pelos genes envolvidos na biossíntese da coproporfirina III	68
4. DISCUSSÃO.....	70
CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	80
ANEXO A – Aprovação no comitê de ética e pesquisa.....	95
ANEXO B – Comprovação de submissão do 1º. artigo científico.....	96
ANEXO C - Formato final do 1º artigo científico aceito	98
ANEXO D - Comprovação de aceite do 1º artigo científico	109
ANEXO E - Comprovação de submissão do 2º artigo científico	110
ANEXO F - Formato final do 2º artigo científico submetido.....	111

INTRODUÇÃO

Corinebactérias e o Complexo *Corynebacterium diphtheriae*

As corinebactérias pertencem ao filo Actinomycetota, sendo bactérias Gram-positivas com alto conteúdo de DNA G+C (1). Dentro deste filo, junto com os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, formam o grupo CMNR, com base em uma estrutura complexa de parede celular que contém ácidos micólicos, característica desses quatro gêneros (2,3). Até o momento, foram descritas 167 espécies taxonomicamente válidas de *Corynebacterium* (4). Mais da metade delas foi isolada de material humano e animal, o que indica a considerável importância médica e veterinária do gênero. Isso é especialmente verdadeiro para o grupo de corinebactérias potencialmente toxigênicas que formam o complexo *Corynebacterium diphtheriae*, inicialmente formado por *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Essas espécies podem ser lisogenizadas por corinebacteriófagos que codificam genes *tox* e, conseqüentemente, expressar e secretar a exotoxina diftérica (2,5).

As novas espécies recentemente descritas, *Corynebacterium belfantii*, *Corynebacterium rouxii*, *Corynebacterium silvaticum* e *Corynebacterium ramonii* também são potenciais portadoras do gene *tox*, que codifica a toxina diftérica, e podem, portanto, ser incluídas nesse grupo (2,6–8). As espécies do complexo *C. diphtheriae* tem potencial para infectar diferentes espécies hospedeiras e causar doenças zoonóticas, infecções em animais economicamente importantes e infecções em humanos como a difteria respiratória, a difteria cutânea e infecções invasivas como endocardite e osteomielite (9,10).

Difteria

A difteria é uma infecção potencialmente fatal causada principalmente por cepas toxigênicas de *Corynebacterium diphtheriae* e, ocasionalmente, por cepas toxigênicas de *C. ulcerans* (11).

A difteria respiratória atormentou a humanidade por milhares de anos. No início do século XIX era conhecida como o “anjo estrangulador de crianças” e foi a principal causa de mortalidade infantil, com taxas de mortalidade de aproximadamente 80% (5,9,12).

Seus sintomas são febre leve e uma faringite exsudativa no início da infecção. A doença progride com a formação de uma pseudomembrana acinzentada nas amígdalas, faringe e laringe. A extensão da inflamação para a cavidade nasal e na laringe pode causar obstrução das vias aéreas, resultando em dispneia até sufocamento e morte (9–11,13). A difteria pode ser transmitida pelo contato direto entre um indivíduo doente ou assintomático e outro susceptível por meio das gotículas de secreções eliminadas na tosse, espirro ou na fala e o tempo de incubação varia entre 2 e 6 dias (14). Com a evolução da doença, o estado geral do paciente se agrava devido a absorção da toxina, responsável por efeitos sistêmicos. A ação da toxina no miocárdio pode resultar em insuficiência cardíaca aguda e os efeitos da ação sobre o sistema nervoso central estão associadas ao agravamento dos sintomas respiratórios (10,13,15).

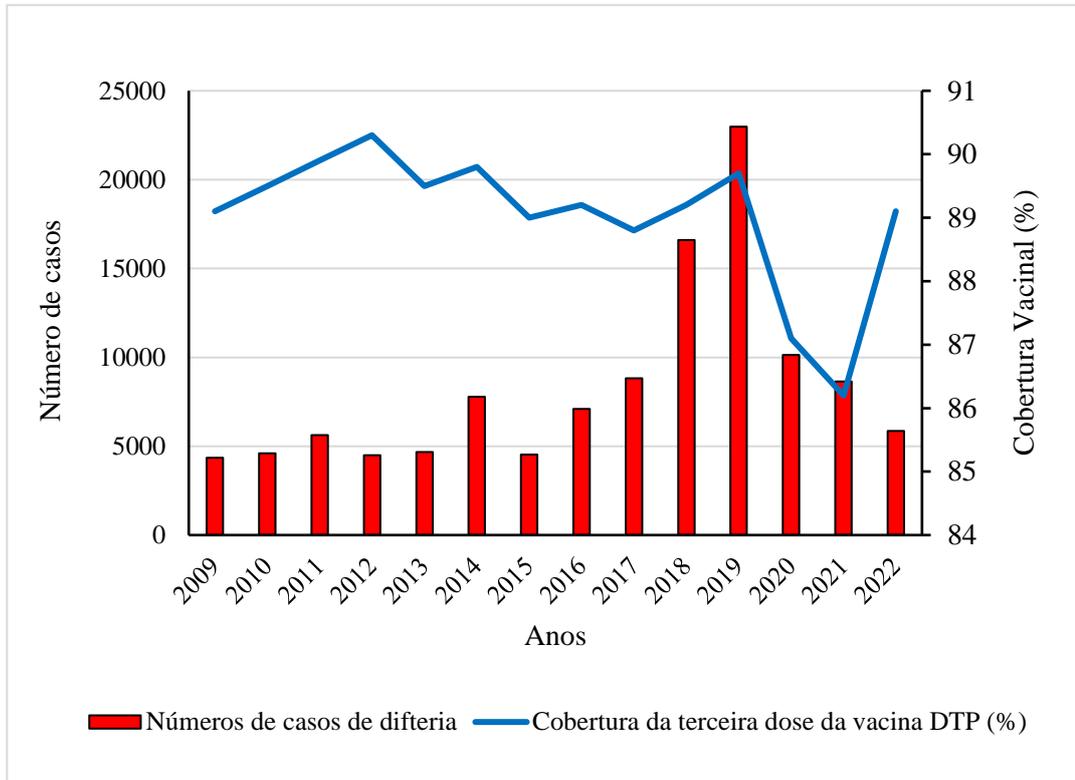
Além da forma respiratória há a forma cutânea da difteria que se apresenta sob a forma de úlcera arredondada, com exsudato fibrino purulento e bordas bem demarcadas e, embora profunda, não alcança o tecido celular subcutâneo. Seu portador constitui-se reservatório e disseminador do bacilo diftérico, daí sua importância na cadeia epidemiológica da doença (10,11,16,17).

Em 1901 Emil von Behring desenvolveu um tratamento para difteria com base na administração de um soro antitoxina da difteria, produzido em cavalos e por isso foi agraciado com o Prêmio Nobel de medicina em 1901 (18,19). A primeira vacina foi produzida em 1923, por meio do tratamento com formalina da toxina da difteria, e foi a base da subsequente vacinação em massa iniciada nos países industrializados na década de 1920 (20).

Embora tenha sido observada uma diminuição do número de casos da doença devido à vacinação, desde a década de 50, a difteria permanece endêmica em muitos países e surtos esporádicos da doença têm sido notificados. No final do século XX, a possibilidade de uma pandemia de difteria voltou a preocupar a população mundial. Na década de 90, a doença ressurgiu na Europa, atingindo principalmente a Federação Russa, os novos estados independentes e os países Bálticos, constituindo-se na maior epidemia de difteria nos últimos 30 anos com 157.000 casos registrados e mais de 5000 mortes (21–24). Essa pandemia foi debelada pela vacinação em massa da população, principalmente em adultos com níveis de anticorpos baixos. No entanto, apesar dos esforços globais para aumentar a cobertura vacinal a difteria não foi erradicada até hoje. Na década passada ocorreram surtos de difteria em países da Ásia, como Bangladesh e Iémen, do Caribe, na Venezuela e Haiti e na África do Sul (11,25–

28). A Figura 1 mostra evolução dos casos através dos anos e a respectiva cobertura vacinal com a vacina para difteria e tétano (DTP) no mundo (9,29,30).

Figura 1 - Número de casos e cobertura de vacinação mundial entre 2009 e 2022 de acordo com a Organização Mundial de Saúde

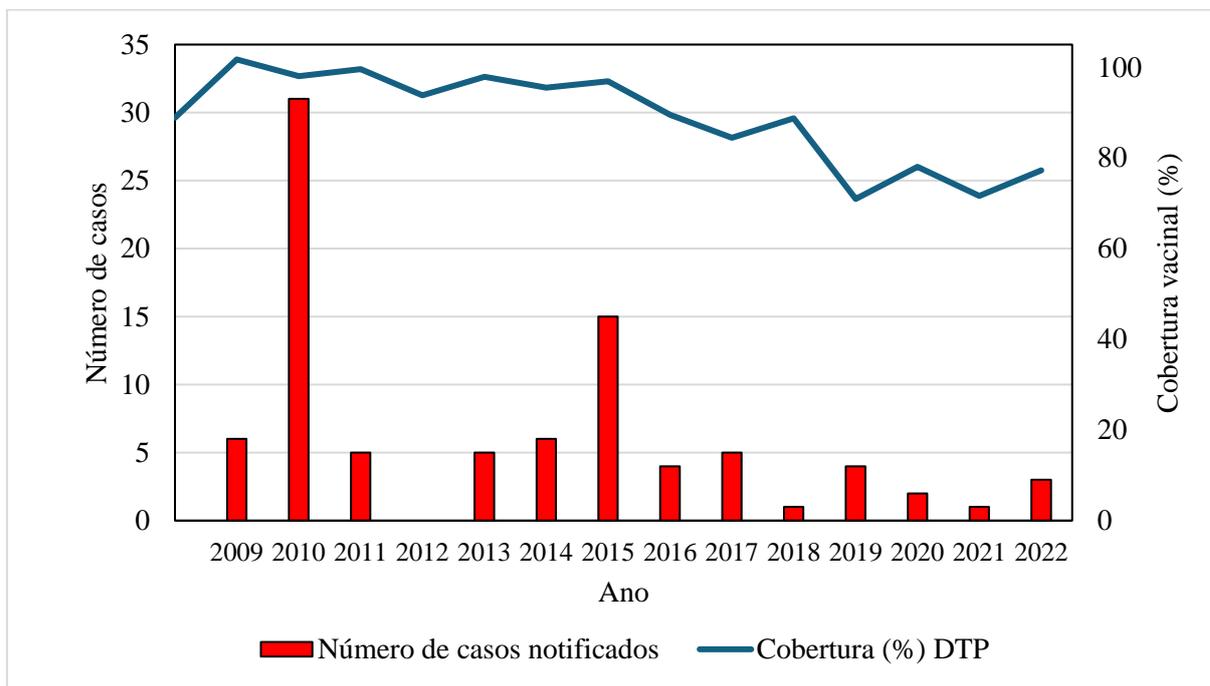


Dados obtidos no site da Organização Mundial da Saúde (29)

Fonte: A autora, 2024.

Desde a década de 1990, o Brasil apresentou importante redução na incidência dos casos, mediante a ampliação das coberturas vacinais. Naquela década, a incidência chegou a 0,45/100 mil habitantes, diminuindo à medida que as coberturas se elevaram. A cobertura vacinal com a DTP nesse período passou de 66%, em 1990, para mais de 95%, em 2015. No entanto, como mostrado na Figura 2, a partir de 2016 e até o presente momento observa-se uma redução nas coberturas vacinais estando as mesmas abaixo da meta preconizada de 95% (31).

Figura 2 - Número de casos e cobertura de vacinação no Brasil entre 2009 e 2022 de acordo com o DataSus.



Dados retirados do sistema TabNet do DataSUS (32,33)

Fonte: A autora, 2024

No Brasil, em 2010, ocorreu um surto importante no Estado do Maranhão, que revelou mudanças em aspectos clínicos-epidemiológicos da difteria. Aspectos patognomônico da doença não foram revelados em parte dos casos e neste surto, dos 27 casos confirmados, 10 foram em pacientes previamente vacinados (34). Outro surto relevante ocorreu em 2015, no Estado de Pernambuco, com 11 casos confirmados e uma morte (32).

Outra preocupação importante é o aumento do número de casos de difteria causados por amostras de *C. ulcerans* (11). Em 2014, na Alemanha, dos 9 casos de difteria reportados, 6 foram causados por *C. ulcerans* e 3 por *C. diphtheriae* (35). De forma semelhante, nas últimas 3 décadas, *C. ulcerans* foi isolado com mais frequência que *C. diphtheriae* de casos de difteria ocorridos no Reino Unido (36). A emergência de *C. ulcerans* como o principal agente etiológico da difteria em alguns países ressalta a possibilidade de transmissão zoonótica da doença (35,37,38).

Estima-se que devido a pandemia de SARS-CoV-2, que sobrecarregou os sistemas de saúde pública e comprometeu os programas de imunização, haja um aumento dos casos de difteria e infecções por corinebactérias (9). Diante dos novos aspectos acerca dos processos infecciosos desencadeados por *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, estes podem, atualmente, ser

considerados patógenos reemergentes (39–41), trazendo a necessidade de pesquisas sobre os mecanismos de patogenicidade tanto de cepas toxigênicas quanto atoxigênicas.

Corynebacterium diphtheriae

A bactéria *Corynebacterium diphtheriae* foi descrita pela primeira vez em 1884 por Friedrich Löffler, que também demonstrou que essa bactéria é o agente etiológico da difteria (42). É um bacilo Gram-positivo, aeróbio facultativo, imóvel, pleomórfico, que forma arranjos em paliçadas. Até recentemente, eram reconhecidos 4 biovares desta espécie: *mitis*, *gravis*, *intermedius* e *belfanti* (43,44). A capacidade de redução de nitrato, de fermentação de glicogênio e a lipofilia eram utilizadas para diferenciação destes biovares. O biovar *belfanti* diferenciava-se dos demais pela incapacidade de reduzir nitrato; o biovar *intermedius* é o único que apresenta colônias lipofílicas e o biovar *mitis* se diferencia do *gravis* pela incapacidade de fermentar glicogênio. Atualmente, as amostras previamente identificadas como biovar *belfanti* foram reclassificadas em duas novas espécies: *Corynebacterium belfantii* e *Corynebacterium rouxii* (6,45).

Independentemente do biovar, amostras de *C. diphtheriae* são capazes de produzir uma exotoxina, a toxina diftérica (TD), que possui quimiotropismo para células do miocárdio, rins, suprarrenais e sistema nervoso, inibindo a síntese proteica nas células do hospedeiro, ocasionando os principais sintomas da difteria clássica. Outras espécies de corinebactérias, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium silvaticum*, *Corynebacterium ramonii*, além de *Corynebacterium belfantii* e *Corynebacterium rouxii*, também podem produzir TD (10).

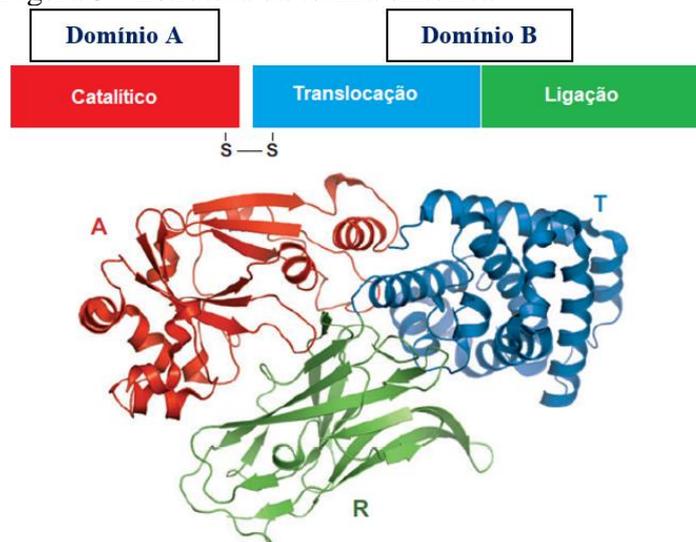
A vacina contra a difteria é uma preparação de toxóide inativado e proporciona proteção contra doenças mediadas por esta toxina, mas não previne a colonização ou infecção por cepas não toxigênicas. A infecção por *C. diphtheriae* não toxigênica se manifesta mais comumente como doença respiratória leve ou lesões cutâneas, mas emergiu como uma causa importante de doenças invasivas em indivíduos suscetíveis. A endocardite infecciosa é a apresentação mais comumente relatada (34,46–53). Casos de osteomielite (54), abscessos esplênicos (55), artrite séptica (56) e septicemia (52,57) causados por cepas de *C. diphtheriae* não toxinogênicas também já foram descritos.

Diante da versatilidade deste patógeno em causar diversos tipos de infecção, é essencial compreender os principais fatores de virulência que contribuem para sua capacidade patogênica em diferentes contextos clínicos.

O principal e mais conhecido fator de virulência de *C. diphtheriae* é a produção da toxina diftérica (TD), um polipeptídeo de aproximadamente 58 kDa e 535 aminoácidos (58–60). A molécula contém quatro resíduos de cisteína e duas pontes dissulfídicas internas. A redução das pontes dissulfídicas gera o fragmento A (TD-A) livre, que corresponde ao domínio catalítico (do tipo ADP-ribosiltransferase) da toxina e o fragmento B (TD-B) que corresponde aos domínios de translocação e ligação ao receptor da TD (Figura 3). O efeito citotóxico da TD deve-se à inibição da síntese proteica através da ribosilação do fator de alongamento EF-2 pelo domínio DT-A (19).

A TD pode ser produzida apenas por amostras que possuem o gene codificador (gene *tox*), carregado por fagos lisogênicos. A sua produção é diretamente afetada pela composição do meio de cultura e pelas condições de cultivo. A transcrição do gene *tox* é negativamente regulada por íons de ferro e uma proteína repressora DtxR (*Diphtheria Toxin Repressor*), que atua sobre a região promotora do gene da TD. Esta proteína ligante de DNA (*DNA-binding protein*), dependente de ferro, tem grande destaque pois atua como um regulador global do metabolismo do *C. diphtheriae* (61).

Figura 3 - Estrutura da toxina diftérica



Legenda: a TD é organizada em duas partes: domínios A e B. O domínio N-terminal (193 aminoácidos) representa o domínio A, catalítico (em vermelho) e o domínio C-terminal (342 aminoácidos) representa o domínio B e é funcionalmente dividido em um domínio de translocação (T) (em azul) e o domínio de ligação ao receptor (R) (em verde) (62)

Fonte: Adaptado de Protein Data Bank - file 1F0L

Embora a toxina diftérica seja amplamente reconhecida como o principal fator de virulência da *C. diphtheriae*, a ocorrência de infecções invasivas causadas por amostras não toxinogênicas sugerem que outros fatores, além da TD, atuam no processo infeccioso. Dentre eles, já foram descritas a capacidade de aderência e sobrevivência no interior de células eucarióticas, independente da expressão do gene *tox*.

A interação entre bactérias patogênicas e seus hospedeiros envolve uma série de mecanismos complexos que permitem a aderência, invasão e sobrevivência das bactérias dentro do ambiente hospedeiro. Esses processos são fundamentais para a patogênese, uma vez que determinam a capacidade do patógeno de colonizar tecidos, escapar das respostas imunológicas e estabelecer infecções (9).

Os mecanismos de adesão de *C. diphtheriae* foram descritos como processos multifatoriais que funcionam de forma específica para cada cepa (9,63). Testes de hemaglutinação indicaram a capacidade do bacilo diftérico em aderir a membranas de células eucarióticas e a presença de fímbrias está associada a uma parte das amostras positivas para o teste (64,65). As fímbrias são estruturas poliméricas, semelhantes a um fio, feitas de pilinas ligadas de forma covalente a uma adesina que se fixam ao peptidoglicano da parede celular bacteriana e estão envolvidas em uma ampla gama de atividades celulares, incluindo aderência, motilidade, conjugação e virulência.

Os estudos mostram em *C. diphtheriae* a presença de três estruturas fimbriais diferentes, identificadas como Spa (sortase-mediate pilus assembly): pilus SpaA, pilus SpaD e pilus SpaH. Até o momento já foi descrito o envolvimento dessas fímbrias na aderência de células epiteliais de laringe e no processo patogênico provocado no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (64,66–68).

A investigação sobre as propriedades adesivas do bacilo diftérico também levou a identificação de uma proteína de natureza não fimbrial chamada de DIP0733. Ela está envolvida em processos de aderência com eritrócitos e células epiteliais de faringe humana (HEp-2) e é codificada pelo gene *DIP0733*. Estudos adicionais descreveram o seu papel na invasão e na indução de apoptose das células HEp-2 (69–71).

A participação de carboidratos de superfície, proteína lectínica e glicolípídeos nas interações do *C. diphtheriae* com o hospedeiro também já foi descrita. Moléculas contendo resíduos de ácido siálico, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, galactose e manose com afinidade para lectina estão envolvidas em processos de aderência em superfícies abióticas e influenciam diretamente no grau de hidrofobicidade dessas amostras (63,72–76).

O grau de hidrofobicidade da superfície de *C. diphtheriae* favorece a aderência às superfícies abióticas e autoaglutinação, favorecendo a formação de biofilme. O biofilme pode ser definido como um conjunto de bactérias firmemente aderida a uma superfície, englobado por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos produzidos pelas próprias bactérias. O biofilme bacteriano consiste em uma forma sésil e adaptativa no ciclo biológico das bactérias, com características genótípicas e fenotípicas distintas que o distingue das formas bacterianas livres e circulantes, denominadas de formas planctônicas. Estas estruturas se desenvolvem dinamicamente através de processos que envolvem a aderência a uma superfície, maturação e o desprendimento para a dispersão dos seus organismos (77,78). A capacidade de formar biofilme permite que o patógeno se proteja em condições adversas, como a ação do sistema imunológico e a presença de antimicrobianos além de proporcionar a sobrevivência por longos períodos fora do hospedeiro, facilitando a transmissão e infecção.

A formação de biofilme pelo *C. diphtheriae* já foi descrita inicialmente em superfície de cateter, estimulando a investigação acerca desta propriedade de virulência em outras cepas de bacilo diftérico isoladas de sítios diversos, especialmente aquelas isoladas de quadros invasivos (79). No estudo, a formação de microcolônias (uma marca da formação de biofilme) e aglomerações amorfas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura tanto na superfície externa como na luz do cateter. Adicionalmente, todas as cepas invasivas testadas formaram biofilme em poliestireno em intensidade muito maiores que as cepas isoladas de casos de difteria clássica (80–83).

Além da adesão, a capacidade de penetrar e sobreviver em células de linhagens humanas constitui um importante fator para a manutenção e proliferação do patógeno no ambiente e no hospedeiro, além de justificar a ocorrência de infecções invasivas. Pesquisas demonstraram a internalização e sobrevivência de *C. diphtheriae* em diversos tipos de linhagens, incluindo linhagens de células humanas epiteliais respiratórias do tipo HEp-2 (69,84) endoteliais (85) e monocíticas, o que contribui para manutenção do patógeno nas vias aéreas (9,86–88).

Acerca das propriedades que permitem a sobrevivência da bactéria *C. diphtheriae* nas células hospedeiras há estudos que revelam a presença de genes de resistência à agentes estressantes, como as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). ERO é um grupo de moléculas ou átomos que apresentam elétrons desemparelhados, sendo altamente instáveis e por isso muito reativos. Destacam-se as espécies superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($\cdot OH$) e outras espécies que apesar de não serem paramagnéticas, são fortes agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs podem ser produzidas durante a respiração celular, na presença

de alguns agentes químicos, como paraquate e íons metálicos e pelas células de defesa, promovendo um estresse oxidativo na célula-alvo, causando morte celular por apoptose e necrose (89,90).

A resistência ao telurito é uma importante propriedade de resistência às EROS descrita para *C. diphtheriae*. Estudos descrevem a participação dos genes responsáveis pela resistência ao telurito nos mecanismos de virulência do *C. diphtheriae*. O silenciamento do gene *Te^R* afetou a habilidade da bactéria em sobreviver em células epiteliais humanas (HEp-2) e diminuiu a letalidade no modelo experimental *in vivo* *C.elegans* (91).

Outro fator fundamental na sobrevivência de *C. diphtheriae* na presença de EROS é o sistema OxyR. O OxyR é um regulador global que ajuda a bactéria a responder ao estresse oxidativo. Ele desempenha um papel significativo na gestão dos efeitos das espécies reativas de oxigênio que podem danificar componentes celulares. Estudos da disrupção do gene *OxyR* mostrou o comprometimento da capacidade de adesão e invasão da bactéria em células Hep-2 e de sobrevivência em células de linhagens monocíticas (9,92,93). Além disso, em modelos animais, a disrupção do *oxyR* foi associada a uma diminuição no potencial de *C. diphtheriae* de causar artrite, indicando seu papel em infecções sistêmicas (92). Embora os mecanismos exatos pelos quais o sistema OxyR influencia esses processos não sejam totalmente compreendidos, sua participação na resposta ao estresse oxidativo sugere que ele pode ajudar as bactérias a se adaptarem ao ambiente do hospedeiro e a evadirem as respostas imunes (9).

Dessa forma, *C. diphtheriae* é uma bactéria que entra no hospedeiro através de ferimentos abertos ou outras portas de entrada e é capaz de se espalhar pelo corpo através da corrente sanguínea atingindo tecidos e órgãos mais profundos. Como patógeno intracelular oportunista, *C. diphtheriae* pode causar infecções graves independentemente da toxina. A forma como as bactérias penetram nas células, quais os receptores responsáveis pela absorção das bactérias e como sobrevivem dentro da célula hospedeira continuam sendo mecanismos pouco claros. Estudos adicionais são necessários, visando avaliar outros fatores de virulência que justifiquem a capacidade das amostras atoxinogênicas ocasionarem processos infecciosos e o surgimento de infecções sem os sinais patognomônico.

Corynebacterium ulcerans

Corynebacterium ulcerans é uma bactéria do filo Actinomycetota, gênero *Corynebacterium* que foi isolado pela primeira vez de um caso de infecção respiratória, semelhante à difteria, em 1927 por Gilbert e Stewart (94).

Por muito tempo, as infecções humanas por este patógeno eram raras e principalmente restritas a populações em contato direto com o gado doméstico e a consumidores de leite cru e produtos lácteos não pasteurizados, uma vez que *C. ulcerans* é um agente etiológico de mastite em gado leiteiro (95,96). No entanto, durante as últimas décadas, a frequência e a gravidade das infecções humanas por *C. ulcerans* têm aumentado e, nos países da Europa Ocidental, *C. ulcerans* é reconhecido como um patógeno emergente, que está superando *C. diphtheriae* como a causa da difteria (11,37,97,98)

Em humanos, *C. ulcerans* pode causar a difteria respiratória clássica, a difteria cutânea, bem como outras infecções como sinusite, peritonite e infecções sistêmicas (35,37). A gravidade das infecções humanas está ligada à presença da toxina diftérica em cepas toxigênicas da bactéria (2,99,100).

A variedade de hospedeiros que podem servir de reservatório para a *C. ulcerans* é muito ampla e inclui bovinos, caprinos, suínos, cães, gatos, veados, esquilos, macacos e outros animais (35). O principal mecanismo de transmissão ocorre de animais infectados para humanos, com relatos crescentes de infecções em países industrializados. Estudos genéticos indicam a possibilidade de transmissão zoonótica direta, confirmada pela identificação de cepas idênticas em humanos e seus animais de estimação (35,101).

Os principais fatores de virulência de *Corynebacterium ulcerans* incluem a toxina diftérica e a fosfolipase D (Pld), ambas essenciais para a patogenicidade da bactéria. A toxina diftérica, assim como em *Corynebacterium diphtheriae*, é o fator mais estudado, sendo responsável pela inibição da síntese proteica em células eucarióticas, causando os sintomas clássicos da difteria. A presença do gene *tox* é mediada por bacteriófagos que integram esse gene ao genoma da bactéria (35,99).

A fosfolipase D é uma toxina produzida por cepas de *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* e recentemente descrita também em uma amostra de *C. diphtheriae* (102). Em contraste com a DT, o gene *pld* está presente no cromossomo de todas as cepas dessas espécies. A Pld catalisa a hidrólise de fosfatidilcolina e cliva ligações ésteres em esfingomielinas, que são componentes das membranas celulares dos mamíferos, degradando a

membrana celular, facilitando a disseminação da bactéria no organismo (35,102–105). Estudos da expressão gênica do gene *pld* mostram que sua expressão aumenta em macrófagos e neutrófilos, reduzindo a viabilidade dessas células e desempenhando também um papel importante para a evasão do sistema imunológico e progressão da doença (105–107).

Outro fator de virulência importante é a presença de uma proteína chamada Rpb (ribosome-binding protein). Essa proteína possui um domínio inativador de ribossomos, similar à toxina Shiga, encontrada em *Escherichia coli*. Embora a semelhança de sequência entre a proteína de *C. ulcerans* e a cadeia A das toxinas Shiga-like 1 e 2 de *E. coli* seja de apenas 24%, todos os aminoácidos necessários para a atividade catalítica de N-glicosidase estão presentes na proteína de *C. ulcerans*. Essa proteína potencialmente inativa os ribossomos 28S de eucariotos, inibindo a síntese proteica (35). Um estudo realizado com cepas mutantes para o gene *Rpb* em ensaios em sistemas de modelos de infecção em *C. elegans*, *G. mellonella* e em células Vero demonstrou que a Rpb contribui significativamente para a citotoxicidade das células hospedeiras e para a quebra da resistência transepitelial, facilitando a invasão bacteriana. A superexpressão da *Rpb* em *C. ulcerans* acelerou a destruição das monocamadas celulares epiteliais, enquanto a deleção do gene *rbp* resultou em uma menor citotoxicidade. Em experimentos com *G. mellonella*, a presença do gene *rbp* aumentou a mortalidade das larvas. Nas células Vero, a infecção por cepas de *C. ulcerans* com superexpressão de Rpb levou a um aumento de cerca de 40% na liberação de lactato desidrogenase (LDH), indicando morte celular (102)

Além disso outros fatores virulência já foram descritos para *C. ulcerans* como a neuraminidase NanH e a protease EndoE, que possuem potencial para modificar glicoproteínas do hospedeiro, interferindo nos mecanismos de defesa e facilitando a invasão tecidual e as pilinas Spa, que auxiliam na adesão e invasão das células hospedeiras. Esses fatores, em conjunto, contribuem para a adesão, invasão e sobrevivência de *C. ulcerans* nas células hospedeiras (35,108) .

Corynebacterium pseudotuberculosis

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, intracelular facultativa e patogênica que infecta vários hospedeiros diferentes, gerando sérias perdas econômicas na pecuária (109). A espécie *C. pseudotuberculosis* foi isolada de linfonodos de

gado pela primeira vez em 1888 por Edmond Nocard, veterinário e bacteriologista francês. Em seguida, Hugó Preisz coletou essa bactéria em abscessos de ovelha, e foi então designada Bacilo Preisz-Nocard. Apenas mais tarde foi identificada como sendo um membro do gênero *Corynebacterium* e nomeada *Corynebacterium pseudotuberculosis* (110,111).

Atualmente, reconhece-se que *C. pseudotuberculosis* é composta por dois biovares, *ovis* e *equi*. O biovar *ovis* infecta ovinos e caprinos causando a linfadenite caseosa, é nitrato negativo e resistente à estreptomicina. O biovar *equi* é responsável pela formação de abscessos, bem como linfangite ulcerativa em equinos e doença de pele edematosa em búfalos, é nitrato positivo e sensível à estreptomicina (109,112,113).

Embora infecções por *C. pseudotuberculosis* em humanos seja um evento raro, casos de linfadenite, relacionados a infecções ocupacionais, já foram reportados em trabalhadores rurais que possuem contato frequente com o rebanho ou trabalhadores de abatedouros (114). Na Austrália, por exemplo, foram descritos dez casos de infecção humana por *C. pseudotuberculosis*, confirmando sua presença em áreas de criação de ovelhas e carneiros (114). Em humanos, os sinais e sintomas da infecção por *C. pseudotuberculosis* são semelhantes ao da linfadenite caseosa e a transmissão ocorre geralmente por contato com animais doentes ou ingestão de carne ou leite contaminados (115).

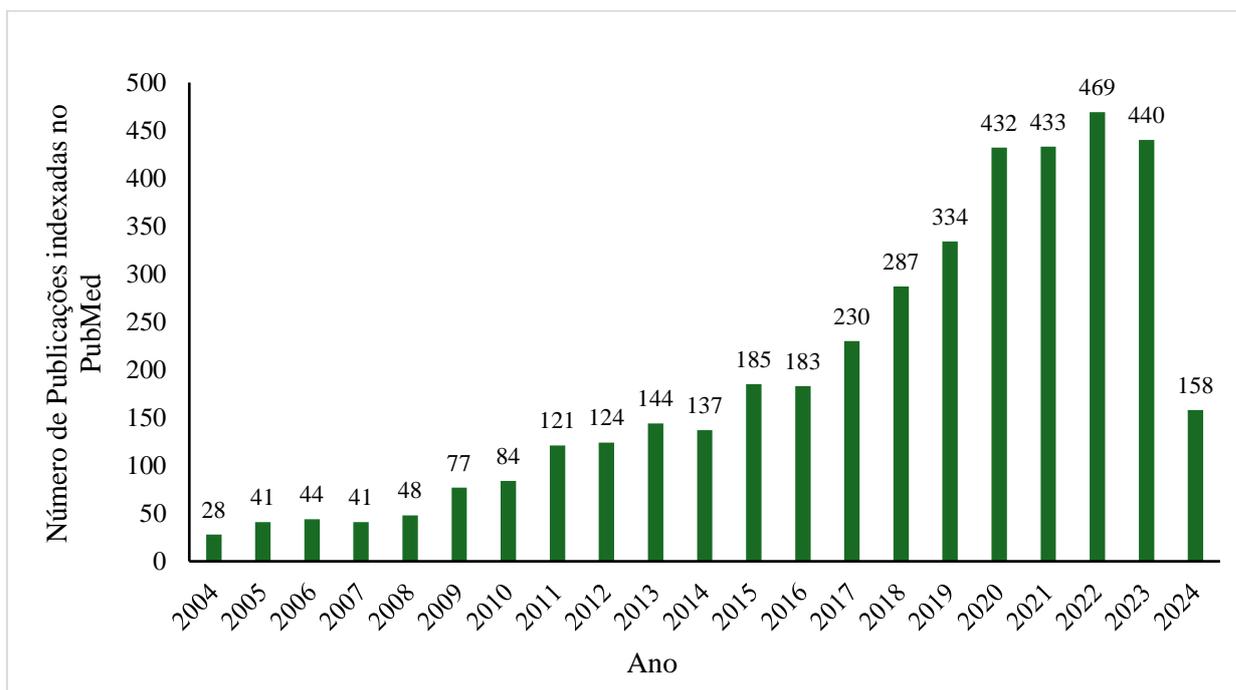
O principal fator de virulência de *C. pseudotuberculosis* é a toxina diftérica e a fosfolipase D (109). Além da TD e PlD, outro importante fator de virulência são os lipídeos tóxicos da parede celular. Esses lipídeos são semelhantes ao ácido micólico presente em *Mycobacterium tuberculosis* e foram descritos como fundamentais para a patogênese da doença. Sua presença confere resistência à digestão enzimática celular, além de possuir efeito citotóxico, permitindo a permanência do patógeno em macrófagos (109). A toxicidade do material lipídico extraído foi demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias (116,117). Experimentos com macrófagos peritoneais de camundongo também demonstraram alta susceptibilidade à ação necrosante desses lipídeos (118,119).

Fototerapia

No final do século XIX a fototerapia alcançou um grande avanço quando o dinamarquês Niels Ryberg (1860-1904) descobriu que a tuberculose cutânea poderia ser tratada com luz ultravioleta. Essa descoberta rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1903. Com a descoberta

da penicilina e o desenvolvimento da antibioticoterapia o interesse pela fototerapia se perdeu e permaneceu assim durante algumas décadas. No entanto, com o aumento crescente da resistência aos antibióticos por muitos micro-organismos, a fototerapia recupera seu prestígio e o número de estudos para o desenvolvimento de novas metodologias de fotoinativação cresce a cada dia (120,121). A Figura 4 mostra o número de publicações na área nos últimos 20 anos.

Figura 4 - Publicações indexadas no PubMed com as palavras-chave “photodynamic therapy” and “bacteria” nos últimos 20 anos.



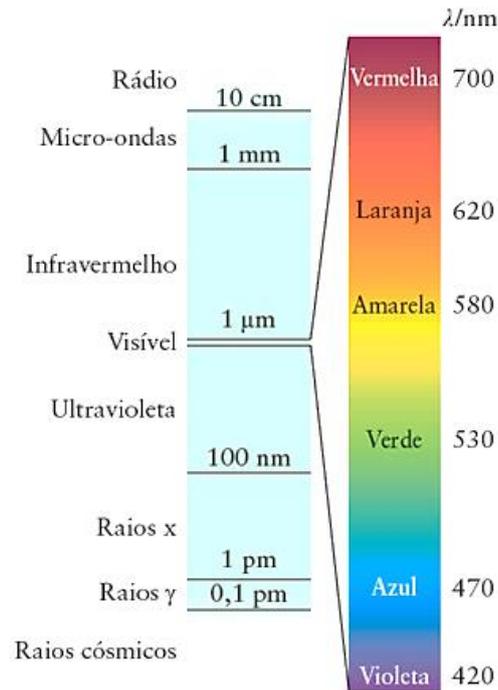
Fonte: a autora, 2024. A partir da consulta no site do PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> - acesso em 02/05/2024)

É grande o número de estudos que demonstram a inativação de micro-organismos após a iluminação com luz visível (122–128) e até agora já foi descrito para cerca de 40 espécies bacterianas diferentes além de fungos e vírus (129). Os primeiros resultados “*in vivo*” bem-sucedidos foram publicados para o tratamento de acne vulgar (130–132) e infecções de feridas (133,134) e em seguida aplicações da fototerapia no tratamento de infecções no estômago por *H. pylori* (129,135,136), além de outras aplicações como desinfecção do ar, superfícies em geral, lentes de contato e até conservação e desinfecção de alimentos (129).

A fototerapia depende de três fatores: luz, uma molécula fotossensível (fotossensibilizador), e oxigênio. Resumidamente a luz excita o fotossensibilizador que transfere energia para o oxigênio gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs) que oxidam os componentes celulares da bactéria levando-a a morte.

A luz é uma forma de radiação eletromagnética que consiste em campos elétricos e magnéticos oscilantes (variam com o tempo) que atravessam o vácuo a 3×10^8 m/s (velocidade da luz). A luz visível, as ondas de rádio, as micro-ondas e os raios x são tipos de radiação eletromagnética (137). Comprimentos de onda diferentes correspondem a regiões diferentes do espectro eletromagnético (figura 4).

Figura 5 - Regiões do espectro eletromagnético



Legenda: A região que chamamos “luz visível” ocupa um intervalo muito pequeno de comprimentos de onda. As regiões estão fora de escala.

Fonte: Atkins, 2012 (137)

Nossos olhos detectam a radiação eletromagnética de comprimento de onda entre 700 nm (luz vermelha) e 400 nm (luz violeta). Nesse intervalo a radiação é chamada de luz visível e a frequência da luz determina sua cor. A luz visível é inócua para as células humanas e por isso representa uma enorme vantagem no que diz respeito a aplicação médica.

Em geral há dois tipos de fototerapia, a que usa uma molécula fotossensibilizadora exógena, que é adicionada ao meio com a bactéria antes da exposição à luz e um segundo tipo que utiliza moléculas fotossensibilizadoras endógenas, produzidas pelo próprio metabolismo bacteriano. Neste último tipo de fototerapia as porfirinas ganham destaque como moléculas fotossensíveis endógenas.

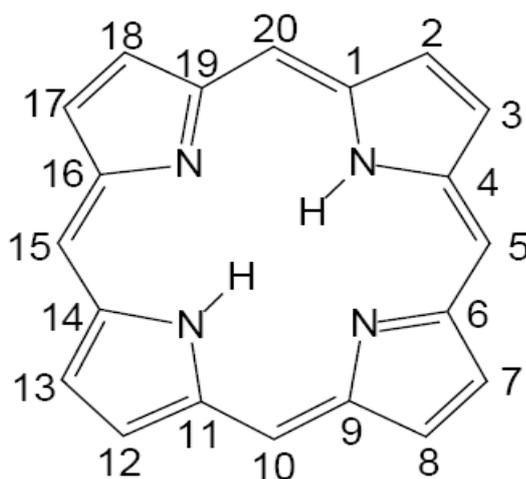
Porfirinas e fototerapia

A palavra “porfirina” é derivada da palavra grega “Porphura” que significa “roxo” proveniente de um pigmento de cor roxa, muito utilizado na Antiga Grécia. As porfirinas são um grande grupo de pigmentos fluorescentes, cristalinos, intensamente coloridos, de origem natural ou sintética. Essas moléculas compreendem uma classe de moléculas orgânicas heterocíclicas que são fundamentais para a manutenção da vida (138,139).

As porfirinas têm sua estrutura básica composta de quatro unidades de pirrol ligadas por pontes metino (=CH—) formando um sistema π deslocalizado envolvendo o anel macrocíclico central com 16 átomos. Devido à sua natureza aromática, as porfirinas geralmente participam de reações de substituição eletrofílica nas posições meso, que são as mais densas em elétrons e, como tal, são as mais reativas (138).

A denominação das porfirinas está baseada nas posições dos grupos substituintes no anel porfirínico mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Estrutura geral das porfirinas



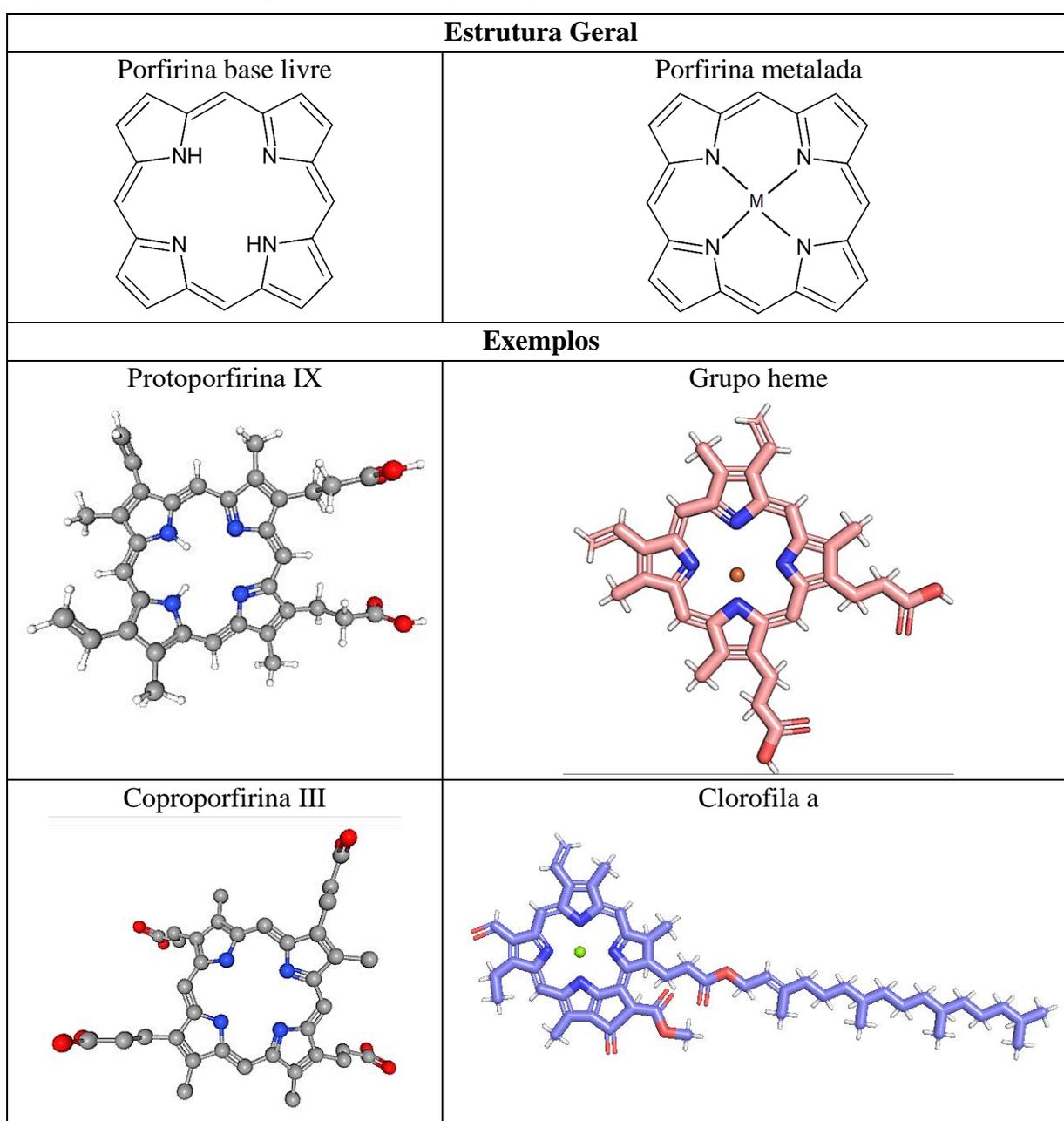
Legenda: Os carbonos nas posições 5,10,15, e 20 são denominados “carbonos em posição meso”. Nas posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 são conhecidos como “carbonos nas posições β -pirrólicas”.

Fonte: Rajora, 2017 (140)

Porfirinas com substituintes do tipo alifático no anel são denominadas alquilporfirinas; se os substituintes forem aromáticos são classificadas como arilporfirinas. Porfirinas com

quatro substituintes iguais nas posições meso do anel recebem o prefixo “tetrakis”. As porfirinas base livre não possuem metais complexados no centro do anel macrocíclico, onde existem dois átomos de hidrogênio ligados a nitrogênios amínicos. Dessa forma, atuam como ligantes dianiônicos. A cavidade do anel porfirínico possui um raio de aproximadamente 70 pm. As metaloporfirinas são formadas quando há a troca dos dois átomos de hidrogênio do anel central da porfirina base livre por um cátion metálico (Figura 7). Essas moléculas tetrapirrólicas estão presentes em vários domínios da vida compondo moléculas importantes como a clorofila, coenzima F430, cobalamina e o grupo heme (140) .

Figura 7 - Estruturas químicas e exemplos de porfirinas e seus derivados



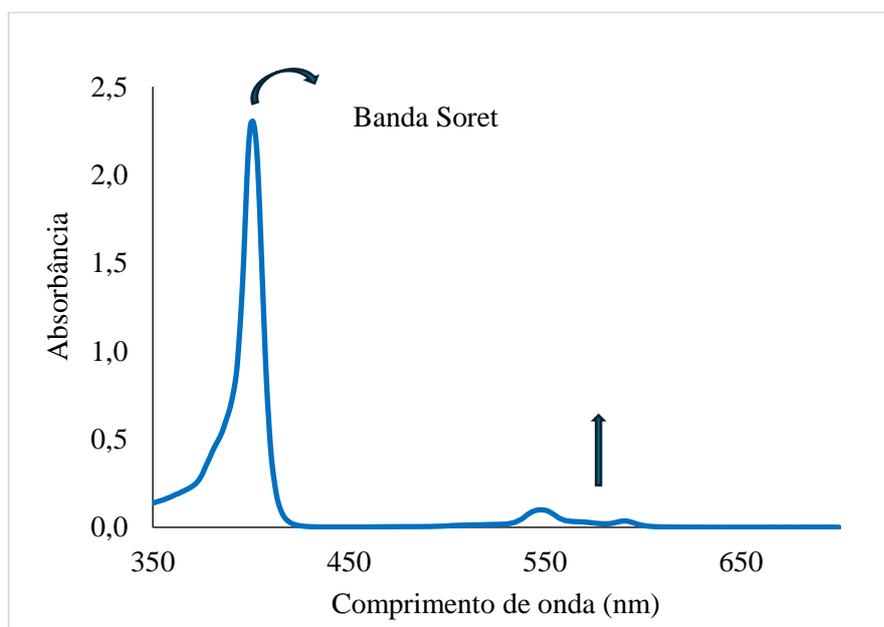
Fonte: Coordenadas obtidas no PubChem (141) e figuras geradas no PyMol (142) pela autora, 2024.

As bandas de absorção no espectro eletrônico são devidas às transições entre os níveis eletrônicos π HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e π^* LUMO (Lowest Occupied Molecular Orbital) do anel macrocíclico (143).

As porfirinas regulares, com simetria D_{4h} (metaladas ou protonadas nos anéis pirrólicos) apresentam espectros eletrônicos de emissão e absorção característicos, com propriedades únicas, determinados pelo sistema π deslocalizado do anel central. Essa classe de porfirinas apresenta em seu espectro eletrônico uma banda muito intensa ($\epsilon \sim 10^5 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), entre 380 e 420 nm, denominada banda Soret ou banda B, e na região do visível, entre 500 e 600 nm, mais 2 bandas ($\epsilon \sim 10^3 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), denominadas bandas Q (143).

As porfirinas base livre, cuja simetria é D_{2h} , possuem uma interessante diferença no aspecto do espectro, apresentando 4 bandas Q ao invés de 2. (Figura 6). Essa mudança se deve à quebra da simetria D_{4h} do anel devido à presença dos dois átomos de hidrogênio. A adição de ácido, por exemplo, ácido clorídrico, promove a protonação dos outros dois nitrogênios, e o espectro volta ao padrão visto para as porfirinas com simetria D_{4h} (143). A Figura 8 mostra o espectro de absorção da coproporfirina III.

Figura 8 - Espectro de absorção da coproporfirina III em HCl (1 mol/L)



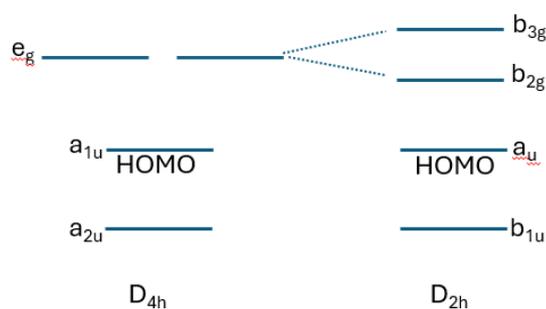
Nota: Coproporfirina III protonada, com simetria D_{4h} , com banda de absorção intensa na região de 400 nm e outras 2 bandas mais fracas entre 480 nm e 700 nm
Fonte: A autora, 2014.

Porfirinas com simetria D_{2h} possuem o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) com simetria a_u e o orbital molecular não ocupado de menor energia (LUMO) com simetria b_{2g} . Nessas porfirinas as bandas Q tem uma maior contribuição da transição $a_u \rightarrow b_{2g}$, já a banda B devido às transições dos orbitais moleculares (a_u e b_{1u}) e aos orbitais moleculares não ocupados de menor energia (b_{2g} e b_{3g}) (143,144).

No caso das porfirinas com simetria D_{4h} o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) tem simetria a_{1u} e o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) é duplamente degenerado e tem simetria e_g . Segundo o modelo dos orbitais de fronteira proposto Gouterman em seu importante trabalho “Spectra of porphyrins”, ilustrado na figura 9, as transições ($a_{1u} \rightarrow e_{gx}$), ($a_{1u} \rightarrow e_{gy}$), ($a_{2u} \rightarrow e_{gx}$) e ($a_{2u} \rightarrow e_{gy}$) participam das bandas Q e Soret (143).

As modificações nas estruturas das porfirinas, como os tipos de ligantes e suas posições provocam alterações na estrutura eletrônica acarretando modificações específicas em seus espectros e permitindo a caracterização dos diferentes tipos de porfirinas (143).

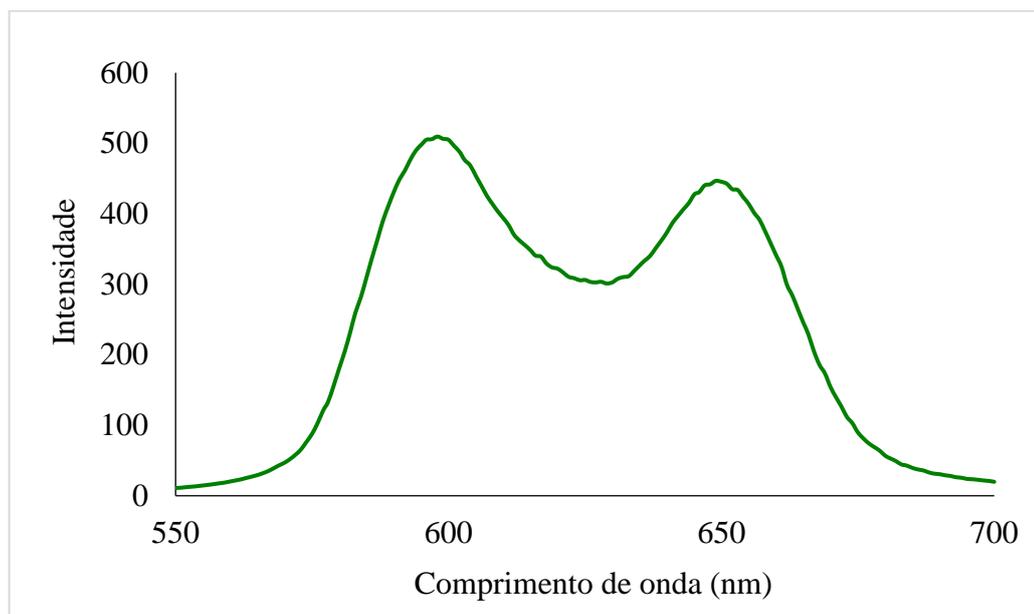
Figura 9 - Modelo dos quatro orbitais de fronteira proposto por Gouterman para porfirinas com simetria D_{4h} e D_{2h} .



Fonte: A autora, 2024. Adaptado do artigo “Spectra of porphyrins” de M. Gouterman, 1961 (143).

As porfirinas também apresentam um espectro de emissão típico, com duas bandas de emissão na região de 600-650 nm, conforme ilustrado na figura 10, e como a detecção de fluorescência tem sensibilidade de 1 a 3 ordens de magnitude maior em comparação com o UV-Vis, é o método de detecção de porfirinas utilizado com mais frequência (145,146).

Figura 10 - Espectro de emissão da Uroporfirina I em HCl 5%



Fonte: a autora, 2024

Após a absorção de luz, normalmente na faixa de 400 nm, as porfirinas excitadas tendem a voltar ao seu estado fundamental através da liberação da energia na forma de luz ou calor. As moléculas diamagnéticas, em temperatura ambiente, encontram-se preferencialmente no estado fundamental singlete (S_0). Com a absorção de energia ocorrem transições eletrônicas para níveis mais energéticos de mesma multiplicidade e para níveis vibracionais mais altos (147).

A transição para o estado singlete S_0 pode ocorrer de duas maneiras: por transição térmica $S_1 \rightarrow S_0$, em que o elétron passa de um estado para o outro trocando energia com a vizinhança (solvente, por exemplo) através de choques inelásticos, ou por transição radiativa $S_1 \rightarrow S_0$, em que ocorre a emissão de luz, a fluorescência. Essa transição pode ocorrer para um nível vibracional diferente do estado fundamental, originando várias bandas no espectro, funcionando como uma assinatura da molécula. Além disso, podem ocorrer transições proibidas, entre estados com diferentes multiplicidades. Pela regra de seleção, as transições entre estados com diferentes multiplicidades são proibidas. Contudo elas acabam ocorrendo (por exemplo uma transição singleto \rightarrow tripleto) pois pode haver uma mistura entre estados provocada pelo caráter dos orbitais moleculares formados nas ligações da molécula (138,147,148). A figura 11 ilustra os tipos e as transições possíveis.

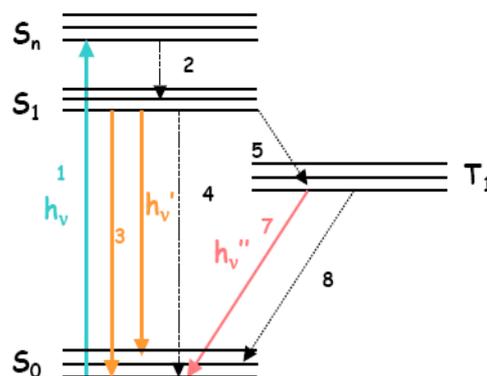
Figura 11 - Representação esquemática das possíveis transições eletrônicas após excitação por $h\nu$ (luz) e diagrama de Jablonski simplificado.

Transições radiativas ($h\nu$)

- $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ ($\sim 10^{-8}$ a 10^{-9} s)
- $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu'$ (ms a s), evento bem mais longo – fosforescência.

Transições não radiativas

- $S_n \rightarrow S_1$ ($\sim 10^{-12}$ s)
- $S_1 \rightarrow T_1$
- $S_1 \rightarrow S_0$
- $T_1 \rightarrow S_0$



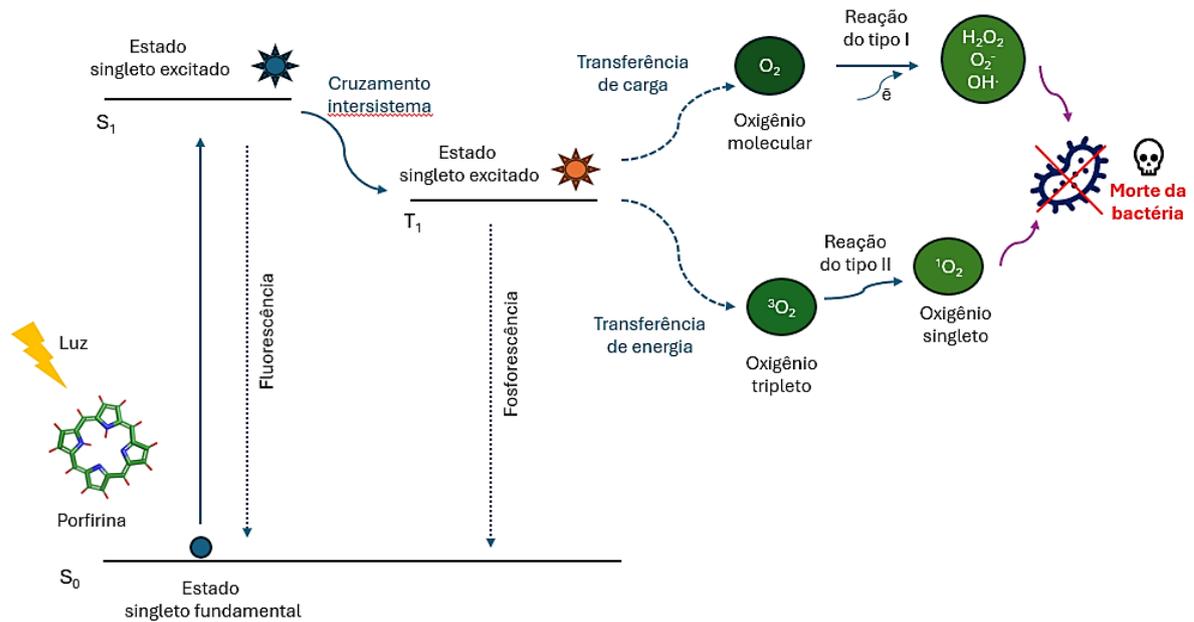
Legenda: Representação esquemática das possíveis transições eletrônicas após excitação por $h\nu$ (1); decaimento não radiativo $S_n \rightarrow S_1$ (2); emissão de fluorescência $S_1 \rightarrow S_0$ (3); decaimento não radiativo $S_1 \rightarrow S_0$ (4); e $T_1 \rightarrow S_0$ (8); cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$ (5); emissão de fosforescência $T_1 \rightarrow S_0$ (7).

Fonte: a autora, 2024

No final do século passado as porfirinas ganharam destaque com seu uso como fotossensibilizador em terapia de fotoinativação. As características químicas que permitem o uso dessas moléculas nessas terapias biomédicas estão diretamente relacionadas com sua estrutura macrocíclica aromática, seus elétrons π deslocalizados e as transições eletrônicas que ocorrem após a absorção de luz, descritas anteriormente.

Como mostrado na Figura 12, ao absorver energia, um elétron de valência é promovido do seu estado fundamental (S_0) para um estado singlete excitado (S_1) e após há o retorno do elétron ao estado fundamental, por meio de relaxamento vibracional não radiativo, emissão de fluorescência ou por transição eletrônica para um estado tripleto (T_1). Do estado tripleto elas podem retornar ao estado fundamental através da emissão de um fóton, ocasionando o fenômeno da fosforescência ou na presença de oxigênio a porfirina pode transferir o excesso de energia para uma molécula de oxigênio, gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs podem ser geradas através de dois tipos de reação. A primeira, chamada de reação do tipo 1, em que o oxigênio molecular (O_2) recebe energia formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxilo (OH^\cdot). A segunda, chamada de reação do tipo 2, a energia do decaimento do estado tripleto da porfirina é transferida para um oxigênio molecular no estado tripleto, presente no meio, levando a geração um oxigênio singlete, que é um estado excitado do oxigênio muito reativo que irá oxidar rapidamente as espécies químicas que estiverem ao redor tendo um efeito citotóxico (140,149,150).

Figura 12 - Diagrama de Jablonski e o mecanismo de funcionamento da fototerapia.



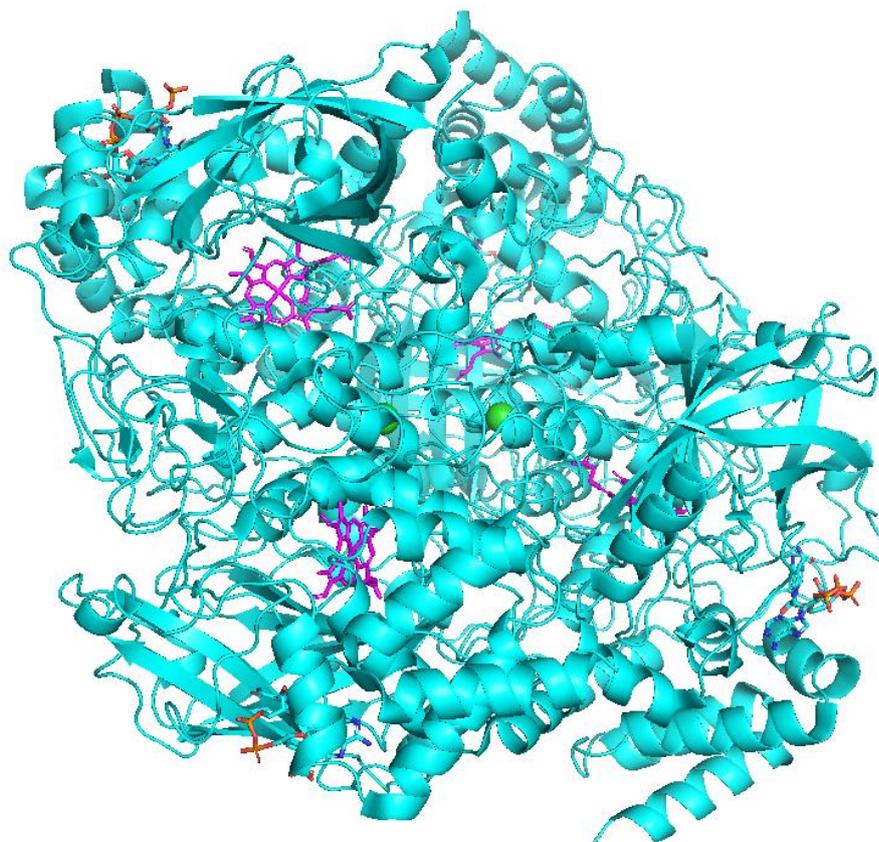
Fonte: a autora, 2024 (149)

O oxigênio singlete é sem dúvida o principal causador dos efeitos citotóxicos da fototerapia, é muito reativo e tem uma vida útil de cerca de 4 μ s. Por isso é muito importante que na terapia fotodinâmica o oxigênio singlete seja gerado perto das células alvo para causar os efeitos citotóxicos esperados (140,151).

Porfirinas e o metabolismo do grupo heme

As porfirinas são metabólitos intermediários na biossíntese de moléculas vitais: as hemeproteínas. Essas moléculas possuem um grupamento químico denominado grupo heme, que de forma geral consiste em um anel porfirínico com um átomo de ferro (ou outro metal) coordenado no centro do anel (Figura 13). O grupo heme é essencial para a função dessas proteínas que estão envolvidas na geração de energia pela cadeia de transporte de elétrons (citocromo P450), na desintoxicação das respostas imunológicas (catalase), no transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina) e outros processos (152).

Figura 13 - Estrutura da catalase de *Corynebacterium glutamicum*.



Legenda: O grupo heme, com seu anel porfirínico, está representado na cor magenta.

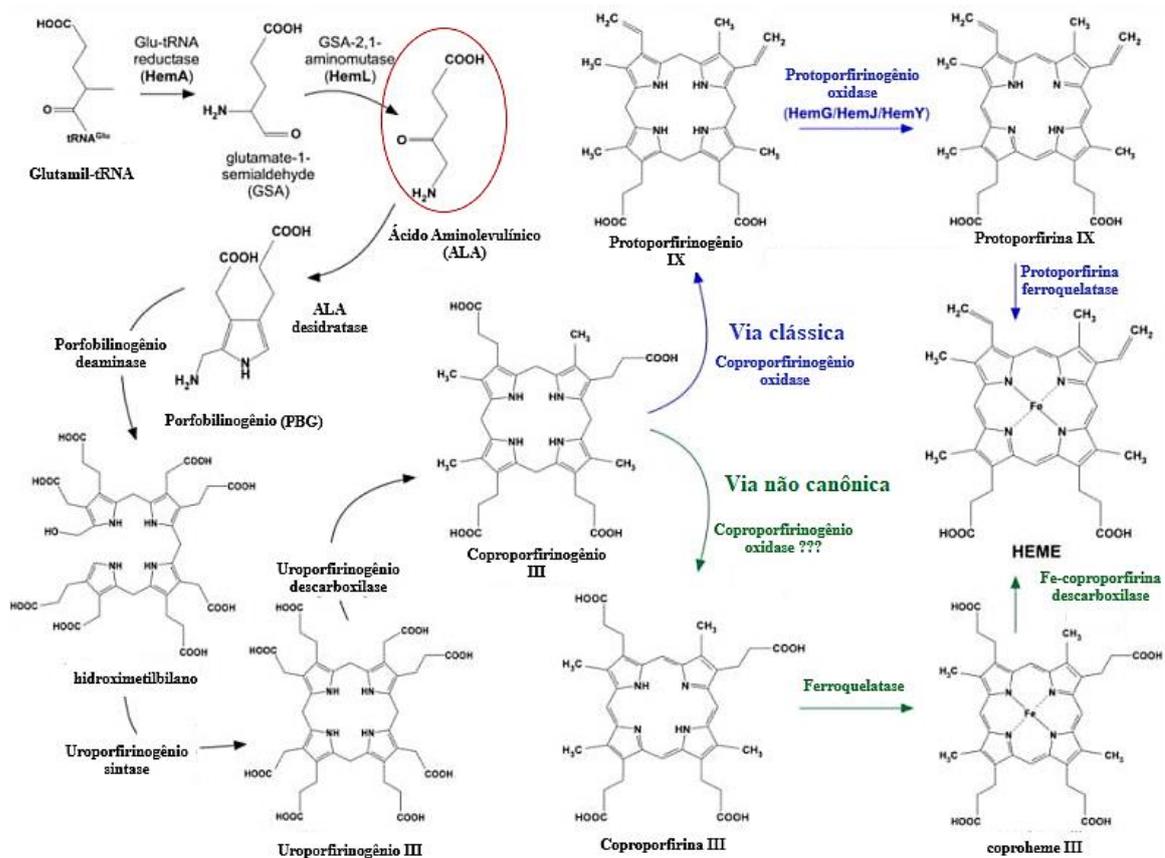
Fonte: Coordenadas obtidas do PDB sob o ID 4B7G e figura gerada no PyMOL(142,153).

A síntese do grupo heme em células eucarióticas e em bactérias têm um precursor inicial comum: o ácido 5-aminolevulínico (ALA). A produção de porfirinas é rigidamente regulada a partir do ALA e um excesso de ALA adicionado exogenamente leva ao acúmulo e à secreção de porfirinas, permitindo seu uso como fotossensibilizador endógeno (152,154,155). Durante muito tempo foi aceito que a via metabólica de síntese do grupo heme era muito bem conservada entre eucariotos e procariotos que usavam os mesmos intermediários metabólicos até a etapa final da inserção do ferro na protoporfirina IX e formação do protoheme. Entretanto, nos últimos anos, estudos demonstraram que nos filos Bacillota e Actinomycetota a etapa final desta via metabólica ocorre de forma diferente (152).

A biossíntese do grupo heme (Figura 14) começa com a síntese do ALA a partir da glutamyl-tRNA e partir daí tem-se uma sequência de 4 reações, bem conservadas entre as espécies bacterianas, até a síntese do coproporfirinogênio III. A síntese do grupo heme pode continuar através de duas vias distintas, a via clássica e a via não canônica. Na primeira via o

coproporfirinogênio III é convertido a protoporfirinogênio IX, pela ação da coproporfirinogênio oxidase e posteriormente a protoporfirina IX onde então o ferro é adicionado para a formação do grupo heme. Na via não canônica o coproporfirinogênio III é convertido a coproporfirina III também por uma enzima coproporfirina oxidase e então o ferro é adicionado, formando a copro-heme e posterior conversão ao grupo heme pela ferro-coproporfirina III descarboxilase (152,154,156).

Figura 14 - Via metabólica de síntese do grupo heme.



Legenda: A via de síntese do heme da maioria das bactérias começa com glutamil-tRNA_{Gl} para formar o precursor universal ALA. O coproporfirinogênio III é formado por meio de uma série de etapas enzimáticas conservadas. A via clássica (azul) forma o heme por meio do intermediário protoporfirinogênio IX; a maioria dos organismos, incluindo bactérias Gram-negativas e eucariotos, usa essa via. A via não canônica (verde), realizada pela maioria das bactérias Gram-positivas, produz heme por meio do intermediário coproporfirina III. Para cada etapa, é mostrado o nome da enzima

Fonte: Figura adaptada pela autora, 2024 (154) .

Presume-se que para *C. diphtheriae* a via de síntese do grupo heme seja a não canônica, com a inserção do ferro na coproporfirina III e formação do copro-heme III. No entanto, esta via metabólica das corinebactérias ainda não foi elucidada (152,157).

Os primeiros trabalhos que descrevem a produção de porfirinas por microrganismos datam da década de 20 feitos a partir da observação da produção de um pigmento de cor

vermelha por micobactérias (158) e em seguida um relato deste mesmo pigmento foi registrado em filtrados de culturas de *C. diphtheriae* (159). Estudos subsequentes descrevem a influência da concentração de ferro no meio de cultura na produção destes pigmentos vermelhos por *C. diphtheriae* além da caracterização química da natureza desses pigmentos como sendo porfirinas (58,160). A produção de porfirina por *C. diphtheriae* também foi relacionada à fluorescência visualizada em meio king B, sendo este um dos métodos de detecção da presença da bactéria (161).

Estudos sobre a utilização de sideróforos por *C. diphtheriae* como fator de virulência indicaram uma forte relação entre a concentração de sideróforos e porfirinas produzidas pela bactéria, sendo um forte indício do seu papel como cofator de enzimas ferro-dependentes (162). Além disso, a produção de porfirinas também já foi associada ao aumento da produção de biofilme e modulação de resposta inflamatórias no hospedeiro em amostras de patógenos humanos de origens diversas (163–165).

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1.1. Justificativa e objetivo geral

Estudos investigando os fatores de virulência que justificam a capacidade das amostras atoxinogênicas de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* ocasionarem processos infecciosos, bem como de amostras toxigênicas causarem a difteria sem os sinais patognomônico, são ainda necessários. Além disso, são também importantes estudos objetivando elucidar o metabolismo bacteriano e suas relações com o hospedeiro, permitindo o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento dessas infecções.

Sabe-se muito pouco sobre a produção de porfirinas por corinebactérias e o metabolismo do grupo heme desses patógenos. A identificação de fatores de virulência e a elucidação da forma como colaboram para a ocorrência das corinebacterioses contribuirá para a elaboração de estratégias de monitoramento, prevenção e controle das infecções tanto por cepas produtoras, quanto por cepas não produtoras de TD.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo geral estudar o metabolismo do grupo heme e a produção de porfirinas por cepas de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* e investigar a possível utilização dessas moléculas como fotossensibilizador em terapias de fotoinativação.

1.2. Objetivos específicos

Para atender o objetivo geral deste trabalho, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

1. Caracterizar química das porfirinas produzidas por diferentes amostras de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*.
2. Quantificar das porfirinas produzidas por diferentes amostras de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*.
3. Avaliar a influência da suplementação de ácido aminulevulínico (ALA) na produção de porfirinas por *C. diphtheriae*.

4. Avaliar a influência da concentração do ferro na produção de porfirinas por *C. diphtheriae*.
5. Avaliar a influência da concentração de peróxido de hidrogênio na produção de porfirinas por *C. diphtheriae*.
6. Pesquisar *in silico* os genes envolvidos na biossíntese da coproporfirina III por *C. diphtheriae*.
7. Estudar a utilização das porfirinas utilizadas por *C. diphtheriae* como fotossensibilizador em terapias de fotoinativação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem, identificação e estocagem das cepas bacterianas

Para este estudo, foram selecionadas 9 cepas de *C. diphtheriae*, uma cepa de *C. ulcerans* e uma de *C. pseudotuberculosis* (Tabela 1), as quais encontram-se estocadas na Bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP), Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Todas as cepas bacterianas foram mantidas como suspensões de estoque congeladas a -20 °C e -80 °C, em meio TSB (*Trypticase Soy Broth* - Difco Laboratories, EUA) suplementado com 20% (v/v) de glicerol (Merck S.A., Brasil).

Tabela 1 - Origem e principais características das cepas de *C. diphtheriae* selecionadas para este estudo

Cepa	Espécie	Origem	Presença do gene <i>tox</i>
ATCC 27010	<i>C.diphtheriae</i>	Cepa tipo (Difteria)	-
ATCC 27012	<i>C.diphtheriae</i>	ATCC 27010 (<i>tox</i> ⁺)	+
HC01*	<i>C.diphtheriae</i>	Endocardite (sangue)	-
HC02*	<i>C.diphtheriae</i>	Endocardite (sangue)	-
HC03*	<i>C.diphtheriae</i>	Endocardite (sangue)	-
HC04	<i>C.diphtheriae</i>	Endocardite (sangue)	-
TR241	<i>C.diphtheriae</i>	Difteria clássica (oronasofaringe)	+
TR402	<i>C.diphtheriae</i>	Pneumonia (pulmão)	-
2962	<i>C. diphtheriae</i>	Difteria cutânea	-
1002	<i>C. pseudotuberculosis</i>	Abcesso linfonodal	-
809	<i>C. ulcerans</i>	Pneumonia	-

Legenda: ATCC, American Type Culture Collection (EUA); CDC, Centers for Disease Control and Prevention (EUA); *tox*⁺, gene codificador da TD presente

2.2. Caracterização química e quantificação das porfirinas

2.2.1. Condições de cultivo e preparo das suspensões bacterianas

As amostras foram cultivadas em tubos de vidro contendo 3 mL de meio TSB por 48 h a 37 °C. A partir da medida da densidade óptica a 590 nm (DO₅₉₀) foi preparada uma suspensão bacteriana em 3 mL de TSB com a DO₅₉₀ de 0,3 que foi totalmente transferida para 50 mL de meio TSB. Os frascos foram incubados por 48 horas a 37 °C em ambiente escuro. Após a incubação, a DO₅₉₀ de cada cultivo foi aferida e a quantidade de células foi novamente determinada a fim de comparar o crescimento das cepas.

Inicialmente, a fim de padronizarmos as condições de cultivo, foi realizado um teste do efeito da adição de ácido aminolevulínico (ALA) ao cultivo e por isso para duas amostras (ATCC 27010 e HC04) foi feito o cultivo em meio TSB sem suplementação de ALA e o cultivo com suplementação de ALA (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 2 mmol/L (126). Os testes foram feitos em triplicata para cada condição avaliada e os resultados do perfil e quantidade de porfirinas foram comparados.

Em função dos resultados deste teste, que serão apresentados posteriormente, todos os cultivos para a análise qualitativa e quantitativa das porfirinas produzidas por *C. diphtheriae* foram feitas com a suplementação de ALA na concentração descrita acima.

Os cultivos obtidos nesta etapa foram submetidos ao procedimento de extração das porfirinas.

2.2.2. Extração das porfirinas

Para extração das porfirinas, utilizou-se o protocolo descrito previamente (166) com as modificações descritas a seguir. Após o cultivo bacteriano, foi adicionado 20 mL de solução de ácido acético (Sigma-Aldrich, EUA) e acetato de etila (Sigma-Aldrich, EUA) (1:4), pH 3,6. A mistura foi incubada sob agitação a 4 °C por 24 horas no escuro. Em seguida a mistura foi centrifugada e a fase aquosa foi descartada. Adicionou-se à fase orgânica 20 mL de solução de

acetato de sódio, 1%, pH 3,6 e após breve e vigorosa agitação a mistura foi centrifugada e a fase aquosa descartada. Adicionou-se 5 mL de solução de ácido clorídrico 5% e após vigorosa agitação a fase orgânica foi descartada.

Os extratos obtidos foram submetidos à espectroscopia de absorção, espectroscopia de emissão e à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada aos detectores de fluorescência, absorção UV e espectrometria de massas.

2.2.3. Preparo das soluções padrões

Os padrões de porfirina usados nas análises químicas incluíram: uroporfirina I (UPI) (Sigma-Aldrich, EUA), coproporfirina III (CPIII) (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e protoporfirina IX (PPIX) (Sigma-Aldrich, EUA). Todos os padrões foram dissolvidos em HCl a 5%.

2.2.4. Espectroscopia de absorção

Os espectros de absorção nas regiões do ultravioleta e visível, entre 200 nm e 700 nm, foram obtidos num espectrofotômetro modelo Biomate 3S, (Thermo Scientific, EUA), com largura de banda espectral de 5 nm e utilizando-se cubetas de quartzo com caminho óptico igual a 1,00 cm.

Os espectros de absorção obtidos para cada amostra foram comparados com os dos padrões de porfirinas utilizados.

2.2.5. Espectroscopia de emissão

Os espectros de emissão foram obtidos num espectrofluorímetro Agilent Cary Eclipse (Agilent Technologies, EUA), equipado com lâmpada de xenônio de 80 Hz. A resolução do

instrumento é de 1,5 nm, operando em 399 nm para a excitação da amostra e 591 nm para a emissão. A largura do feixe de emissão foi ajustada a 20 nm e a do feixe de excitação para 1,5 nm (166). Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico igual a 1,00 cm.

Os espectros de emissão obtidos para cada amostra foram comparados com os dos padrões de porfirinas utilizados.

2.2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE-FLD)

Os extratos foram submetidos a CLAE-FLD utilizando-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 Infinity Series (Agilent Technologies, USA). O equipamento é formado pelos seguintes módulos: Degaseificador (1260 HIP degasser G4225A), bomba de quatro canais (1260 quat. pump G1311B), amostrador automático (1260 ALS G1329B), compartimento de coluna (1260 TCC G1316A), detector de ultravioleta multi-comprimento (1260 MWD VL G1365B) e detector de fluorescência (1260 FLD G1321B). A análise foi feita segundo a metodologia descrita por Taylor, 2000 com as devidas adaptações descritas abaixo (166).

Foi utilizada uma coluna ACE C-18 5 Aq com 250 x 4,6 mm de dimensão, partícula de 5 µm (lote V14-8119/ACE-126-2546). Os comprimentos de excitação e emissão utilizados no detector de fluorescência foram 395/630 nm, respectivamente, e o fator de ganho do PMT (photomultiplier tube) foi ajustado para 13. Já no detector de ultravioleta multicanais foram acompanhados os seguintes comprimentos de onda: 200, 254, 240, 300, 320, 360, 400 e 420 nm, sendo o comprimento de 400 nm usado como principal. A coluna se manteve aquecida em 30°C e o gradiente foi feito com metanol (A) e acetato de amônio 1 mol/L (B), iniciando com 20:80 (A:B); em 3 minutos a proporção se alterou para 50:50 e, em 7 minutos para 100:0, mantendo-se isocrático até 10 minutos; entre 10 e 17 minutos voltou-se à condição inicial de 20:80, se mantendo até 20 minutos. Foi dado um tempo de 3 minutos entre as corridas e o fluxo empregado foi de 0,7 mL/min respeitando o fluxo máximo da célula de 1 mL/min.

A identidade das porfirinas presentes nas amostras foi obtida comparando-se os tempos de retenção dos sinais obtidos nos cromatogramas dos extratos de porfirina e dos padrões usados.

2.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de absorção ultravioleta (CLAE-UV)

Os extratos foram submetidos à CLAE-UV utilizando-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 Infinity Series do fabricante Agilent Technologies. O equipamento é formado pelos seguintes módulos: Degaseificador (1260 HIP degasser G4225A), bomba de dois canais (1260 bin pump G1312B), amostrador automático (1260 ALS G1329B), compartimento de coluna (1260 TCC G1316A), detector de ultravioleta por arranjo de diodos (1260 DAD G4212B) e detector de espalhamento de luz (1260 ELSD G4260 B).

Foi utilizada a coluna Hypersil Gold C18 com 250 mm x 4,6 mm de dimensão e partícula de 5 µm e foram acompanhados os comprimentos de onda de 200, 254, 280, 320, 340, 400, 420 e 480 nm, sendo o comprimento de 400 nm utilizado como principal onde foram registrados os espectros UV entre 190 nm e 640 nm dos sinais obtidos. As condições de corrida foram as mesmas utilizadas para a análise de CLAE-FLD descrita no item 2.2.6.

A identidade das porfirinas presentes nas amostras foi obtida comparando-se os tempos de retenção dos sinais obtidos nos cromatogramas e os espectros de absorção dos extratos de porfirina e dos padrões usados.

2.2.8. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detector de massas (CLAE-EM)

Os extratos foram submetidos à CLAE-EM utilizando-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Altus (Perkin Elmer, EUA). O equipamento é composto do módulo do amostrador automático A-30, bomba A-30 e detector Altus quadrupolo.

Foi utilizada uma coluna C18 Altus UPLC BEH (lote 0255350981/N2972002) com partícula de 1,7 µm e dimensões de 2,1 mm x 150 mm. A temperatura da coluna durante a análise foi de 30 °C e a fase móvel era composta de Acetonitrila (A) e solução de ácido fórmico a 1% em água MilliQ (B). Inicialmente a proporção era de 95 % de B e 5 % de A, com fluxo constante de 0,3 mL/min; em 30 minutos a proporção se inverte para 0 % de B e 100 % de A,

voltando a condição inicial em 32 min. Entre as amostras houve um tempo de 3 minutos para o acondicionamento da coluna. As condições do detector de massas por eletrospray foram detecção dos íons $[M+H]^+ = 563$ (Protoporfirina IX), $[M+H]^+ = 655$ (coproporfirina III) e $[M+H]^+ = 830$ (uroporfirina I) e MS scan no modo positivo, voltagem do capilar 3,5 kV, temperatura da fonte de 150 °C e de dessolvatação em 450 °C. O gás de arraste foi o nitrogênio com fluxo de 800 L/hora e do cone 400 L/hora.

A identidade das porfirinas presentes nas amostras foi obtida comparando-se os tempos de retenção dos sinais obtidos no cromatograma e as proporções de massa (m/z) obtidas nos espectros de massa dos extratos de porfirina e dos padrões usados.

2.2.9. Análise quantitativa da produção da coproporfirina III entre as amostras e diferentes condições de cultivos.

Em função dos resultados obtidos na caracterização química das porfirinas (que será apresentado e discutido posteriormente) decidiu-se por realizar a quantificação da coproporfirina III entre as amostras utilizadas neste estudo e as diferentes condições de cultivos pesquisadas. A quantificação foi realizada utilizando o protocolo descrito a seguir.

A partir de uma solução de estoque de 1000 µg/mL de coproporfirina III em HCl a 5%, foram preparadas duas curvas de calibração diferentes: curva A, de 2 a 10 µg/mL e curva B, de 10 a 50 µg/mL. Ambas as curvas foram realizadas em triplicata. As áreas dos picos cromatográficos (com base nos cromatogramas de CLAE-UV) foram obtidas e integradas com o software ChemStation (versão 10.1, Agilent Technologies). A tabela de área dos picos foi exportada para o Microsoft Excel para quantificação. A análise estatística foi realizada pelo software Action Stat e usando o estudo de linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários) e o Limite de Detecção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ) foram calculados.

2.3. Influência da concentração de ferro na produção de porfirinas

Para avaliar a influência do ferro sobre a produção de porfirinas, as cepas ATCC 27010 e HC04 foram cultivadas em tubos de vidro contendo 3 mL de TSB por 48 horas a 37 °C. Para cada amostra foram preparadas duas suspensões bacteriana em 3 mL de TSB com a DO_{590} de 0,3. Uma delas foi semeada em 50 mL TSB e outra em 50 mL de TSB acrescido de $FeSO_4$ a 0,2 $\mu g/mL$ (167). As suspensões foram mantidas por 48 horas a 37 °C. Após este período as porfirinas foram extraídas e submetidas à análise por espectroscopia de absorção UV, espectroscopia de emissão e CLAE acoplada aos detectores de absorção UV, fluorescência e espectrometria de massa seguindo as mesmas metodologias já descritas nos itens anteriores.

2.4. Influência do peróxido de hidrogênio no metabolismo de porfirinas

2.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de peróxido de hidrogênio

Para o estudo envolvendo os efeitos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no metabolismo das porfirinas foi necessário determinar primeiramente a Concentração Inibitória Mínima (CIM), isto é, a menor concentração do agente capaz de inibir o crescimento populacional da bactéria, para cada amostra utilizada. Utilizou-se o método das diluições sucessivas, partindo de uma solução estoque a 10 mmol/L de H_2O_2 (Sigma-Aldrich, EUA).

As cepas ATCC 27010 e HC04 foram cultivadas em tubos de vidro contendo 3 mL de meio TSB por 48 horas a 37 °C. A partir da medida da DO_{590} foi preparada uma suspensão bacteriana em 3 mL de TSB com a DO_{590} de 0,3, que foi semeada em TSB contendo H_2O_2 nas concentrações de 10,00 mmol/L, 5,00 mmol/L, 2,50 mmol/L, 1,25 mmol/L, 0,63 mmol/L, 0,31 mmol/L e 0,16 mmol/L e incubadas por 48 horas na temperatura de 37 °C. Foi considerada a CIM a menor concentração sem crescimento bacteriano visível (168).

2.4.2. Efeito do peróxido de hidrogênio na produção de porfirinas

Para avaliar a influência do H₂O₂ sobre a produção de porfirinas, as cepas ATCC 27010 e HC04 foram cultivadas em tubos de vidro contendo 3 mL de TSB por 48 h a 37 °C. Uma suspensão bacteriana com DO₅₉₀ de 0,3 foi preparada em 3 mL de TSB e então semeada em 50 mL TSB acrescido de H₂O₂ na concentração de 1/8 da CIM de cada amostra e incubada por 48 horas a 37 °C. Após o este período as porfirinas foram extraídas e submetidas à análise por espectroscopia de absorção UV, espectroscopia de emissão e CLAE acoplada aos detectores de absorção UV, fluorescência e espectrometria de massa seguindo as mesmas metodologias já descritas nos itens anteriores.

2.5. Pesquisa *in silico* pelos genes envolvidos na síntese do grupo heme

A fim de identificar por qual das duas vias (clássica ou não canônica) ocorre a síntese do grupo heme em *C. diphtheriae*, foi realizada uma busca *in silico* pela via metabólica do grupo heme, para a amostra tipo ATCC 27010, no banco de dados da Enciclopédia Kyoto de Genes e Genoma (KEGG), no site <kegg.jp>, disponível também no portal do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Foram compilados os dados referentes às enzimas coproporfirinogênio oxidase (*hemG*), coproporfirina ferroquelatase (*hemH*) e coproheme descarboxilase (*hemQ*), envolvidas nas etapas finais da síntese do grupo heme.

2.6. Estudo da utilização das porfirinas endógenas produzidas por *C. diphtheriae* como fotossensibilizador em terapias de fotoinativação

Para este estudo foram utilizadas as amostras ATCC 27010, HC04 e 2962. Foi testada a utilização das porfirinas endógenas em culturas de células planctônicas e biofilme, com e sem a adição de ALA, quando colocadas sob luz azul (402 nm) em diferentes tempos de exposição.

2.7. Fotoativação de células planctônicas

A fotoativação de culturas planctônicas foi realizada utilizando o protocolo descrito previamente (126) com as alterações descritas a seguir. Para cada amostra estudada foi preparado um inóculo em TSB com DO_{590} de 0,3 e deste inóculo foram semeados 500 μ L em uma placa de 24 poços e incubados por 48 horas a 37°C. Para cada amostra foi preparada uma placa sem a suplementação de ALA e outra com a suplementação de ALA na concentração de 2 mmol/mL. Em seguida os poços foram irradiados de acordo com o procedimento descrito adiante.

O número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) foi determinado após o plaqueamento de uma alíquota de diluições sucessivas em placas de Trypticase Soy Agar (TSA; Difco Laboratories) e o resultado comparado com placas controles que não foram submetidas à exposição à luz.

2.8. Formação e fotoativação do biofilme em Thermanox®

A fotoativação das culturas de biofilme foi realizada de acordo com o estudo anterior, com as alterações descritas abaixo (126,169).

Para cada amostra estudada foi preparado um inóculo em TSB com DO_{590} de 0,3 e deste inóculo foram semeados 500 μ L em poços de uma placa de 24 poços contendo uma lamínula de Thermanox® (ThermoFischer Scientific, USA) e incubados por 48 horas a 37 °C. Para cada amostra foi preparada uma placa sem a suplementação de ALA e outra com a suplementação de ALA na concentração de 2 mmol/mL. Em seguida os poços foram irradiados de acordo com o procedimento descrito adiante.

Após a exposição à luz, cada lamínula de Thermanox® foi transferida para um tubo plástico estéril de 15 mL contendo 5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) com pH 7,2. Os tubos foram imersos em um banho ultrassônico (E15-H; Elmasonic, Singen, Alemanha). A sonicação foi realizada a 37 kHz com uma potência de saída de 240 W, a 37 °C, por 5 minutos. As lamínulas foram, então, descartadas e o número de UFC/mL foi determinado

após o plaqueamento de uma alíquota de diluições sucessivas em placas de TSA. O resultado foi comparado com os poços controles que não foram submetidos à exposição à luz.

2.9. Fonte de luz e protocolo de exposição à luz

As placas de 24 poços foram iluminadas de cima a uma distância de 10 cm durante os tempos de 30 minutos (30'), 60 minutos (60') e 90 minutos (90'). A matriz de luz utilizada consistia em duas lâmpadas de LED 402 nm/7W com uma taxa de fluência de 155 mW/cm².

2.10. Análise estatística

Todos os experimentos de fotoinativação foram realizados em triplicada. A análise de variância (ANOVA) e o teste t de Student foram utilizados para determinar significância estatística e para isso foi utilizado o software Graphpad Prism 9.0 e valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização química das porfirinas produzidas por *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*

Os espectros de emissão e absorção obtidos dos extratos de porfirinas de todas as amostras estudadas foram característicos de porfirinas. Os espectros de emissão apresentaram dois picos de emissão, um na região de 600 nm e outro na região de 650 nm, já os espectros de absorção apresentaram uma banda de absorção intensa na região de 400 nm (banda Soret) e outras bandas mais fracas entre 500 e 600 nm (bandas Q). A Tabela 2 mostra os picos de emissão e absorção (banda Soret) obtidos nos padrões e nos extratos de porfirinas das amostras utilizadas neste estudo. As Figuras 15 e 16 ilustram os espectros de emissão e absorção, respectivamente, obtidos nos padrões e no extrato de porfirinas da amostra HC04.

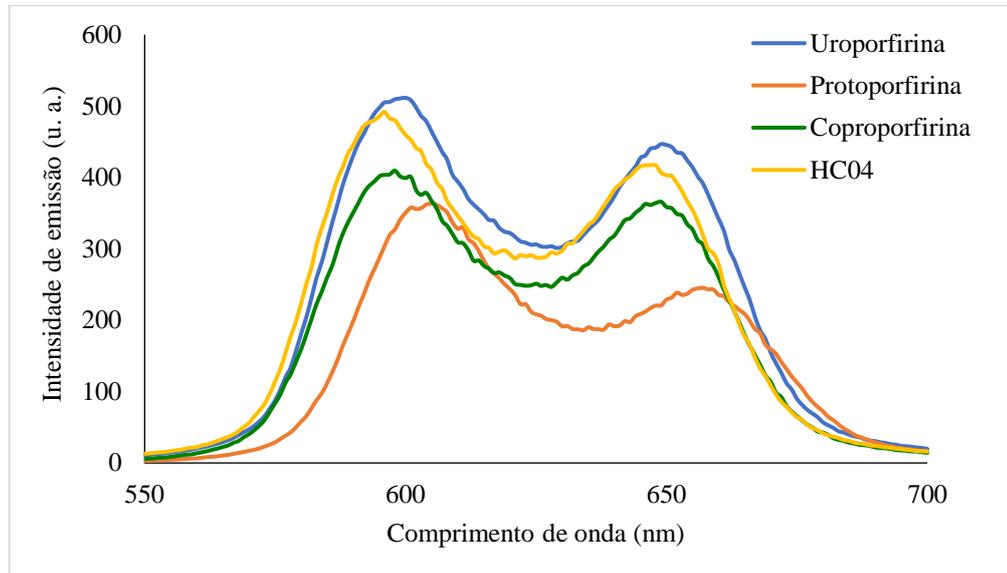
Tabela 2 - Picos de emissão e absorção obtidos nas análises de espectroscopia dos padrões de porfirinas e dos extratos de porfirinas das amostras cultivadas em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).

Padrão/Amostras	Picos de emissão (nm)		Picos de absorção (nm) (banda Soret)
Padrão de coproporfirina III	596	649	401
Padrão de protoporfirina IX	605	652	406
Padrão de uroporfirina I	600	649	407
ATCC 27010	595	650	403
ATCC 27012	595	650	403
HC01	594	651	402
HC02	594	651	402
HC02	594	651	403
HC03	594	651	402
HC04	596	648	402
HC06	595	650	403
TR241	594	648	402
TR402	595	650	402
2962	594	651	401
809	595	648	402
1002	594	650	403

Nota: Os padrões e o extrato de porfirinas estão em HCl 5%. Resolução do espectrofluorímetro utilizado é de 1.5 nm e a do espectrômetro de absorção é de 5 nm.

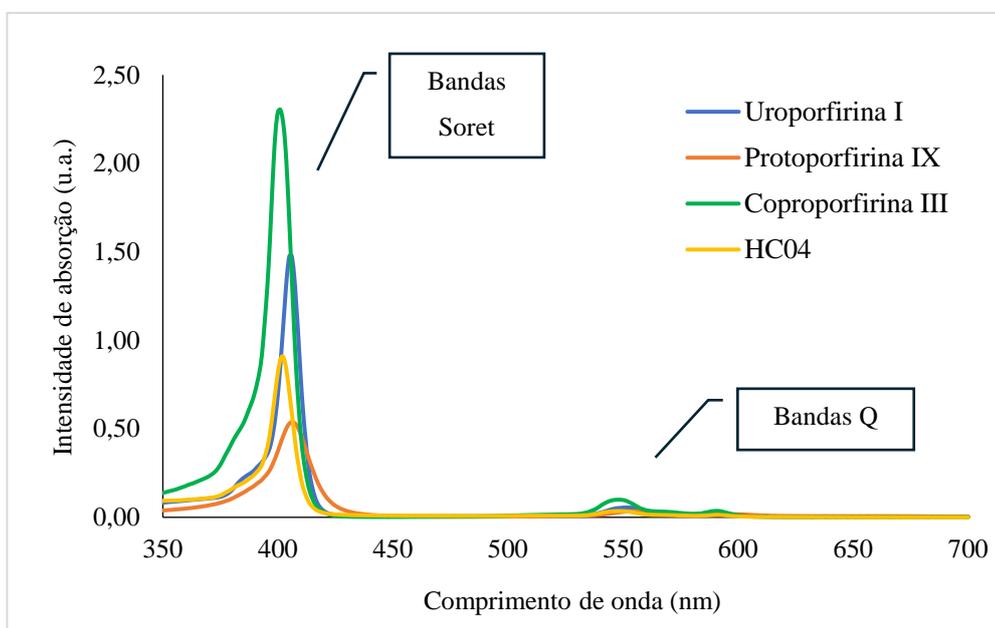
Fonte: A autora, 2024.

Figura 15 - Espectros de emissão dos padrões de coproporfirina III, protoporfirina IX, uroporfirina I e do extrato obtido da amostra HC04 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).



Fonte: A autora, 2024.

Figura 16 - Espectros de absorção dos padrões de coproporfirina III, protoporfirina IX, uroporfirina I e do extrato de porfirinas obtido da amostra HC04 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).



Nota: Os padrões e o extrato de porfirinas estão em HCl 5%.

Fonte: A autora, 2024.

Os espectros de absorção e emissão obtidos sugerem a predominância de coproporfirina III. No entanto, essas análises não permitem descartar a presença de outras porfirinas nos extratos das amostras, uma vez que os picos de emissão e absorção das porfirinas investigadas

são bastante próximos. Isso pode ter resultado na ocultação de picos correspondentes a outras porfirinas, caso estas estejam presentes em quantidades menores.

A análise dos extratos por CLAE-FLD e CLAE-UV permitiu a separação e identificação das demais porfirinas. A coproporfirina III foi detectada em todas as amostras estudadas, já a protoporfirina IX em apenas 2 das 11 amostras. A uroporfirina I não foi detectada apenas na amostra 2962. A Tabela 3 mostra os tempos de retenção dos sinais obtidos para os padrões e amostras utilizadas neste estudo.

Tabela 3 - Tempos de retenção (min) dos sinais obtidos dos padrões e dos extratos de porfirinas das amostras estudadas, cultivadas em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L), nos cromatogramas da CLAE-FLD e CLAE-UV

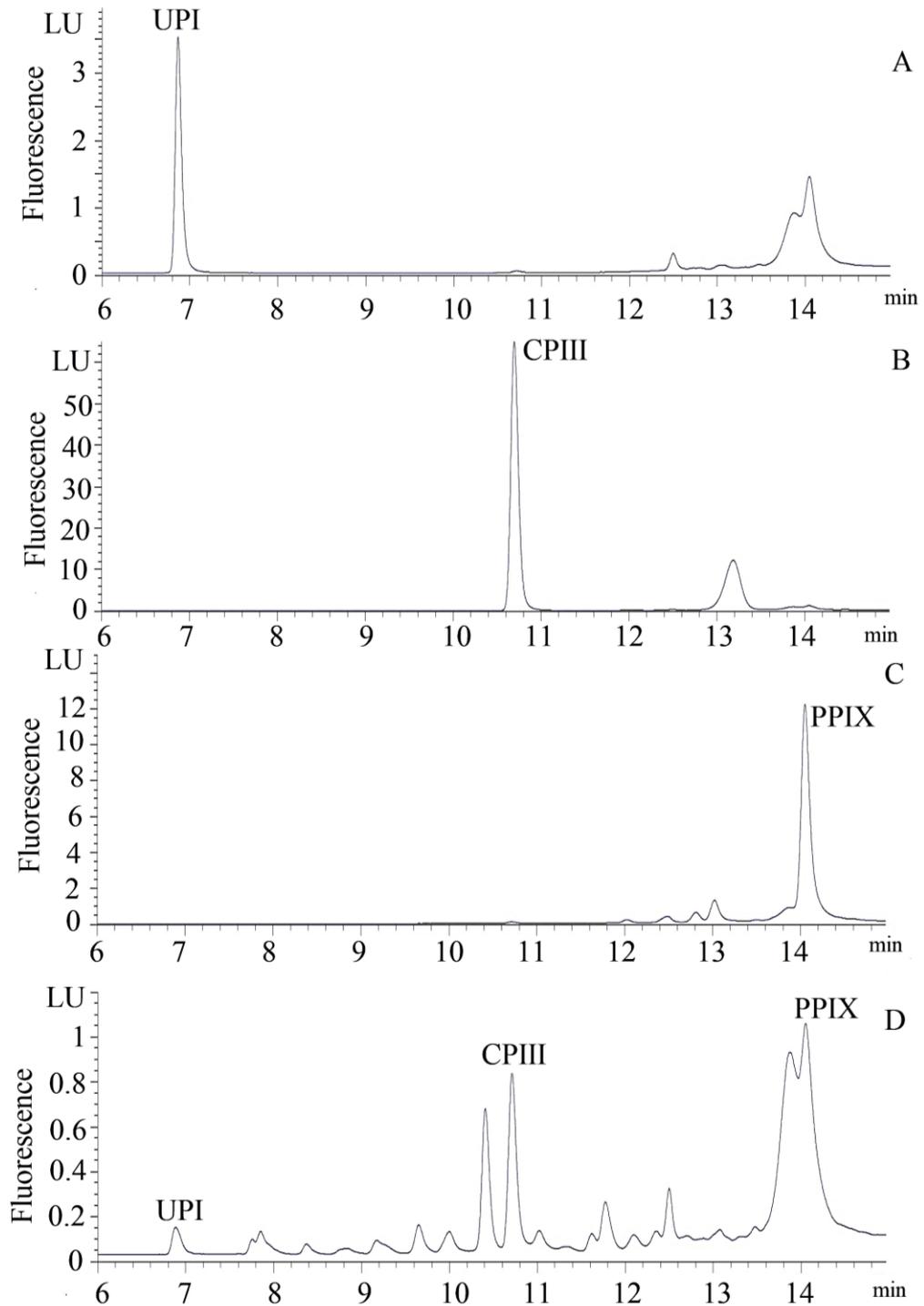
Padrões/ Amostras	UPI (min)		CPIII (min)		PPIX (min)	
	FLD	UV	FLD	UV	FLD	UV
Padrão	6.89	5.75	10.72	9.09	14.02	11.70
ATCC 27010	6.98	5.77	10.81	9.11	ND	ND
ATCC 27012	6.96	5.76	10.81	9.12	ND	ND
HC01	6.96	5.77	10.81	9.11	ND	ND
HC02	6.94	5.73	10.79	9.09	ND	ND
HC03	6.98	5.76	10.81	9.11	14.05	ND
HC04	6.99	5.79	10.82	9.11	ND	ND
HC06	6.99	5.79	10.82	9.11	14.04	ND
TR241	6.97	5.75	10.82	9.11	ND	ND
TR402	6.97	5.79	10.82	9.11	ND	ND
2962	ND	ND	10.81	9.11	ND	ND
809	6.89	5.76	10.79	9.11	ND	ND
1002	6.90	5.76	10.72	9.10	ND	ND

Legenda: ND – Sinal não detectado; UPI – uroporfirina I; CPIII – coproporfirina III; PPIX – protoporfirina IX; min – minutos.

Fonte: A autora, 2024.

As Figuras 17 e 18 mostram os cromatogramas dos extratos da amostra HC03 obtidos na CLAE-FLD e CLAE-UV respectivamente. Estes cromatogramas foram selecionados para ilustrar o perfil típico do cromatograma observado nas demais amostras analisadas, que exibiram resultados equivalentes para os sinais pesquisados, conforme apresentado na Tabela 3.

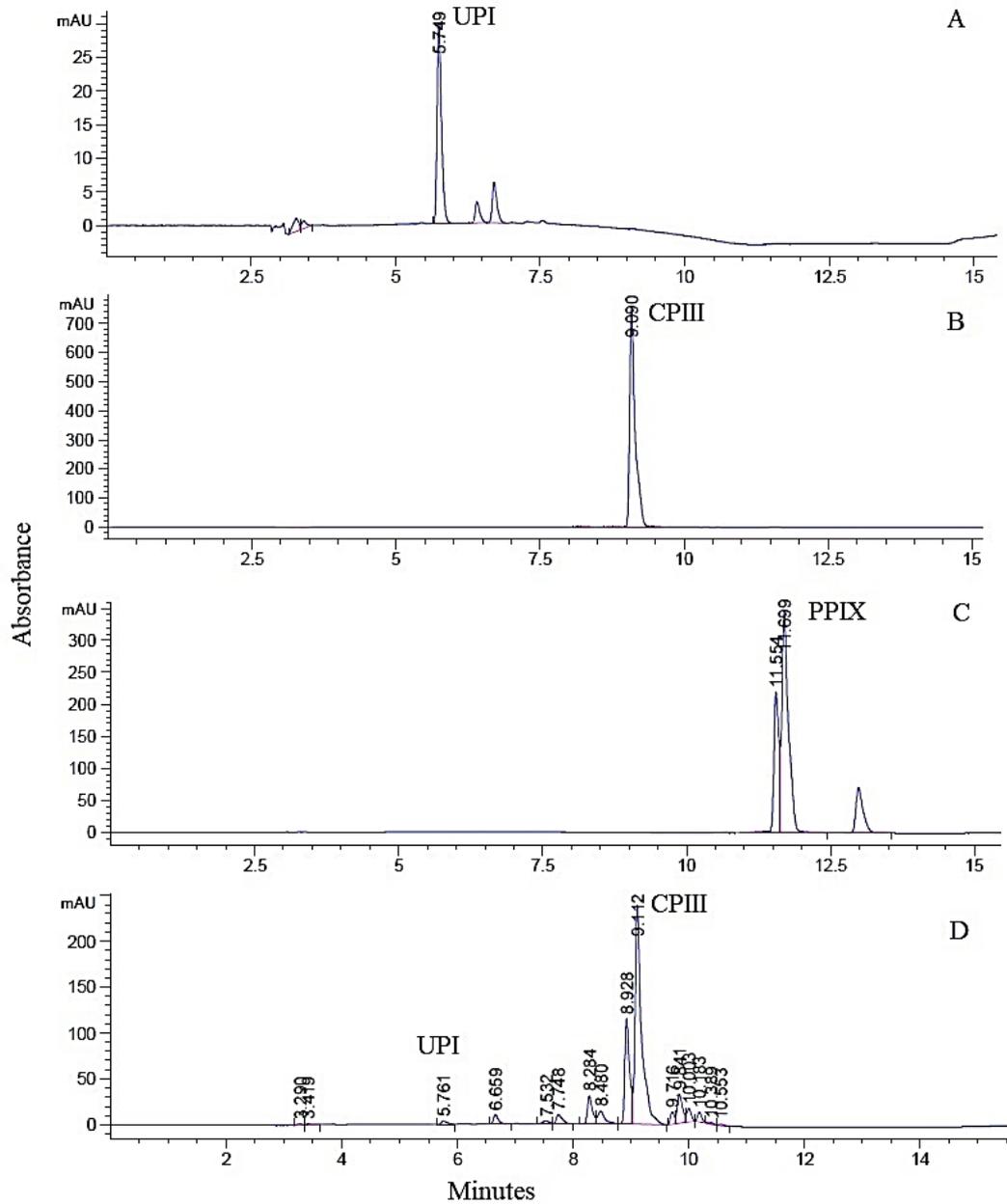
Figura 17 - Cromatograma obtido na CLAE-FLD dos padrões e do extrato de porfirinas da amostra HC03 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).



Legenda: A – uroporfirina (UPI) I; B – coproporfirina III (CPiII); C – protoporfirina IX (PPIX); D – amostra HC03; LU – unidade de luminescência; min – minutos

Fonte: A autora, 2024.

Figura 18 - Cromatograma obtido na CLAE-UV dos padrões e do extrato de porfirinas da amostra HC03 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L).

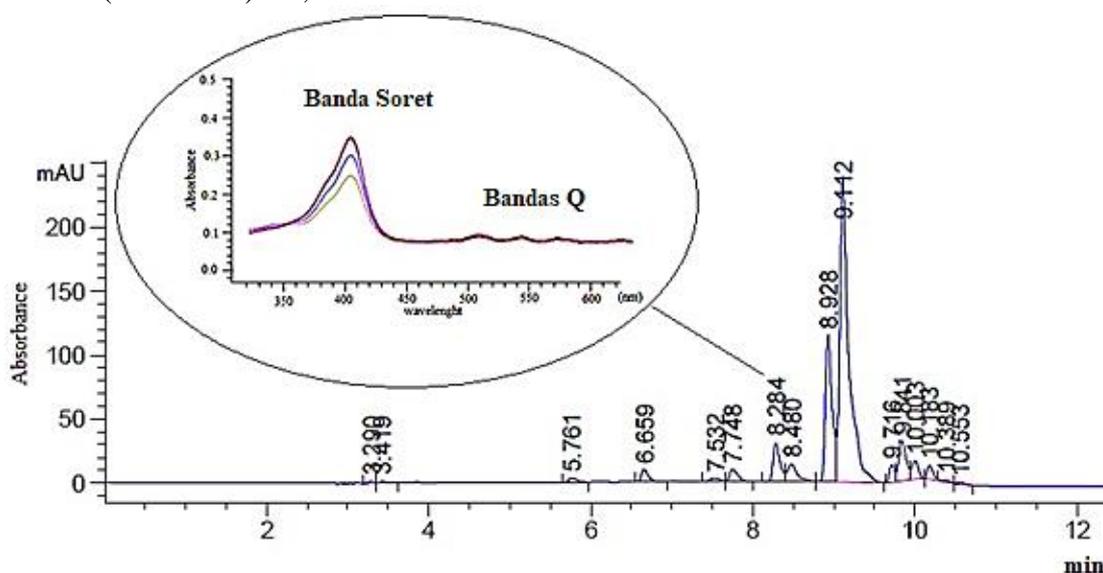


Legenda: A – uroporfirina (UPI) I; B – coproporfirina III (CPIII); C – protoporfirina IX (PPIX); D – amostra HC03; AU – unidade de absorvância.

Fonte: A autora, 2024.

Os cromatogramas obtidos na CLAE-UV dos extratos de todas as cepas mostraram outros sinais com espectros de absorção típicos de porfirinas (Figura 19). Este achado sugere a presença de outras porfirinas além das pesquisadas neste trabalho.

Figura 19 - Cromatograma obtido na CLAE-UV do extrato de porfirinas da amostra HC03, cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L), e espectro de absorção de sinal (no detalhe) a 8,24 minutos.



Legenda: Espectro de absorção do sinal a 8,24 minutos no detalhe
 Fonte: A autora, 2024.

A análise dos extratos por CLAE-EM detectou o íon referente à m/z para coproporfirina III ($[M+H]^+ = 655,5$) e o íon “filho” duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 328,5$) no Cromatograma de Íons Totais (TIC) e no monitoramento de íons específicos para todas as cepas estudadas. A protoporfirina IX e a uroporfirina I não foram detectadas no TIC de nenhuma cepa. Entretanto, no monitoramento de íons específicos, a presença de seus íons foi detectada, conforme mostrado na Tabela 4. Os cromatogramas relacionados à CLAE-EM da cepa de *C. diphtheriae* HC04 são mostrados na Figura 20. Os cromatogramas foram selecionados para ilustrar o perfil típico do cromatograma observado em todas as demais amostras analisadas, que exibiram resultados equivalentes para os sinais pesquisados, conforme apresentado na Tabela 4.

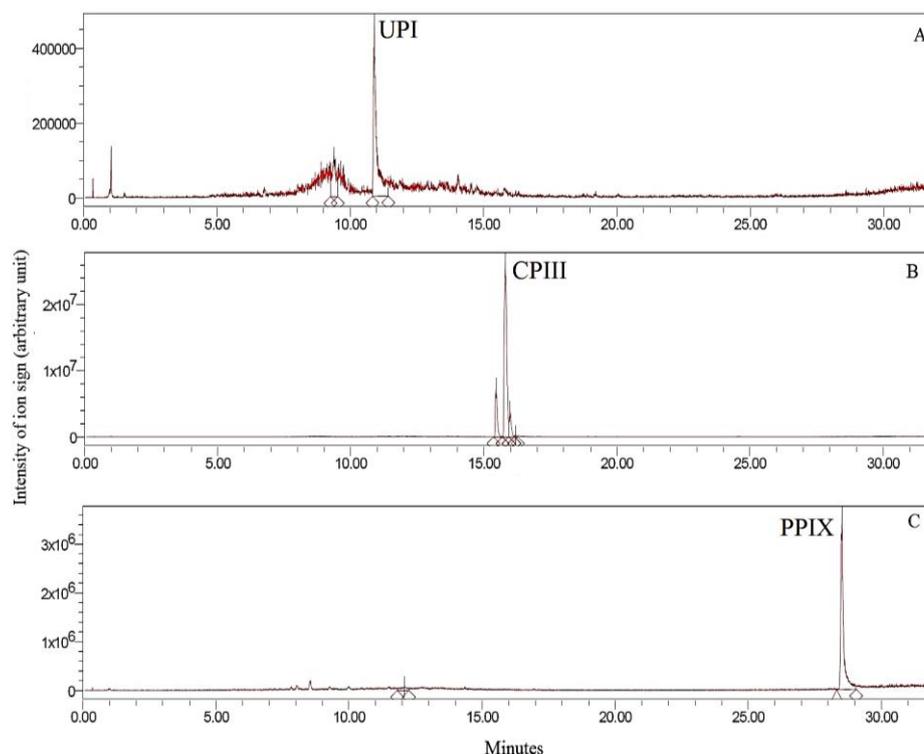
Tabela 4 - Tempos de retenção dos sinais (min) dos padrões de porfirinas e dos extratos de porfirinas das amostras, cultivadas em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L), obtidos na CLAE-EM

Padrão/Amostras	Uroporfirina I [M+H]⁺ = 830	Coproporfirina III [M+H]⁺ = 655	Protoporfirina IX [M+H]⁺ = 563
Padrão	10.83	15.74	28.47
ATCC 27010	ND	15.71	28.46
ATCC 27012	ND	15.71	28.52
HC01	ND	15.75	28.50
HC02	ND	15.70	28.51
HC03	ND	15.70	28.49
HC04	10.82	15.72	28.50
HC06	10.89	15.72	28.50
TR402	ND	15.73	28.52
TR241	ND	15.73	28.52
2962	ND	15.71	28.48
809	10.87	15.73	28.44
1002	10,85	15.71	28.47

Legenda: ND – não detectado;

Fonte: A autora, 2024

Figura 20 - Cromatogramas do extrato de porfirinas da amostra HC04 cultivada em TSB com suplementação de ALA (2 mmol/L) obtidos em CLAE-EM.



Legenda: (A) [M+H]⁺ = 830; (B) [M+H]⁺ = 655; (C) [M+H]⁺ = 563; PPIX, protoporfirina IX; CPIII, coproporfirina III; UPI, uroporfirina I.

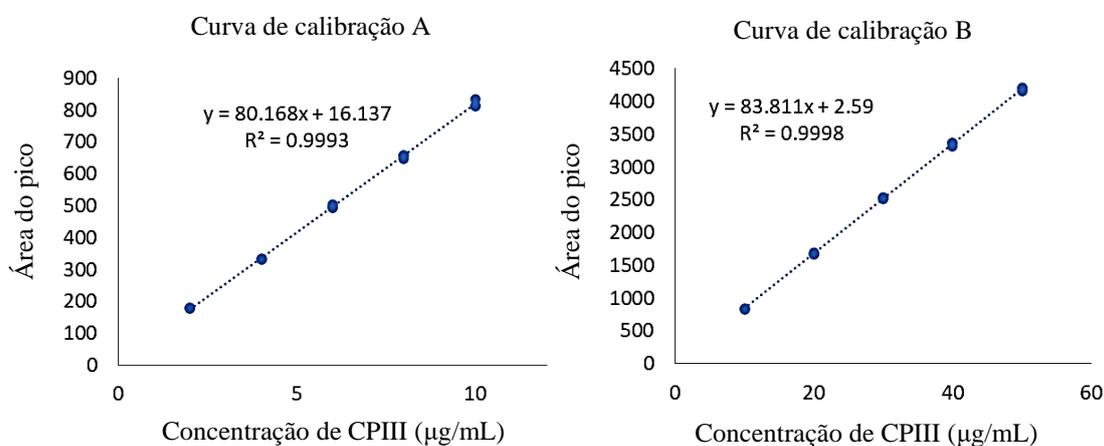
Fonte: A autora, 2024.

3.2. Quantificação de coproporfirina III produzida por *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*

A análise qualitativa por espectrometria de absorção e de emissão das porfirinas mostrou a predominância da coproporfirina III em todas as cepas e por esse motivo, foi realizada a quantificação da coproporfirina III através da construção de curvas de calibração e utilização da CLAE-UV.

Foram feitas duas curvas de calibração, uma de 2 µg/mL até 10 µg/mL (curva A) e outra de 10 µg/mL até 50 µg/mL (curva B). A linearidade obtida nas curvas de calibração foi alta, demonstrada por coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 para as duas curvas, conforme mostrado na Figura 21. O limite de detecção (LOD) foi determinado em 0,27 µg e o limite de quantificação em 0,82 µg. O desvio padrão da curva de calibração A foi de +/- 0,60329 µg/mL e para a curva B foi de +/- 0,34159 µg/mL.

Figura 21 - Curvas de calibração A e B com seus respectivos coeficientes de linearidade obtidas na CLAE-UV.



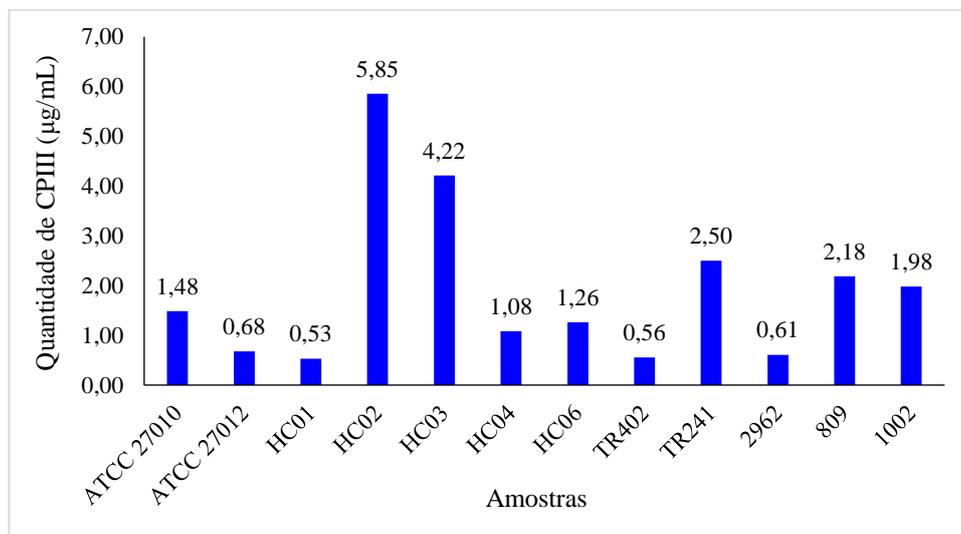
Legenda: CPIII – coproporfirina III

Nota: Curva A – 2 µg/mL até 10 µg/mL e curva B de 10 µg/mL até 50 µg/mL.

Fonte: A autora, 2024.

A quantificação da coproporfirina III revelou quantidades bem diferentes entre as amostras estudadas, como mostrado na Figura 22.

Figura 22 - Quantificação da coproporfirina III produzida pelas amostras estudadas cultivadas em TSB com suplementação de ALA 2 mmol/L.



Legenda: CPIII, coproporfirina III; desvio padrão da curva de calibração utilizada = +/- 0,60329 µg/mL

Nota: A quantificação foi realizada utilizando a técnica de CLAE-UV.

Fonte: A autora, 2024.

3.3. Influência do ácido aminolevulínico (ALA), FeSO₄ e peróxido de hidrogênio na produção de porfirinas

Para a avaliação da influência do ALA, FeSO₄ e H₂O₂ foram feitas as análises qualitativas do perfil de porfirinas produzidas pelas amostras ATCC 27010 e HC04 por espectrometria de absorção, espectrometria de emissão e CLAE-MS, e a quantificação da coproporfirina III por CLAE-UV.

A espectroscopia de absorção e emissão mostrou espectros próprios de porfirinas para as duas amostras e todas as condições estudadas (Figuras 23 e 24), com picos de absorção e emissão característicos da coproporfirina III.

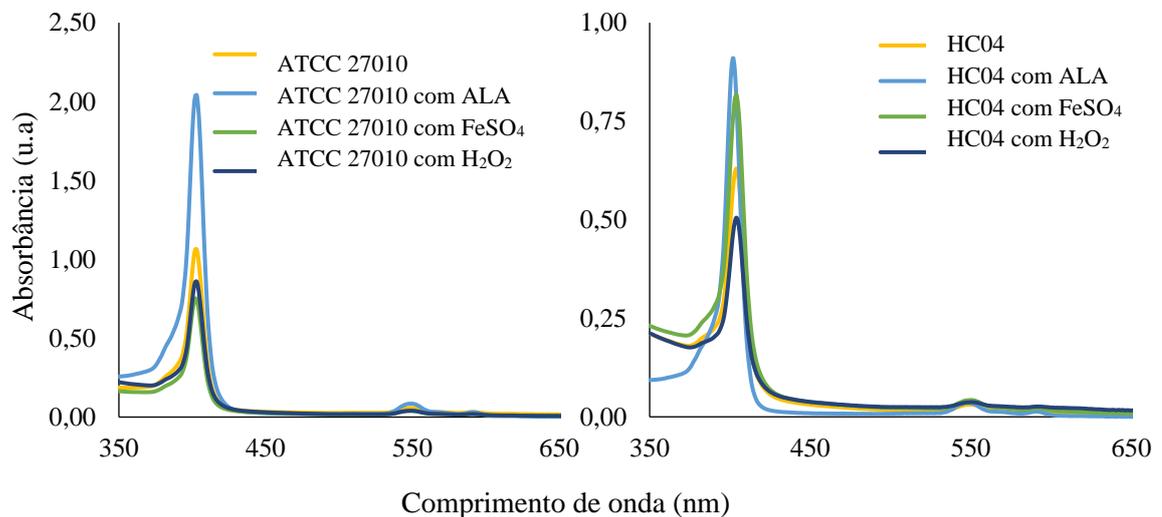
A Tabela 5 mostra os picos de absorção e emissão dos padrões e dos extratos de porfirinas das amostras nas diferentes condições de cultivo estudadas e, considerando as resoluções dos instrumentos utilizados, observou-se que o comprimento de onda da banda Soret e dos picos de emissão obtidos não se alteraram nas diferentes condições de cultivo. Isso sugere que o perfil de porfirinas produzidos permaneceu o mesmo.

Tabela 5 - Picos de absorção e emissão obtidos nas análises de espectroscopia de emissão e absorção dos padrões e dos extratos de porfirinas das amostras nas diferentes condições de cultivo

Padrão/Amostra	Picos de emissão (nm)		Picos de absorção (nm) (Banda Soret)
Coproporfirina III	596	649	401
Protoporfirina IX	605	652	406
Uroporfirina I	600	649	407
27010	594	649	402
27010 com ALA	594	647	402
27010 com FeSO ₄	594	648	402
27010 com H ₂ O ₂	595	648	402
HC04	594	646	403
HC04 com ALA	595	647	403
HC04 com FeSO ₄	595	646	403
HC04 com H ₂ O ₂	595	647	403

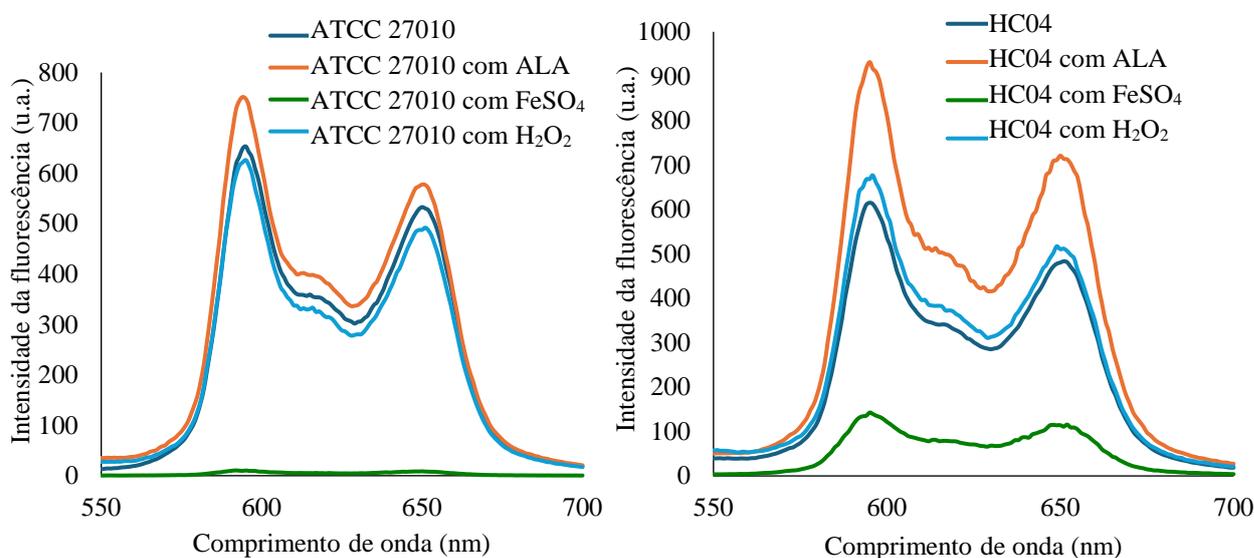
Nota: Os padrões e o extrato de porfirinas estão em HCl 5%. Resolução do espectrofluorímetro utilizado é de 1.5 nm e a do espectrômetro de absorção é de 5 nm.
Fonte: A autora, 2024.

Figura 23 - Espectros de absorção obtidos dos extratos de porfirinas das amostras ATCC 27010 e HC04 nas condições de cultivos estudadas



Nota: Os extratos estavam diluídos em HCl 5%.
Legenda: u.a – unidade de absorbância
Fonte: A autora, 2024.

Figura 24 - Espectros de absorção obtidos dos extratos de porfirinas das amostras ATCC 27010 e HC04 nas condições de cultivos estudadas



Legenda: u.a. – unidade arbitrária

Fonte: A autora, 2024.

A análise dos extratos por CLAE-EM detectou o íon referente à m/z para coproporfirina III ($[M+H]^+ = 655,5$) e o íon “filho” duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 328,5$) no Cromatograma de Íons Totais (TIC) e no monitoramento de íons específicos para todas as condições de cultivo estudadas. A protoporfirina IX e a uroporfirina I não foram detectadas no TIC de nenhuma cepa. Entretanto, no monitoramento de íons específicos, a presença de seus íons foi detectada na amostra HC04 em todas as condições de cultivo indicando a manutenção do perfil de porfirinas produzido para esta amostra. Para a amostra ATCC 27010, nas condições de adição de ferro e peróxido de hidrogênio, não foi possível detectar o íon referente à uroporfirina I. A Tabela 06 mostra para cada amostra e condições os tempos de retenção dos sinais obtidos.

Tabela 6 - Tempos de retenção em minutos dos sinais dos padrões de porfirinas e extratos de porfirinas das amostras nas diferentes condições de cultivos obtidos na CLAE-EM

Padrão/Amostras	Uroporfirina I [M + H] ⁺ = 830	Coproporfirina III [M + H] ⁺ = 655	Protoporfirina IX [M + H] ⁺ = 563
	TR	TR	TR
Padrão	10.83	15.74	28.47
ATCC 27010	10.87	15.74	28.45
ATCC 27010 com ALA	10.85	15.70	28.45
ATCC 27010 com FeSO ₄	ND	15.78	28.43
ATCC 27010 com H ₂ O ₂	ND	15.78	28.44
HC04	10.85	15.71	28.42
HC04 com ALA	10.85	15.70	28.42
HC04 com FeSO ₄	10,85	15.70	28.42
HC04 com H ₂ O ₂	10.85	15.76	28.42

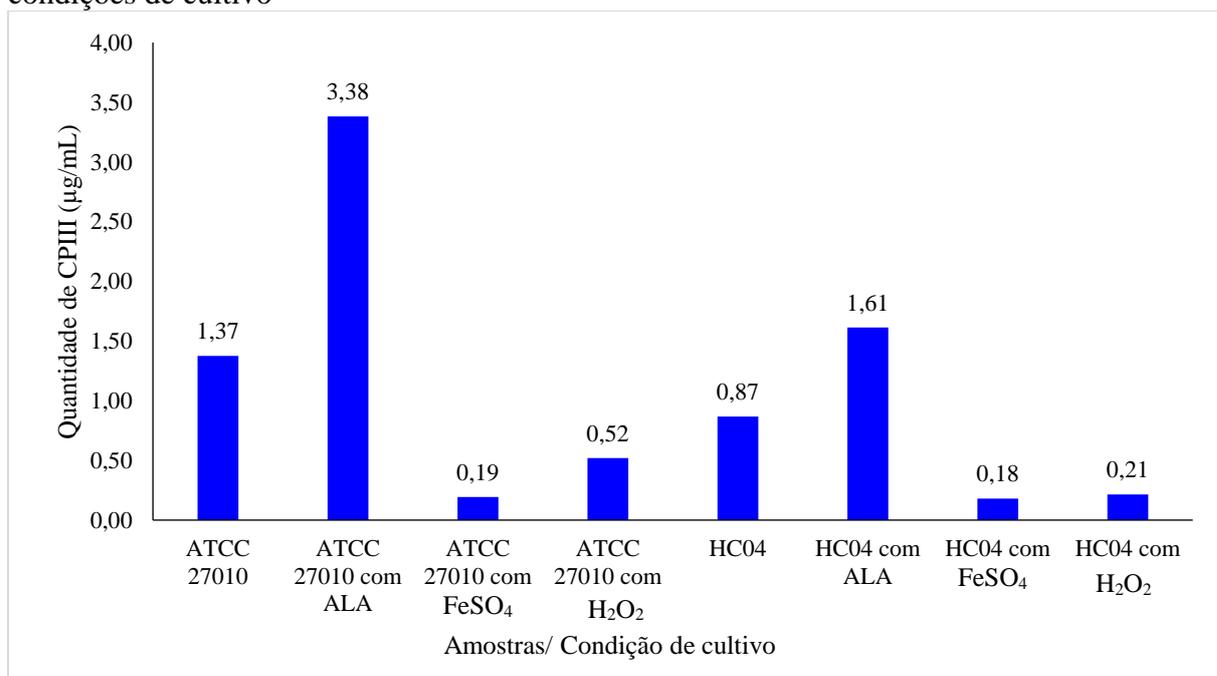
Legenda: TR – tempo de retenção; ND – não detectado

Fonte: A autora, 2024.

A ausência de sinal para uroporfirina I na análise por CLAE-EM para a amostra ATCC 27010 com a adição de ferro e peróxido de hidrogênio sugere que há a diminuição da quantidade desta porfirina nestas condições de cultivo.

A quantificação da coproporfirina III feita por CLAE-UV mostra que a adição de ALA aumenta a quantidade de coproporfirina III para as duas amostras estudadas. Já adição de FeSO₄ e H₂O₂ diminuiu a quantidade de CPIII nas duas amostras estudadas (Figura 25).

Figura 25 - Quantificação da coproporfirina III produzida pelas amostras nas diferentes condições de cultivo



Legenda: CPIII – coproporfirina III

Nota: Quantificação feita utilizando a técnica de CLAE-UV

Fonte: A autora, 2024.

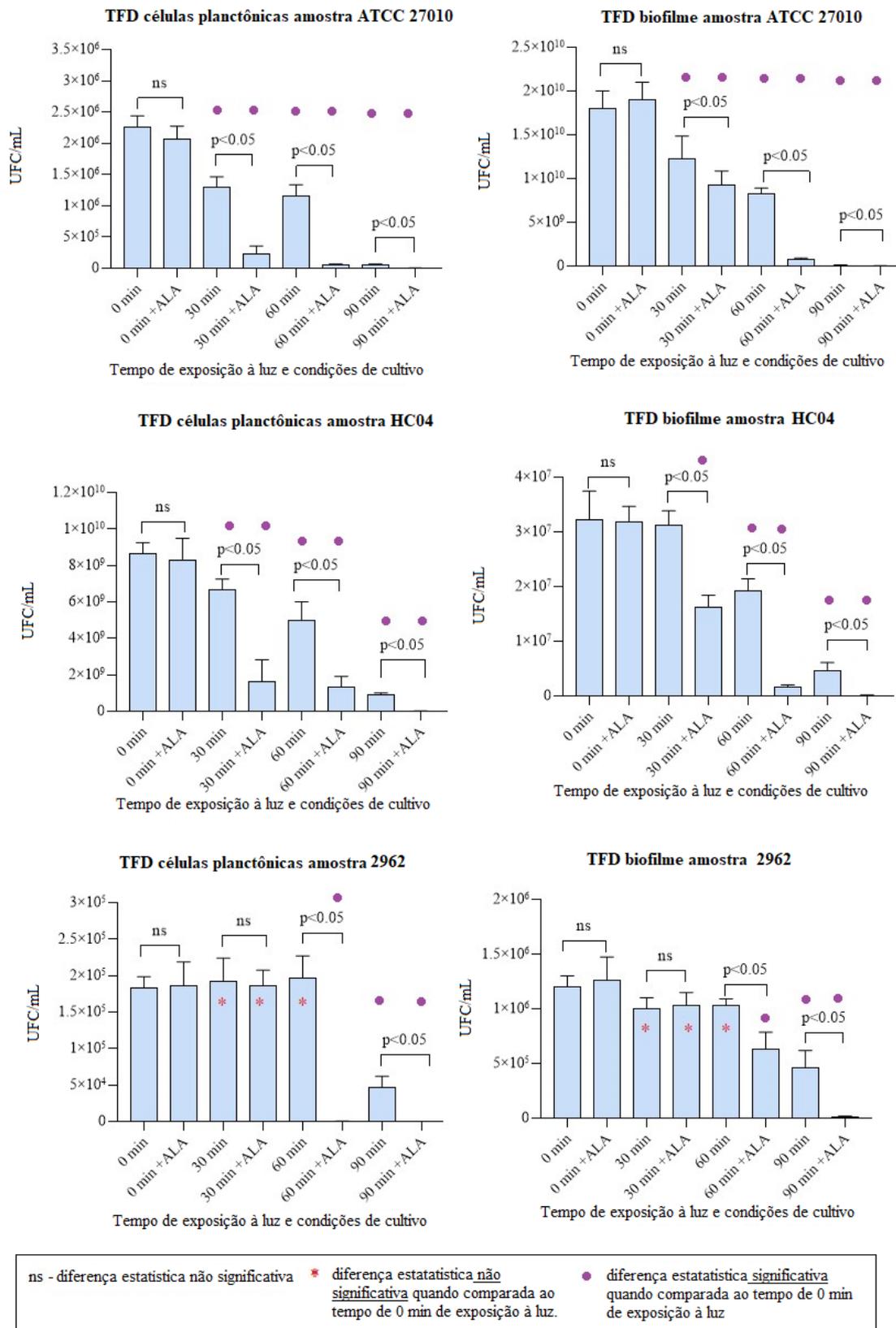
3.4. Estudo da utilização das porfirinas endógenas utilizadas por *C. diphtheriae* como fotossensibilizador em terapias de fotoinativação

A contagem das UFC/mL após a exposição das amostras à luz de led azul encontra-se na Figura 26. Todas as amostras estudadas responderam em algum grau à exposição à luz. O tempo de exposição à luz necessário para causar diminuição no número de UFC/mL está diretamente relacionado com a quantidade de coproporfirina III produzida pelas amostras. A amostra ATCC 27010, que produz mais CPIII mostrou uma redução na UFC/mL com apenas 30 minutos de exposição em culturas sem e com a adição de ALA. Por outro lado, a amostra 2962, que produz menos CPIII, mostra uma redução no número de UFC/mL somente após 60 minutos de exposição à luz na cultura com a adição de ALA e após 90 minutos de exposição na cultura sem a adição de ALA. Após 90 minutos de exposição à luz, as culturas com a adição de ALA apresentaram uma redução no número de UFC/mL de 1-3 log a mais que nas culturas sem ALA.

A adição de ALA à cultura resultou em uma redução no tempo de exposição à luz necessário para causar uma diminuição significativa no número de UFC/mL tanto na cepa HC04 quanto na cepa 2962. Essa redução foi observada tanto nos experimentos de células planctônicas quanto nos de biofilme, com o tempo de exposição à luz sendo reduzido de 60 minutos para 30 minutos na cepa HC04 e de 90 minutos para 60 minutos na cepa 2962. A Tabela 7 apresenta a fração de sobrevivência em culturas de células planctônicas e biofilme, com e sem a adição de ALA, após 90 minutos de exposição à luz. Observou-se que a adição de ALA diminui a fração de sobrevivência indicando um aumento na eficiência da fotoinativação em todas as cepas e condições estudadas.

A comparação da fração de sobrevivência entre as células planctônicas e as células sésseis (em biofilme) revela que, com exceção da cepa ATCC 27010 na cultura sem ALA, todas apresentaram um aumento na sobrevivência do biofilme.

Figura 26 - Fotoinativação de células planctônicas e biofilme em culturas com e sem suplementação de ALA.



Legenda: TFD – terapia fotodinâmica; +ALA (adição de ALA ao cultivo)
 Fonte: A autora, 2024.

Tabela 7 - Fração de sobrevivência (N/N_0) de culturas bacterianas fotossensibilizadas por suas porfirinas endógenas após 90 minutos de iluminação.

Amostra/Tipo de célula	Fração de sobrevivência (N/N_0)	
	Sem ALA	Com ALA
ATCC 27010 células planctônicas	2.32×10^{-02}	1.16×10^{-03}
ATCC 27010 células sésseis	6.85×10^{-03}	1.23×10^{-03}
HC04 células planctônicas	1.04×10^{-01}	2.17×10^{-03}
HC04 células sésseis	1.47×10^{-01}	2.94×10^{-03}
2962 células planctônicas	2.55×10^{-01}	7.14×10^{-04}
2962 células sésseis	3.89×10^{-01}	1.05×10^{-02}

Legenda: N_0 – UFC/mL antes da exposição à luz; N – UFC/mL depois de 90 minutos de exposição à luz.

Fonte: A autora, 2024.

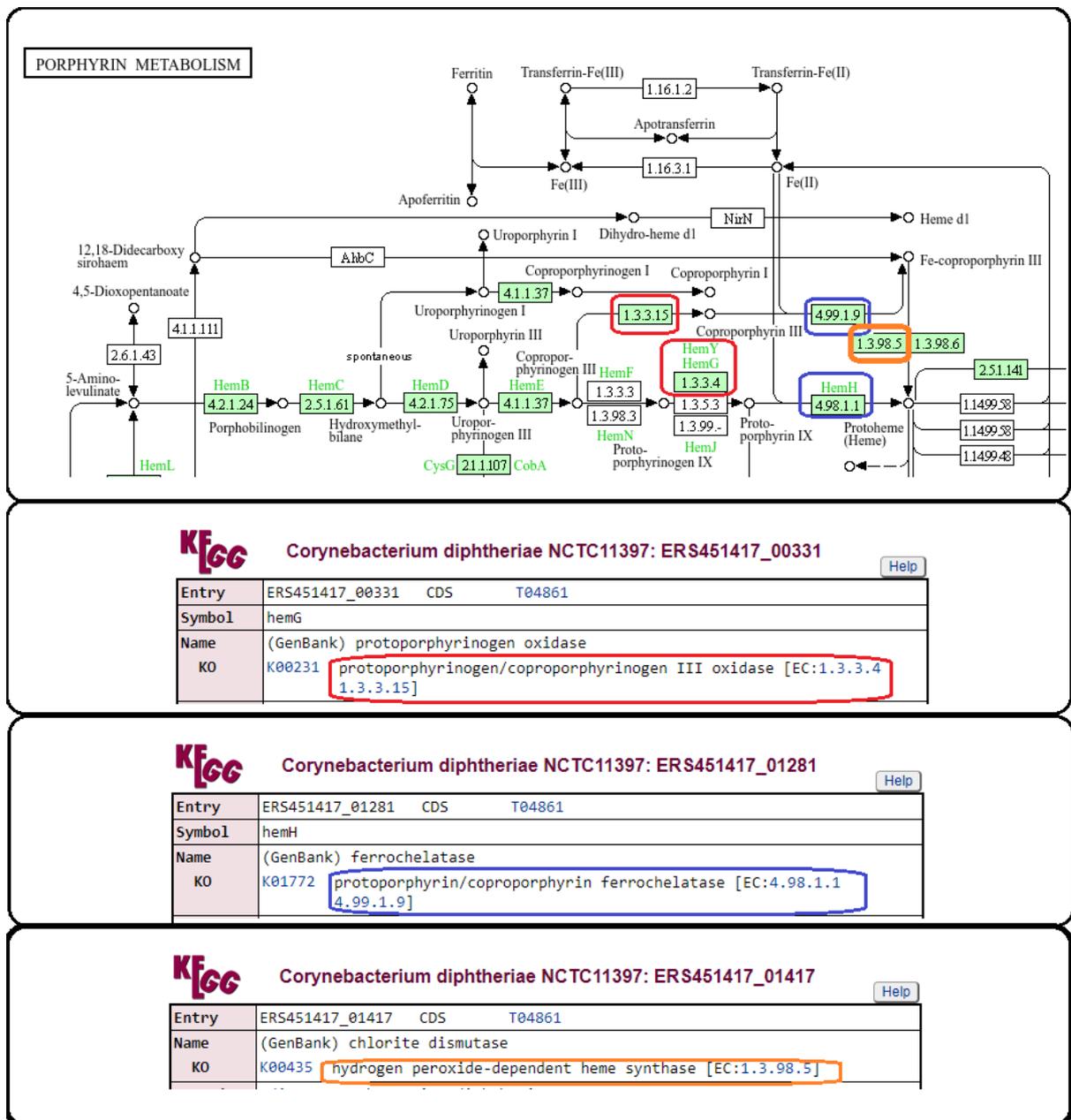
3.5. Pesquisa *in silico* pelos genes envolvidos na biossíntese da coproporfirina III

A fim de investigar por qual das duas vias (clássica ou não canônica) ocorre a síntese do grupo heme em *C. diphtheriae*, foi realizada uma busca *in silico* pela via metabólica do grupo heme para a cepa tipo ATCC 27010 (NCTC 11397) no banco de dados KEGG. A Figura 27 mostra parte da via metabólica de síntese do grupo heme para a amostra ATCC 27010 e a anotação dos genes *hemG*, *hemH* e *hem Q* disponibilizada no banco de dados da KEGG.

Após análise da via metabólica do grupo heme para a amostra tipo ATCC 27010 observou-se uma duplicidade de anotação para gene *hemG*, que aparece como responsável pela codificação protoporfirinogênio oxidase e coproporfirinogênio oxidase. No mapa da via metabólica, sugere-se o nome *hemY* para anotação da coproporfirinogênio oxidase, mas esse gene não aparece no banco de dados da KEGG e do NCBI. A busca no banco de dados do NCBI mostra o gene *hemG* anotado para a protoporfirinogênio oxidase e não há qualquer anotação para a coproporfirinogênio oxidase, considerando somente a via clássica. O mesmo ocorre com o gene *hemH*, que aparece no banco de dados da KEGG como codificador da proto e coproporfirina ferroquelatase e no NCBI como responsável pela protoporfirina ferroquelatase, não havendo anotação para a coproporfirina ferroquelase.

A enzima coproheme descarboxilase, também chamada de heme sintetase peróxido de hidrogênio dependente, aparece descrita e anotada corretamente nos dois bancos de dados pesquisados.

Figura 27 - Via metabólica de síntese do grupo heme para a amostra *C. diphtheriae* ATCC 27010 (NCTC 11397) e as anotações dos genes *hemG*, *hemH* e *hemQ* da KEGG.



Nota: Em vermelho destaca-se os genes *hemG*, envolvido na formação da protoporfirina IX (via clássica) e coproporfirina III (via não canônica), em azul o gene *hemH* envolvido na adição do ferro na protoporfirina IX (via clássica) e coproporfirina III (via não canônica) e em laranja o gene *hemQ* responsável pela codificação da coprohemedesacarboxilase (170).

Acesso ao KEGG em 25/09/2024 (<https://www.kegg.jp/pathway/map=cdip00860&keyword=porphyrin>)

Fonte: A autora, 2024.

4. DISCUSSÃO

As espécies do complexo *Corynebacterium diphtheriae* ainda persistem em todo o mundo como agentes causadores da difteria clássica, cutânea e de processos infecciosos invasivos (9–11,13,24,79,171). A ocorrência de surtos esporádicos atingindo indivíduos previamente imunizados ressalta a necessidade do desenvolvimento de vacinas contendo novas seleções de antígenos bacterianos, além do toxoide diftérico. Outra preocupação é o surgimento de cepas resistentes à antibioticoterapia relatadas em casos de difteria clássica e infecções invasivas, que exigem novas estratégias de tratamento dessa infecção bacteriana. Portanto, conhecer o metabolismo deste patógeno é fundamental para o desenvolvimento de vacinas e fármacos eficientes (9,172,173).

Neste contexto, a via metabólica de síntese do grupo heme em bactérias do complexo *Corynebacterium diphtheriae* permanece um campo pouco explorado. Assim, um dos objetivos deste estudo foi identificar as principais porfirinas envolvidas via biossintética (uroporfirina I, coproporfirina III e protoporfirina IX) e investigar a influência da adição de ALA, ferro e peróxido de hidrogênio na produção dessas porfirinas de forma a trazer mais informações sobre o funcionamento desta complexa via metabólica.

Os principais métodos para a análise de porfirinas são a espectrometria de absorção UV-visível e a espectrometria de emissão, que devido à sua alta sensibilidade e capacidade de detecção, são amplamente utilizados para identificação e quantificação de porfirinas. No entanto, a análise de porfirinas provenientes de materiais biológicos apresenta diversos desafios, como a complexidade da matriz biológica, os componentes do meio de cultura e restos celulares que contém uma série de interferentes endógenos. A utilização da CLAE na análise de porfirinas oriundas de materiais biológicos se tornou uma técnica muito utilizada e descrita na literatura, pois permite a separação das porfirinas e associadas à espectrometria UV-vis, fluorescência e massas tornam-se um eficiente método detecção e quantificação dessas moléculas (143,166,174,175).

Os resultados da análise química dos extratos de porfirinas das amostras utilizadas neste estudo mostraram a presença da coproporfirina III na análise por CLAE com todos os detectores utilizados. No entanto, a protoporfirina IX só foi detectada via CLAE-EM. Na análise da protoporfirina IX via CLAE, algumas complicações significativas podem surgir e precisam ser consideradas. Primeiro, a protoporfirina IX é mais hidrofóbica, que as demais porfirinas utilizadas neste estudo, o que pode resultar em uma forte interação com as fases estacionárias

das colunas C18, levando a tempos de retenção mais longos e, por vezes, a uma separação inadequada de isômeros próximo ou simplesmente a não eluição da porfirina da coluna(174,176) . Por isso, a escolha do solvente é crítica, já que solventes com uma alta proporção de água tendem a diminuir a solubilidade da protoporfirina IX, enquanto a adição de solventes orgânicos pode melhorar sua eluição.

Outro complicador é a tendência de formação de agregados pela protoporfirina IX, que está relacionada à sua natureza altamente hidrofóbica e de formar empilhamentos via interações π - π entre as moléculas dos anéis tetrapirrólicos. Esses empilhamentos resultam em agregados estáveis em solução, particularmente em solventes aquosos, onde a solubilidade da protoporfirina IX já é reduzida. Como resultado, esses agregados podem comprometer a separação e quantificação cromatográfica, levando a erros de quantificação e perda de resolução (174–177).

Na metodologia de CLAE-UV e CLAE-FLD utilizada neste estudo a eluição dos analitos foi feita por gradiente com metanol e solução aquosa de acetato de amônio e na metodologia de CLAE-MS a eluição foi feita também por gradiente, mas com acetronitrila e água Milli Q acidificada com ácido fórmico. A não detecção da protoporfirina IX na CLAE-UV pode ter sido consequência da formação destes agregados e não por sua ausência na amostra, uma vez que foi detectada via CLAE-MS.

A detecção da coproporfirina III nos cromatogramas de íons totais de todas as amostras estudadas e os picos de absorção e emissão obtidos nos espectros de emissão e absorção apontam para a predominância da coproporfirina III nos extratos das porfirina extraídas das amostras do complexo *C. diphtheriae* utilizadas neste estudo, reforçando a hipótese da utilização da via não canônica de síntese do grupo heme.

Durante muito tempo presumiu-se que a via metabólica do grupo heme era única entre as espécies. Na última década ficou claro que, embora exista um núcleo inicial comum e conservado, as etapas finais de formação do grupo heme podem ocorrer de duas formas. A via mais antiga, chamada de via clássica, presente em parte das bactérias Gram-negativas e eucariotos, descarboxilam o coproporfirinogênio III em protoporfirinogênio IX, em seguida o oxidam para protoporfirina IX para subsequente inserção do átomo de ferro e formação do grupo protoheme. Já na segunda via, chamada de via não canônica, presente em Actinomicetóides e Bacillotas, o coproporfirinogênio III é oxidado à coproporfirina III e então o ferro é inserido para a formação do coproheme; por fim, ocorre a descarboxilação do coproheme pela enzima coproheme descarboxilase formando o grupo protoheme (152,157).

As vias de síntese do grupo heme em procariotos já foram identificadas, no entanto há desafios significativos nas anotações funcionais desses genes (156). A maior parte do que se sabe hoje sobre a coproporfirinogênio oxidase vem de estudos sobre as enzimas de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (152) e os resultados sugerem que uma única enzima pode usar como substrato o coproporfirinogênio e o protoporfirinogênio, atuando como copro ou protoporfirinogênio oxidase, respectivamente, mas com afinidade maior pelo substrato para a síntese de coproporfirina III (152,156,178).

O resultado do estudo da via metabólica do grupo heme da amostra ATCC 27010, anotada no banco de dados da KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e no banco de dados de genes do NCBI (National Center for Biotechnology Information) mostra a multiplicidade de vias e a combinação híbrida de genes das duas vias (canônica e não canônica), dificultando a identificação clara dos genes envolvidos na via metabólica. A ausência de estudos in vitro que visem caracterizar quimicamente e funcionalmente as enzimas envolvidas na biossíntese do grupo heme para as espécies do complexo *C. diphtheriae* torna as anotações destes genes um desafio ainda maior. Atualmente somente a enzima coproheme descarboxilase de *C. diphtheriae* tem sua estrutura e atividade descrita numa série de 8 artigos publicados desde 2020, por dois grupos de pesquisa, um da Itália e outro da Áustria (179–186), e o gene que codifica esta enzima aparece anotado corretamente como apresentado nos resultados.

A análise química das porfirinas extraídas das amostras do complexo *C. diphtheriae* corroboram a hipótese de dupla função da coproporfirinogênio oxidase uma vez que foi possível detectar via CLAE-EM a protoporfirina IX e a coproporfirina III.

A análise qualitativa dos extratos de porfirinas mostra uma homogeneidade no padrão das porfirinas produzidas nas amostras pesquisadas, incluindo as amostras de *C. ulcerans* e de *C. pseudotuberculosis*. Os espectros de absorção típicos de porfirinas obtidos na CLAE-UV em outros sinais, além dos referentes às porfirinas pesquisadas nesse trabalho, sugerem a presença de outras porfirinas e necessita de mais investigações. Já a quantificação da coproporfirina III mostrou diferenças importantes entre as amostras e aponta para uma propriedade dependente da cepa, não sendo possível correlacionar com a sua origem, capacidade de fermentação de sacarose ou produção de toxina diftérica.

O estudo da influência da adição de ácido aminolevulínico (ALA) ao cultivo, na concentração utilizada, mostrou que sua adição provoca o aumento da quantidade de coproporfirina III em cerca de 2 vezes, resultado esperado, já que o ALA é o principal precursor desta via metabólica. Não foi observada mudança no padrão de porfirinas produzidas com a adição de ALA nas amostras estudadas.

A influência da suplementação de ALA no perfil de porfirinas produzidas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas já foi descrita em estudos de fotoinativação de microrganismos. Para as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foi observado que a síntese de porfirinas atingiu seu pico em concentrações de 1-2 mM de ALA (126,165,187). Também foi descrito que o tipo de porfirinas produzidas varia de acordo com a duração da exposição ao ALA. Tempos curtos de incubação tendem a acumular mais porfirinas lipofílicas, como a protoporfirina IX, enquanto períodos mais longos resultam em uma maioria de porfirinas hidrofílicas, como coproporfirina III e uroporfirina I (126,150). Estudos futuros, com diferentes tempos de cultivo e com concentrações de ALA variadas, são necessários para detalhar a influência desta suplementação no perfil das porfirinas produzidas pelas espécies do complexo *C. diphtheriae*.

A natureza reativa do grupo heme o torna um cofator muito versátil e por isso os patógenos bacterianos dedicam uma extensa maquinaria à sua síntese e aquisição do meio. No entanto, essa reatividade também resulta em toxicidade em concentrações excessivas e por isso as bactérias precisam identificar e escapar dessa ameaça. Sabe-se que o ferro é um importante sinalizador da presença de heme no meio e que suas concentrações regulam a via metabólica das porfirinas a fim de manter a estabilidade nas concentrações deste importante grupo prostético (188).

Em *C. diphtheriae* e *C. pseudotuberculosis* foi descrito que o ferro regula diretamente a expressão de genes envolvidos no metabolismo do heme, como o gene *hmuO*, que codifica a enzima heme oxigenase, enzima responsável pela degradação do heme, liberando ferro para uso metabólico. Em condições de alta disponibilidade de ferro, o repressor DtxR é ativado, reprimindo genes envolvidos na biossíntese de heme, como o *hemA*, que codifica a enzima glutamyl-tRNA redutase, presente no início da via metabólica do grupo heme, para a síntese do ALA a partir da glicina e succinil-CoA. Isso ocorre porque a bactéria prioriza a captação de ferro do ambiente, utilizando heme exógeno quando disponível, ao invés de sintetizá-lo internamente (115,188).

A investigação dos efeitos da adição FeSO_4 na concentração de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ ao cultivo provocou uma diminuição na quantidade de coproporfirina III nas duas amostras estudadas. Um estudo prévio de influência da concentração de ferro na produção de porfirina por *C. diphtheriae* (189) mostra que o aumento da concentração de íons ferro II no meio de cultura diminui a concentração de coproporfirina III para culturas de 7 dias. A adição de ferro também diminui a concentração da uroporfirina I, uma vez que não foi detectada para a amostra ATCC 27010 nessas condições.

A menor quantidade de coproporfirina III produzida pelas cepas nas culturas com adição de ferro, aponta para a diminuição da síntese do grupo heme, corroborando os resultados descritos na literatura (115,152,154,156,188,190).

A adição do H₂O₂ ao cultivo das amostras de *C. diphtheriae* provocou diminuição da quantidade de coproporfirina III produzida. O H₂O₂ é uma espécie química que possui os átomos de oxigênio com elétrons desemparelhados e por isso é muito reativo e causador de estresse oxidativo. Nessas condições as bactérias acionam mecanismos de proteção e genes codificadores de enzimas antioxidantes, como a catalase, a fim de se protegerem contra as espécies reativas de oxigênio (ERO) (191).

Um desses mecanismos de proteção já descritos para procariotos é o sistema OxyR, que detecta os agentes geradores de estresse oxidativo e coordena a resposta apropriada. O OxyR é um homotetrâmero que possui dois resíduos de cisteínas e funciona com base no estado redox desses resíduos, podendo atuar como ativador ou repressor da maquinaria de reação ao estresse oxidativo (92). Sabe-se que o regulon OxyR de *E. coli* compreende genes envolvidos na expressão da catalase e peroxidases (*katE*, *katG* e *ahpCF*) além da biossíntese do heme (*hemH*). A adição de H₂O₂ em culturas de *E. coli* aumentou em até 11 vezes a expressão do gene *hemH*, presente na etapa final da síntese do heme e responsável pela adição de ferro ao anel porfirínico e formação do protoheme na via clássica e coproheme na via não canônica (192–194). O grupo heme é um cofator essencial das peroxidases e catalases e o aumento da demanda da síntese dessas enzimas em resposta ao estresse oxidativo aumenta a necessidade da biossíntese do grupo heme e justifica o aumento da expressão do gene *hemH* e do gene *kat* (catalase).

No entanto, em *C. diphtheriae*, o sistema OxyR atua de maneira distinta em comparação com outras bactérias, como *Escherichia coli*. No caso de *C. diphtheriae*, OxyR funciona como um repressor transcricional, especificamente inibindo a expressão do gene *kata*, que codifica a enzima catalase, mesmo na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). No entanto, em *C. diphtheriae*, a presença de H₂O₂ não estimula a transcrição de *kat*, como ocorre em outros organismos, mas, ao contrário, a repressão é mantida, resultando em uma menor produção de catalase (92,93). Estudos de expressão gênica em *C. glutamicum* para elucidação do funcionamento do sistema OxyR mostram resultados semelhantes (195,196).

Essa regulação incomum pode ser parte de uma estratégia de adaptação ao estresse oxidativo em *C. diphtheriae*. A diminuição na expressão de *kata* na presença de H₂O₂ poderia permitir à bactéria um controle mais refinado sobre suas respostas ao ambiente redox, talvez evitando uma superprodução de catalase que poderia interferir com outros processos celulares dependentes de sinais redox. Além disso, a repressão de *kat* por OxyR pode ser vista como uma

maneira de equilibrar os mecanismos de defesa antioxidante com outras necessidades metabólicas durante a infecção, contribuindo para a sobrevivência e virulência da bactéria em ambientes ricos em EROs (92,93).

Este mecanismo de regulação de OxyR em *C. diphtheriae* destaca a complexidade das respostas bacterianas ao estresse oxidativo e a forma como diferentes patógenos ajustam suas vias metabólicas e defensivas para otimizar a adaptação ao ambiente do hospedeiro.

A diminuição da quantidade de coproporfirina III nas amostras cultivadas com H₂O₂ mostrada neste trabalho pode ser então uma consequência da diminuição da expressão do gene *katA*, diminuindo assim a produção de catalase e consequentemente a demanda pela síntese do grupo heme.

Considerando o outro aspecto deste estudo, que foi a utilização das porfirinas produzidas por *C. diphtheriae* como fotossensibilizador endógeno para fotoinativação bacteriana, os resultados mostram a fototerapia como uma alternativa promissora para o tratamento das infecções causadas por *C. diphtheriae*. As cepas estudadas apresentaram diferentes graus de resposta à fotoinativação, que foi diretamente proporcional à quantidade de coproporfirina III produzida pelas amostras. Esse comportamento é consistente com o observado em outros estudos, nos quais a produção de porfirinas, particularmente uroporfirinas e coproporfirinas, em bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, também resultou em uma redução significativa da viabilidade bacteriana após a exposição à luz fotodinâmica. Em ambos os casos, a eficácia da fotoinativação foi correlacionada diretamente com a quantidade de porfirinas acumuladas intracelularmente (126,155,197).

Para as três amostras de *C. diphtheriae* utilizadas, foi possível obter uma diminuição na fração de sobrevivência das células de aproximadamente 10 vezes após 90 minutos de exposição à luz, inclusive para células sésses em culturas sem adição de ALA. Esse resultado é interessante, especialmente quando comparado a outros trabalhos, nos quais também foi observado que bactérias em biofilmes, tradicionalmente mais resistentes, responderam de forma significativa ao tratamento fotodinâmico. No entanto, a eficácia máxima foi atingida com tempos de incubação mais longos com ALA, levando à maior síntese de porfirinas (126).

A suplementação de ALA ao cultivo de *C. diphtheriae* aumentou significativamente a quantidade de coproporfirina III e reduziu a fração de sobrevivência das bactérias expostas à luz, em alguns casos em mais de 100 vezes, quando comparado às culturas sem adição de ALA. Este efeito é consistente com a literatura, que sugere que a suplementação de ALA leva a uma maior acumulação de porfirinas fotossensibilizadoras. Em estudos anteriores, observou-se um padrão semelhante em bactérias Gram-positivas, onde a adição de ALA aumentou a síntese de

porfirinas e resultou em fotoinativação eficiente, embora, como no presente estudo, não tenha sido possível alcançar a erradicação completa das cepas sob as condições experimentais testadas (126).

Vários autores descreveram anteriormente que a resposta à fotoinativação é marcadamente dependente da cepa, tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Em outros estudos, isso também foi observado, especialmente em *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, bactérias Gram-negativas que, apesar de acumularem grandes quantidades de porfirinas, apresentaram resistência considerável ao tratamento fotodinâmico devido à localização inadequada das porfirinas e à estrutura da membrana externa (123,197,198). Portanto, embora não tenha sido possível erradicar completamente as cepas de *C. diphtheriae* nos tempos de exposição e nas doses de luz estudados, supõe-se que isso possa ser superado com ajustes na fonte de luz, no tempo de exposição e nas condições de cultivo. Além disso, a variação na suscetibilidade das cepas observada aqui também pode estar relacionada a fatores como a composição da membrana celular, os níveis e tipos de porfirinas produzidas e a presença de mecanismos de proteção, como sugerido pelos resultados do presente estudo e de outros trabalhos (126).

CONCLUSÃO

Caracterização química das porfirinas produzidas por diferentes amostras de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*

Os resultados mostraram que as amostras de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* produzem coproporfirina III, uroporfirina I e protoporfirina IX, os três principais intermediários da biossíntese do grupo heme. A caracterização química realizada através de espectrometria de emissão e absorção mostra uma predominância da coproporfirina III entre as amostras estudadas apontando para a utilização da via não canônica de síntese do grupo heme, onde o ferro é inserido no anel da coproporfirina III e em seguida ocorre a descarboxilação do coproheme formando o grupo protoheme.

A Cromatografia Líquida de Alta Resolução evidenciou que as três espécies utilizadas neste estudo produzem o mesmo perfil de porfirinas confirmando a hipótese de que esses organismos compartilham vias metabólicas para a síntese de heme semelhantes.

Quantificação das porfirinas produzidas por diferentes amostras de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*

A quantificação das porfirinas revelou que a quantidade de coproporfirina III é variável entre as espécies e cepas estudadas, não sendo possível correlacionar com a sua origem e outras características importantes como a capacidade de fermentação de sacarose ou produção de toxina diftérica.

Influência da suplementação de Ácido Aminolevulínico na produção de porfirinas por *C. diphtheriae*

O estudo da influência da adição de ácido aminolevulínico (ALA) ao cultivo, na concentração utilizada, mostrou que sua adição provoca o aumento da quantidade de coproporfirina III em cerca de 2 vezes, resultado esperado já que o ALA é o principal precursor desta via metabólica. Não foi observada mudança no padrão de porfirinas produzidas com a adição de ALA nas amostras estudadas.

Avaliação da influência da suplementação de FeSO₄ na produção de porfirinas por *C. diphtheriae*

O ferro desempenhou um papel fundamental na regulação da produção de porfirinas. A adição de FeSO₄ na concentração de 0,2 µg/mL às culturas de *C. diphtheriae* resultou em uma diminuição da produção de coproporfirina III, sugerindo que concentrações elevadas de ferro podem reprimir a síntese de porfirinas, provavelmente devido ao controle regulatório do metabolismo de heme.

Avaliação da influência da concentração de peróxido de hidrogênio na produção de porfirinas por *C. diphtheriae*

A presença de peróxido de hidrogênio nas culturas de *C. diphtheriae* levou a uma diminuição significativa na produção de coproporfirina III. Estes resultados corroboram os achados em outros estudos com amostra de *C. diphtheriae* e *C. glutamicum* cujos resultados mostram a diminuição da expressão dos genes *kat* e *hemH* na presença de H₂O₂, diminuindo a quantidade de catalase e consequente demanda pela síntese do grupo heme. Esse achado sugere que o estresse oxidativo pode regular a via biossintética do heme nessas bactérias, possivelmente como uma resposta protetiva contra o dano oxidativo.

Pesquisa in silico dos genes envolvidos na biossíntese da coproporfirina III por *C. diphtheriae*

As análises in silico das anotações dos genes *HemG*, *HemH* e *HemQ*, envolvidos via metabólica do grupo heme, mostra que há problemas na anotação desses genes, havendo a combinação híbrida de anotações considerando as duas vias metabólicas descritas para o grupo heme (canônica e não canônica). A ausência de estudos in vitro que visem caracterizar quimicamente e funcionalmente essas enzimas para as espécies do complexo *C. diphtheriae* torna as anotações destes genes um desafio ainda maior. Dos 3 genes pesquisados, somente o *HemQ* estava anotado corretamente.

Estudo da utilização das porfirinas utilizadas por *C. diphtheriae* como fotossensibilizador em terapias de fotoinativação

O estudo demonstrou que as porfirinas produzidas por *C. diphtheriae*, em particular a coproporfirina III, têm potencial como fotossensibilizadores eficazes em terapias de fotoinativação. Os experimentos de fotoinativação mostraram uma significativa redução da viabilidade bacteriana, inclusive em biofilme, sob iluminação, confirmando a viabilidade de aplicação dessas porfirinas em tratamentos de fototerapia antimicrobiana. A suplementação de ALA ao cultivo bacteriano, por aumentar a quantidade de porfirinas produzidas pelas amostras, aumenta a eficácia da fotoinativação.

REFERÊNCIAS

1. VENTURA, M.; CANCHAYA, C; TAUCH, A. et al. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007;71(3).
2. BURKOVSKI A. Proteomics of Toxigenic Corynebacteria. Vol. 12, *Proteomes*. 2024.
3. BURKOVSKI A. Cell Envelope of Corynebacteria: Structure and Influence on Pathogenicity. *ISRN Microbiol*. 2013.
4. PARTE, A.C.; CARBASSE, J.S.; MEIER-KOLTHOFF, J.P. et al. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(11).
5. BURKOVSKI, A. *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species: Genomics, pathogenicity and applications. Ed. Springer, USA, 2014.
6. BADELL, E.; HENNART, M.; RODRIGUES, C. et al. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. *Res Microbiol*. 2020;171(3–4).
7. DANGEL, A.; BERGER, A.; RAU, J. et al. *Corynebacterium silvaticum* sp. Nov., a unique group of NTTB Corynebacteria in wild boar and roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(6).
8. CRESTANI, C.; ARCARI, G.; LANDIER, A.; PASSET, V.; GARNIER, D.; BRÉMONT, S. et al. *Corynebacterium ramonii* sp. nov., a novel toxigenic member of the *Corynebacterium diphtheriae* species complex. *Res Microbiol*. 2023;174(7).
9. OTT, L.; MÖLLER, J.; BURKOVSKI, A. Interactions between the Re-Emerging Pathogen *Corynebacterium diphtheriae* and Host Cells. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. 2022.
10. MATTOS-GUARALDI, A.L.; SANTOS, L.S.; VIEIRA, V.V. *Manual of Clinical Microbiology -Coryneform Gram-Positive Rods**. 12th ed. American Society of Microbiology Press; 2023.
11. SHARMA, N.C.; EFSTRATIOU, A.; MOKROUSOV, I. et al. Diphtheria. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1).
12. ENGLISH, P.C. Diphtheria and theories of infectious disease: Centennial appreciation of the critical role of diphtheria in the history of medicine. *Pediatrics*. 1985;76(1).
13. BURKOVSKI, A. Diphtheria and its etiological agents. In: *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species: Genomics, Pathogenicity and Applications. 2014.
14. COORDENAÇÃO-GERAL DO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES DO DEPARTAMENTO DE IMUNIZAÇÃO E DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. *Boletim*

Epidemiológico nº 34 Vol 51 Ago 2020 - Situação epidemiológica da difteria no Brasil, 2010 a 2019 Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/difteria/publicacoes/boletim-epidemiologico-no-34-vol-51-ago-2020.pdf/view>> Acesso em: 09/09/2024

15.LOZHNIKOVA, S.M.; PIROGOV, V.N.; PIRADOV, M.A. et al. Difteriinaia polineïropatiia: kliniko-morfologicheskoe issledovanie. Arkh Patol. 1997;59(2):11–7.

16.HÖFLER, W. Cutaneous Diphtheria. Vol. 30, International Journal of Dermatology. 1991.

17.LIPSKY, B.A.; GOLDBERGER, A.C.; TOMPKINS, L.S. et al. Infections Caused by Nondiphtheria Corynebacteria. Rev Infect Dis. 1982;4(6).

18.BEHRING, E. Ueber ein neues Diphtherieschutzmittel. Dtsch Med Wochenschr. 1913; 19:873–6.

19.HOLMES R.K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. Journal of Infectious Diseases. 2000;181: 156–67.

20.SALEH, A.; QAMAR, S.; TEKIN, A. et al. Vaccine Development Throughout History. Cureus. 2021.

21.MARKINA, S.S.; MAKSIMOVA, N.M.; VITEK, C.R. et al. Diphtheria in the Russian Federation in the 1990s. Journal of Infectious Diseases. 2000;181.

22.DITTMANN, S.; WHARTON, M.; VITEK, C. et al. Successful control of epidemic diphtheria in the states of the former Union of Soviet Socialist Republics: Lessons learned. Journal of Infectious Diseases. 2000;181.

23.VITEK, C.R.; WHARTON, M. Diphtheria in the former Soviet Union: Reemergence of a pandemic disease. Vol. 4, Emerging Infectious Diseases. 1998.

24.CLARKE, K.; MACNEIL, A.; HADLER, S.; SCOTT C, TIWARI TSP, CHERIAN T. Global epidemiology of diphtheria, 2000-2017. Emerg Infect Dis. 2019;25(10):1834–42.

25.DUREAB, F.; AL-SAKKAF, M.; ISMAIL, O. et al. Diphtheria outbreak in Yemen: The impact of conflict on a fragile health system. Confl Health. 2019;13(1).

26.STRAUSS, R.A.; HERRERA-LEON, L.; GUILLÉN, A.C. et al. Molecular and epidemiologic characterization of the diphtheria outbreak in Venezuela. Sci Rep. 2021;11(1).

27.MAHOMED, S.; ARCHARY, M.; MUTEVEDZI, P. et al. An isolated outbreak of diphtheria in South Africa, 2015. Epidemiol Infect. 2017;145(10).

28.EXAVIER, M.M.; PAUL HANNA, M.; MUSCADIN, E. et al. Diphtheria in children in Northern Haiti. J Trop Pediatr. 2019;65(2).

29.WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Health Observatory. Immunization Coverage. Disponível em <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/immunization->

coverage. 2024. Immunization and vaccine-preventable communicable diseases> Acesso em: 09/09/2024

30.WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Health Observatory. Diphtheria - number of reported cases. Disponível em <<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/diphtheria---number-of-reported-cases>> Acesso em: 09/09/2024.

31.MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Situação Epidemiológica - Difteria. Disponível em < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/difteria/situacao-epidemiologica.>> Acesso em 09/09/2024.

32.MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Tabnet. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022 Imunizações DTP - Cobertura - Brasil. Disponível em <<https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>> Acesso em: 09/09/2024.

33.MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Tabnet. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022 DIFTERIA - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil. <<https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>> Acesso em: 09/09/2024.

34.SANTOS, L.S.; SANT'ANNA, L.O.; RAMOS, J.N. et al. Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: Microbiological, clinical and epidemiological aspects. *Epidemiol Infect.* 2015;143(4).

35.HACKER, E.; ANTUNES, C.A.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; *Corynebacterium ulcerans*, an emerging human pathogen. Vol. 11, *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd.; 2016. p. 1191–208.

36.BOTH, L.; COLLINS, S.; DE ZOYSA, A.; et al. Molecular and epidemiological review of toxigenic diphtheria infections in England between 2007 and 2013. Vol. 53, *Journal of Clinical Microbiology*. 2015.

37.DIAS, A.A.; SANTOS, L.S.; SABBADINI, P.S. et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: An emerging zoonosis in Brazil and worldwide. Vol. 45, *Revista de Saude Publica*. 2011.

38.HILLAN, A.; GIBBS, T.; WEAIRE-BUCHANAN, G. et al. Zoonotic transmission of diphtheria toxin-producing *Corynebacterium ulcerans*. *Zoonoses Public Health*. 2024;71(2).

39.SANTOS, A.S.; RAMOS, R.T.; SILVA, A. et al. Searching whole genome sequences for biochemical identification features of emerging and reemerging pathogenic *Corynebacterium* species. *Funct Integr Genomics*. 2018;18(5).

40.PRYGIEL, M.; POLAK, M.; MOSIEJ, E. et al. New *Corynebacterium* Species with the Potential to Produce Diphtheria Toxin. Vol. 11, *Pathogens*. 2022.

41.SELIM, S.A.; MOHAMED, F.H.; HESSAIN, A.M. et al. Immunological characterization of diphtheria toxin recovered from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Saudi J Biol Sci*. 2016;23(2).

- 42.LÖFFLER, F. Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe. Mitt Dem Kais Gesundh. 1884;2:421–99.
- 43.MATTOS-GUARALDI, A.; FORMIGA, L. Hemagglutination pattern of *Corynebacterium diphtheriae*. Rev Microbiol. 1992;23:8–12.
- 44.SANGAL, V.; BURKOVSKI, A.; HUNT, A.C. et al. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing. Infection, Genetics and Evolution. 2014;21.
- 45.DAZAS, M.; BADELL, E.; CARMILEROY, A. et al. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2018;68(12).
- 46.DE SANTIS, A.; SICILIANO, R.F.; SAMPAIO, R.O. et al. Non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infective endocarditis with embolic events: a case report. BMC Infect Dis. 2020;20(1).
- 47.TILEY, S.M; KOCIUBA, K.R.; HERON, L.G. et al. Infective endocarditis due to nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: Report of seven cases and review. Clinical Infectious Diseases. 1993;16(2).
- 48.Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, Altwegg M. An outbreak of nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: Single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users. Clinical Infectious Diseases. 1998;27(5).
- 49.PACHIRAT, O.; KAEWKES, D.; PUSSADHAMMA, B. et al. *Corynebacterium diphtheriae* Native Aortic Valve Endocarditis in a Patient With Prosthetic Mitral Valve: A Rare Presentation . Cardiol Res. 2018;9(5).
- 50.LAI, Y.C.; KHOO, T.S; JULKIPLI, N. et al. A case report of a common clinical condition with an uncommon cause: non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infective endocarditis. Intern Med J. 2020;50(S1).
- 51.MENON, T.; SENTHILKUMAR, S.; PACHAIYAPPAN, P. Native valve endocarditis caused by a non-toxicogenic strain of *Corynebacterium diphtheriae*. Vol. 53, Indian Journal of Pathology and Microbiology. 2010.
- 52.ZASADA, A.A.; ZALESKA, M.; PODLASIN, R.B. et al. The first case of septicemia due to nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland: Case report. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2005;4.
- 53.TREPETA, R.W.; EDBERG, S.C. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: Sustained potential of a classical pathogen. Am J Clin Pathol. 1984;81(5).
- 54.PEIXOTO, R.S.; HACKER, E.; ANTUNES, C.A. et al. Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of osteomyelitis. J Med Microbiol. 2016;65(11).

- 55.ALEXANDER D. Splenic Abscess Caused by *Corynebacterium diphtheriae*. Clin Pediatr (Phila). 1984;23(10).
- 56.BARAKETT, V.; MOREL, G.; LESAGE, D. et al. Septic Arthritis Due to a Nontoxic Strain of *Corynebacterium diphtheriae* subspecies mitis. Clinical Infectious Diseases. 1993;17(3).
- 57.BRETON, D. Non-toxic *Corynebacterium diphtheriae* septicemia with endocarditis in an earlier healthy adult. First case and review of the literature. Presse Med. 1994;23(40).
- 58.PAPPENHEIMER, A.M. Diphtheria toxin: III. A reinvestigation of the effect of iron on toxin and porphyrin production. Journal of Biological Chemistry. 1947;167(1):251–9.
- 59.COLLIER, R.J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: A perspective on progress during the 20th century. Vol. 39, Toxicon. 2001.
- 60.SMITH, W.P.; TAI, P.C.; MURPHY, J.R. et al. Precursor in cotranslational secretion of diphtheria toxin. J Bacteriol. 1980;141(1).
- 61.SCHMITT, M.P.; TALLEY, B.G.; HOLMES, R.K. Characterization of lipoprotein IRP1 from *Corynebacterium diphtheriae*, which is regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and iron. Infect Immun. 1997;65(12).
- 62.DENG, Q.; BARBIERI, J.T. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. Vol. 62, Annual Review of Microbiology. 2008.
- 63.OTT, L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. Vol. 4, AIMS Microbiology. 2018.
- 64.YANAGAWA, R.; HONDA, E. Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. Infect Immun. 1976;13(4).
- 65.MATTOS-GUARALDI A.L.; FORMIGA L.C.D. Hemagglutination pattern of *Corynebacterium diphtheriae*. Revista de Microbiologia. 1992;23(1):8–12.
- 66.BROADWAY, M.M.; ROGERS, E.A.; CHANG, C. et al. Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode. J Bacteriol. 2013;195(16).
- 67.TON-THAT, H.; MARRAFFINI, L.A.; SCHNEEWIND, O. Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. Mol Microbiol. 2004;53(1).
- 68.TON-THAT H, SCHNEEWIND, O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. Mol Microbiol. 2003;50(4).
- 69.HIRATA, R.; SOUZA, S.M.S.; ROCHA, C.M. et al. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. Microb Pathog. 2004;36(3).

- 70.SABBADINI, P.S.; ASSIS, M.C.; TROST, E. et al. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. *Microb Pathog.* 2012;52(3).
- 71.ANTUNES, C.A.; DOS SANTOS, L.S.; HACKER, E. et al. Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology (United Kingdom)*. 2015;161(3).
- 72.MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D.; ANDRADE, A.F.B. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol.* 1999;38(1).
- 73.MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D.; ANDRADE, A.F.B. trans-Sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;168(2).
- 74.MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr Microbiol.* 1998;37(3).
- 75.MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D.; PEREIRA, G.A. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. Vol. 2, *Microbes and Infection*. 2000.
- 76.KHARSEEVA, G.G.; ALIEVA, A.A. Adhesion of *Corynebacterium diphtheriae*: the role of surface structures and formation mechanism. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii.* 2014.
- 77.HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. Vol. 2, *Nature Reviews Microbiology*. 2004.
- 78.COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E. et al. Microbial biofilms. Vol. 49, *Annual Review of Microbiology*. 1995.
- 79.GOMES, D.L.R.; MARTINS, C.A.S.; FARIA, L.M.D. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol.* 2009;58:1419–27.
- 80.MATTOS-GUARALDI, A.L.; GOMES, D.L.R.; PEIXOTO, R.S. et al. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *J Med Microbiol.* 2013;62:754–60.
- 81.KHARSEEVA GG, ALIEVA AA, CHEPUSOVA A V., ALUTINA EL, SYLKA OI. *Corynebacterium diphtheria*, adhesion, type and biofilm cultures. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika.* 2019;18(3).
- 82.OZDEMIR, S.; AYDOGAN, O.; KOKSAL CAKIRLAR, F. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of non-diphtheriae *Corynebacterium* strains isolated from blood cultures: First report from turkey. *Medeni Med J.* 2021;36(2).

- 83.SUN, W.; MA, L.; LI, Y. et al. In vitro Studies of Non-Diphtheriae *Corynebacterium* Isolates on Antimicrobial Susceptibilities, Drug Resistance Mechanisms, and Biofilm Formation Capabilities. *Infect Drug Resist.* 2022;15.
- 84.BERTUCCINI, L.; BALDASSARR, I. L.; VON HUNOLSTEIN, C. Internalization of non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. *Microb Pathog.* 2004;37(3).
- 85.PEIXOTO, R.S.; PEREIRA, G.A.; DOS SANTOS, L.S et al. Invasion of endothelial cells and arthritogenic potential of endocarditis-associated *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology (United Kingdom)*. 2014;160(PART 3).
- 86.HIRATA, R.; NAPOLEÃO, F.; MONTEIRO-LEAL, L.H. et al. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;215(1).
- 87.DOS SANTOS, C.S.; DOS SANTOS, L.S.; DE SOUZA, M.C. et al. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxicogenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. *Microbiol Immunol.* 2010;54(1).
- 88.OTT, L.; HÖLLER, M.; GERLACH, R.G. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2010;10.
- 89.CRUVINEL, W.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol.* 2010;50(4).
- 90.HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-Derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. *Environ Health Perspect.* 1994;102.
- 91.DOS SANTOS, L.S.; ANTUNES, C.A.; DOS SANTOS, C.S. et al. *Corynebacterium diphtheriae* putative tellurite-resistance protein (CDCE8392_0813) contributes to the intracellular survival in human epithelial cells and lethality of *Caenorhabditis elegans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Aug 1;110(5):662–8.
- 92.CAPPELLI, E.A.; CUCINELLI, A.; SIMPSON-LOUREDO, L. et al. Insights of OxyR role in mechanisms of host–pathogen interaction of *Corynebacterium diphtheriae*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2022;53(2).
- 93.KIM, J.S.; HOLMES, R.K. Characterization of OxyR as a negative transcriptional regulator that represses catalase production in *Corynebacterium diphtheriae*. *PLoS One.* 2012 Mar 16;7(3).
- 94.GILBERT, R.; STEWART, F. *Corynebacterium ulcerans*: a pathogenic microorganism resembling *Corynebacterium diphtheriae*. *J Lab Clin Med.* 1927;12:756–61.

- 95.HART, R.J.C. *Corynebacterium ulcerans* in humans and cattle in North Devon. Journal of Hygiene. 1984;92(2).
- 96.BOSTOCK, A.D.; GILBERT, F.R.; LEWIS, D. et al. *Corynebacterium ulcerans* infection associated with untreated milk. Journal of Infection. 1984;9(3).
- 97.GOWER, C.M.; SCOBIE, A.; FRY, N.K. et al. The changing epidemiology of diphtheria in the United Kingdom, 2009 to 2017. Vol. 25, Eurosurveillance. 2020.
- 98.WAGNER, K.S.; WHITE, J.M.; CROWCROFT, N.S.; et al. Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: The increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. Vol. 138, Epidemiology and Infection. 2010.
- 99.YAMAMOTO A, HIFUMI T, ATO M, et al. Clinical Characteristics of *Corynebacterium ulcerans* Infection, Japan. Emerg Infect Dis. 2023;29(8).
100. Prygiel M, Mosiej E, Polak M, Krysztopa-Grzybowska K, Wdowiak K, Formińska K, et al. Challenges of Diphtheria Toxin Detection. Vol. 16, Toxins. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
- 101.MEINEL, D.M.; MARGOS, G.; KONRAD, R. et al. Next generation sequencing analysis of nine *Corynebacterium ulcerans* isolates reveals zoonotic transmission and a novel putative diphtheria toxin-encoding pathogenicity island. Genome Med. 2014;6(11).
102. WEERASEKERA, D.; MÖLLER, J.; KRANER, M. et al. Beyond diphtheria toxin: Cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. Microbiology (United Kingdom). 2019;165(8).
103. SIMPSON-LOURÊDO, L.; SILVA , C.M.F.; HACKER, E. et al. Detection and virulence potential of a phospholipase D-negative *Corynebacterium ulcerans* from a concurrent diphtheria and infectious mononucleosis case. International Journal of General and Molecular Microbiology. 2019;112(7).
104. HODGSON, A.L.M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. Infect Immun. 1992;60(7).
105. MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis* is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. Microbiology (N Y). 2007;153(7).
- 106.YOZWIAK, M.L.; SONGER, J.G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. Am J Vet Res. 1993;54(3).
- 107.MCNAMARA, P.J.; BRADLEY, G.A.; SONGER, J.G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Mol Microbiol. 1994;12(6).

108. TROST, E.; AL-DILAIMI, A.; PAPAVALIIOU, P. et al. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. BMC Genomics. 2011;12.
109. DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vol. 37, Veterinary Research. 2006.
110. GOODFELLOW, M.; JONES, A.L. Corynebacteriales ord. nov. . In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015.
111. BERNARD, A.L.; FUNKE, G. *Corynebacterium*. In: Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria (Online). 2015. p. 1–70.
112. SELIM S.A. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. Vol. 48, Journal of Veterinary Medicine, Series B. 2001.
113. SOARES, S.C.; SILVA, A.; TROST, E. et al. The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar ovis and equi Strains. PLoS One. 2013;8(1).
114. GUIMARÃES, A.S.; CARMO, F.B.; HEINEMANN, M.B. et al. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. BMC Vet Res. 2011;7.
115. IBRAIM, I.C.; PARISE, M.T.D.; PARISE, D. et al. Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation. BMC Genomics. 2019;20(1).
116. JOLLY, R.D. Some Observations on Surface Lipids of Virulent and Attenuated Strains of *Corynebacterium ovis*. Journal of Applied Bacteriology. 1966;29(1).
117. HARD, G.C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. Infect Immun. 1975;12(6).
118. TASHJIAN, J.J.; CAMPBELL, L. S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopic study. Am J Vet Res. 1983 Apr;44(4):690–3.
119. JOLLY, R.D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. N Z Vet J. 1965;13(6).
120. FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. Bull World Health Organ. 2001;79(8).
121. GRZYBOWSKI, A. PIETRZAK, K. From patient to discoverer-Niels Ryberg Finsen (1860-1904) - the founder of phototherapy in dermatology. Clin Dermatol. 2012;30(4).
122. YAN, E.; KWEK, G.; QING, N.S. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Remote Eradication of Bacteria. Vol. 88, ChemPlusChem. 2023.

- 123.HAMBLIN, M.R.; VIVEIROS, J.; YANG, C. Ahmadi A, Ganz RA, Tolkoff MJ. *Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7).
- 124.DE SOUSA, D.L.; LIMA, R.A.; ZANIN, I.C. et al. Effect of twice-daily blue light treatment on matrix-rich biofilm development. *PLoS One.* 2015;10(7).
- 125.CIEPLIK F, SPÄTH A, LEIBL C, Gollmer A, Regensburger J, Tabenski L, et al. Blue light kills *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* due to its endogenous photosensitizers. *Clin Oral Investig.* 2014;18(7).
126. BOHM, G.C.; GÁNDARA, L.; DI VENOSA, G.; et al. Photodynamic inactivation mediated by 5-aminolevulinic acid of bacteria in planktonic and biofilm forms. *Biochem Pharmacol.* 2020 Jul 1;177.
- 127.BATTISTI, A.; MORICI, P.; GHETTI F. et al, Spectroscopic characterization and fluorescence imaging of *Helicobacter pylori* endogenous porphyrins. *Biophys Chem.* 2017 Oct 1;229:19–24.
- 128.BATTISTI, A.; MORICI, P.; SIGNORE, G. et al. Compositional analysis of endogenous porphyrins from *Helicobacter pylori*. *Biophys Chem.* 2017 Oct 1;229:25–30.
- 129.HESSLING, M.; SPELLERBERG, B.; HOENES. K. Photoinactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wavelengths - A review on existing data. Vol. 364, *FEMS Microbiology Letters.* Oxford University Press; 2017.
- 130.ELMAN, M.; SLATKINE, M.; HARTH, Y. The effective treatment of acne vulgaris by a high-intensity, narrow band 405-420 nm light source. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy.* 2003;5(2).
- 131.KAWADA, A.; ARAGANE, Y.; KAMEYAMA, H. et al.. Acne phototherapy with a high-intensity, enhanced, narrow-band, blue light source: An open study and in vitro investigation. *J Dermatol Sci.* 2002;30(2).
- 132.PAPAGEORGIOU, P.; KATSAMBAS, A.; CHU, A.C. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. *British Journal of Dermatology.* 2000;142(5).
- 133.LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; GEDANKEN, A. et al. Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: Implication for wound healing. *Lasers Surg Med.* 2010;42(6).
- 134.DA, I T.; GUPTA, A.; HUANG, Y.Y. et al. Blue light rescues mice from potentially fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn infection: Efficacy, safety, and mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(3).
- 135.GANZ, R.A.; VIVEIROS, J.; AHMAD, A. et al. *Helicobacter pylori* in patients can be killed by visible light. *Lasers Surg Med.* 2005;36(4).

- 136.LEMBO, A.J.; GANZ, R.A.; SHETH, S; et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection with intra-gastric violet light phototherapy: A pilot clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2009;41(5).
- 137.ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de Química - Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5a. edição. Cengage. Porto Alegre-RS: Editora Bookman; 2012. 3–7 p.
- 138.MILGRON, L.R. The Colours of Life An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds. Oxford University Press; 1997.
- 139.DOLPHIN, D.; BUDZIKIEWICZ, H. The Porphyrins - vol III - Physical Chemistry. In: David D, editor. Elsevier; 1978. p. 395–465.
- 140.RAJORA, M.A.; LOU, J.W.H.; ZHENG, G. Advancing porphyrin's biomedical utility: Via supramolecular chemistry. *Chem Soc Rev.* 2017;46(21):6433–69.
- 141.KIM, S.; CHEN, J.; GINDULYTE, A. et al. *Nucleic Acids Res.* 2023. PubChem 2023 update.
- 142.DELANO SCIENTIFIC. The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific: Palo Alto, CA. <http://www.pymol.org>; 2024.
- 143.GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins. *J Mol Spectrosc.* 1961;6:138–63.
- 144.SMITH, K.M. Porphyrins. In: McCleverty JA, Meyer. T. J., editors. *Comprehensive Coordination Chemistry II.* Pergamon; 2003. p. 493–506.
- 145.LIM, C.K.; LI, F.; PETERS, T.J. Review high-performance liquid chromatography of porphyrins. Vol. 429, *Journal of Chromatography.* 1988.
- 146.RIMINGTON, C. Spectral-absorption coefficients of some porphyrins in the Soret-band region. *Biochemical Journal.* 1960;75(3).
- 147.PARKER, V.C.A. Photoluminescence of Solutions. *Angewandte Chemie.* 1968;81(23).
- 148.UTTAMLAL, M.; HOLMES-SMITH, A. The excitation wavelength dependent fluorescence of porphyrins. *Chem Phys Lett.* 2008;454(4–6).
- 149.OMAR, G.S.M. Killing of organisms responsible for wound infections using a light-activated antimicrobial agent. PhD Thesis. 2010;
- 150.AMOS-TAUTUA, B.M.; SONGCA, S.P.; OLUWAFEMI, O.S. Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. *Molecules.* 2019;24(13).
- 151.FYRESTAM, J.; BJURSHAMMAR, N.; PAULSSON, E. et al. Influence of culture conditions on porphyrin production in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Mar 1;17:115–23.
- 152.DAILEY, H.A.; DAILEY, T.A.; GERDES, S.; JAHN, D. et al. Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2017 Mar;81(1).

- 153.CANDELARESI, M.; GUMIERO, A.; ADAMCZYK, K. et al. A structural and dynamic investigation of the inhibition of catalase by nitric oxide. *Org Biomol Chem*. 2013;11(44).
- 154.CHOBY, J.E.; SKAAR, E.P. Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *J Mol Biol*. 2016;428(17):3408–28.
- 155.NITZAN, Y.; SALMON-DIVON, M.; SHPOREN, E. et al. ALA induced photodynamic effects on Gram positive and negative bacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004;3(5):430–5.
- 156.DAILEY, H.A.; GERDES, S.; DAILEY, T.A. et al. Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(7):2210–5.
- 157.DAILEY, H.; GERDES, S.; DAILEY, T. et al. Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(7):2210–5.
- 158.FISCHER, H.; FINK, H. Über Koproporphyrinsynthese durch Hefe und ihre Beeinflussung III. *Physiol Chem*. 1925;150:243–60.
- 159.COULTER, C.B.; STONE, F.M. The occurrence of porphyrins in cultures of *C. diphtheriae*. *J Gen Physiol*. 1931;May:583–96.
- 160.GRAY, C.H.; HOLT, L.B. The isolation of coproporphyrin III from *Corynebacterium diphtheriae* culture filtrates. *Biochem J*. 1948;43(2):191–3.
- 161.FORMIGA, L.D.; CAMELLO, T.C.; MATTOS-GUARALDI, A. et al. Teste de fluorescência e pesquisa da atividade pirazina-carboxilamidase (PYZ) na identificação do bacilo diftérico atoxinogênico. *Revista de Microbiologia*. 1983;14:172–3.
- 162.RUSSELL, L.M.; CRYZ, S.J.; HOLMES, R.K. Genetic and biochemical evidence for a siderophore-dependent iron transport system in *Corynebacterium diphtheriae*. Vol. 45, *Infect. Immun*. 1984.
- 163.WOLLENBERG, M.S.; CLAESEN, J.; ESCAPA, I.F. et al. *Propionibacterium* produced coproporphyrin III induces *Staphylococcus aureus* aggregation and biofilm formation. *mBio*. 2014;5(4).
- 164.BARNARD, E.; JOHNSON, T.; NGO, T. et al. Porphyrin Production and Regulation in Cutaneous *Propionibacteria*. *mSphere*. 2020 Feb 26;5(1).
- 165.JONES, L.M.; DUNHAM, D.; RENNIE, M.Y. et al. In vitro detection of porphyrin-producing wound bacteria with real-time fluorescence imaging. *Future Microbiol*. 2020 Mar 1;15(5):319–32.
- 166.TAYLOR, C.; DUFFY, L.K.; PLUMLEY, F.G. et al. Comparison of spectrofluorometric and HPLC methods for the characterization of fecal porphyrins in river otters. *Environ Res*. 2000;84(1):56–63.

167. CLARKE, G. D. The effect of ferrous ions on the formation of toxin and porphyrin by a strain of *Corynebacterium diphtheriae*. J Gen Microbiol. 1958;18:698–707.
168. MAZZOLA, P.G.; JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.D.L. et al. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;45(2).
169. BJERKAN, G.; WITSO, E.; BERGH, K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. Acta Orthop. 2009;80(2):245–50.
170. KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. Porphyrin metabolism - *Corynebacterium diphtheriae* NCTC11397. 2024.
171. TRUELOVE, S.A.; KEEGAN, L.T.; MOSS, W.J. et al. Clinical and epidemiological aspects of diphtheria: A systematic review and pooled analysis. Clinical Infectious Diseases. 2020;71(1):89–97.
172. HENNART, M.; PANUNZI, L.G.; RODRIGUES, C. et al. et al. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. Genome Med. 2020;12(1).
173. FORDE, B.M.; HENDERSON, A.; PLAYFORD, E.G. et al. Fatal Respiratory Diphtheria Caused by β -Lactam-Resistant *Corynebacterium diphtheriae*. Clinical Infectious Diseases. 2021;73(11).
174. BENTON, C.M.; LIM, C.K. Liquid chromatography and mass spectrometry of haem biosynthetic intermediates: A review. Vol. 26, Biomedical Chromatography. John Wiley and Sons Ltd; 2012. p. 1009–23.
175. FYRESTAM, J.; ÖSTMAN, C. Determination of heme in microorganisms using HPLC-MS/MS and cobalt (III) protoporphyrin IX inhibition of heme acquisition in *Escherichia coli*. Anal Bioanal Chem. 2017 Dec 1;409(30):6999–7010.
176. DANTON, M.; LIM, C.K.; DANTON, M. et al. Porphyrin profiles in blood, urine and faeces by HPLC/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2006;20:612–21.
177. FYRESTAM, J.; BJURSHAMMAR, N.; PAULSSON, E. et al. Determination of porphyrins in oral bacteria by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2015;407(23):7013–23.
178. DAILEY, T.; MEISSNER, P.; DAILEY, H. Expression of a cloned protoporphyrinogen oxidase. Journal of Biological Chemistry. 1994 Jan 14;269(2):813–5.
179. PATIL, G.; MICHLITS, H.; FURTMÜLLER, P.G. et al. Reactivity of Coproheme Decarboxylase with Monovinyl, Monopropionate Deuteroheme. Biomolecules. 2023;13(6).
180. SEBASTIANI, F.; DALI, A.; ALONSO DE ARMIÑO, D.J. et al. The role of the distal cavity in carbon monoxide stabilization in the coproheme decarboxylase enzyme from *C. diphtheriae*. J Inorg Biochem. 2023;245.

181. SEBASTIANI, F.; BARONI, C.; PATIL, G. et al. The Role of the Hydrogen Bond Network in Maintaining Heme Pocket Stability and Protein Function Specificity of *C. diphtheriae* Coproheme Decarboxylase. *Biomolecules*. 2023;13(2).
182. SEBASTIANI, F.; NICCOLI, C.; MICHLITS, H.; et al. Spectroscopic evidence of the effect of hydrogen peroxide excess on the coproheme decarboxylase from actinobacterial *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2022;53(5).
183. MICHLITS, H.; VALENTE, N.; MLYNEK, G. Hofbauer S. Initial Steps to Engineer Coproheme Decarboxylase to Obtain Stereospecific Monovinyl, Monopropionyl Deuterohemes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;9.
184. SEBASTIANI, F.; RISORTI, R.; NICCOLI, C. et al. An active site at work – the role of key residues in *C. diphtheriae* coproheme decarboxylase. *J Inorg Biochem*. 2022;229.
185. SEBASTIANI F, MICHLITS H, LIER B, Becucci M, Furtmüller PG, Oostenbrink C, et al. Reaction intermediate rotation during the decarboxylation of coproheme to heme b in *C. diphtheriae*. *Biophys J*. 2021;120(17).
186. MICHLITS H, LIER B, PFANZAGL V, Djinović-Carugo K, Furtmüller PG, Oostenbrink C, et al. Actinobacterial Coproheme Decarboxylases Use Histidine as a Distal Base to Promote Compound i Formation. *ACS Catal*. 2020;10(10).
187. DIETEL W; POTTIER R; PFISTER W; Schleier P; Zinner K. 5-Aminolaevulinic acid (ALA) induced formation of different fluorescent porphyrins: A study of the biosynthesis of porphyrins by bacteria of the human digestive tract. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(1).
188. BIBB, L.A.; KUNKLE, C.A.; SCHMITT, M.P. The ChrA-ChrS and HrrA-HrrS signal transduction systems are required for activation of the hmuO promoter and repression of the hemA promoter in *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun*. 2007;75(5).
189. CLARKE, B.G. The Effect of Ferrous Ions on the Formation of Toxin and Porphyrin by a Strain of *Corynebacterium diphtheriae*. Vol. 18; *J. gen. Microbiol*. 1958.
190. BENSON, D.R.; RIVERA, M. Heme uptake and metabolism in Bacteria. *Met Ions Life Sci*. 2013;12:279–332.
191. EZRATY, B.; GENNARIS, A.; BARRAS, F. et al. Oxidative stress; protein damage and repair in bacteria. Vol. 15; *Nature Reviews Microbiology*. 2017.
192. LIU, Y.; BAUER, S.C.; IMLAY, J.A. The YaaA protein of the *Escherichia coli* OxyR regulon lessens hydrogen peroxide toxicity by diminishing the amount of intracellular unincorporated iron. *J Bacteriol*. 2011;193(9).
193. GUPTA, A.; IMLAY, J.A. *Escherichia coli* induces DNA repair enzymes to protect itself from low-grade hydrogen peroxide stress. *Mol Microbiol*. 2022;117(4).
194. CHIANG, S.M.; SCHELLHORN, H.E. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. Vol. 525; *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012.

195. TERAMOTO, H.; INUI, M.; YUKAWA, H. OxyR acts as a transcriptional repressor of hydrogen peroxide-inducible antioxidant genes in *Corynebacterium glutamicum*. FEBS Journal. 2013;280(14).

196. MILSE, J.; PETR, I. K.; RÜCKERT, C.; KALINOWSKI, J. Transcriptional response of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 to hydrogen peroxide stress and characterization of the OxyR regulon. J Biotechnol. 2014;190.

197. NITZAN, Y.; GUTTERMAN, M.; MALIK, Z.; EHRENBERG, B. Inactivation of Gram-Negative Bacteria By Photosensitized Porphyrins. Photochem Photobiol. 1992;55(1):89–96.

198. KIM, H.; LEE, Y.R.; JEONG, H. et al. Photodynamic and photothermal therapies for bacterial infection treatment. Smart Molecules. 2023;1(1).

ANEXO A – Aprovação no comitê de ética e pesquisa

O presente projeto de pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Pedro Ernesto de acordo com o parecer número 3.728.795; de 27/11/2019 registrado na Plataforma Brasil.

Público
Pesquisador
Alterar Meus Dados
GABRIELA BATISTA ALVES - |V4.0.7_RC03
Sua sessão expira em: 38min 01

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

— DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: Mecanismos de produção e o potencial de virulência da coproporfirina III em amostras de *Corynebacterium diphtheriae* de origens diversas
Pesquisador Responsável: Ana Luiza de Mattos Guaraldi
Contato Público: Ana Luiza de Mattos Guaraldi
Condições de saúde ou problemas estudados:
Descritores CID - Gerais:
Descritores CID - Específicos:
Descritores CID - da Intervenção:
Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 27/11/2019



— DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: Faculdade de Ciências Médicas
Cidade: RIO DE JANEIRO

— DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5259 - Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - HUPE-UERJ
Endereço: Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multusuário - 2º andar/sala nº 28 - prédio anexo ao HUPE.
Telefone: (21)2066-6253
E-mail: cep@hupe.uerj.br

— CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

— CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

[Voltar](#)

ANEXO B – Comprovação de submissão do 1º. Artigo científico

Chemistry and Biodiversity**Porphyrin profile and levels produced by *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated from cases of diphtheria and invasive infections**

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	cbdv.202401011
Article Type:	Research Article
Corresponding Author:	Ana Luiza Mattos-Guaraldi Rio de Janeiro State University Rio de Janeiro, BRAZIL
Corresponding Author E-Mail:	aguaraldi@gmail.com
Other Authors:	Gabriela Batista Alves, MSc. Monica Regina da Costa Marques Calderari, Dr. Eduardo Nunes da Fonseca, MSc. Louisy Sanches Santos, Dr.
Keywords:	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> , Fluorescence spectroscopy, Mass spectrometry, Porphyrins, UV/Vis spectroscopy
Manuscript Classifications:	Biochemistry and Chemical Biology
Suggested Reviewers:	Vyacheslav Melnikov Bavarian Health and Food Safety Authority slavawho1@gmail.com Andreas Burkovski Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg andreas.burkovski@fau.de Huiying Li University of California Los Angeles huiying@mednet.ucla.edu
Opposed Reviewers:	
Abstract:	<p>Porphyryns are intermediate metabolites in the biosynthesis of vital molecules, including heme, cobalamin, and chlorophyll. Bacterial porphyryns are known to be proinflammatory and have been associated with biofilm production. This study investigated porphyryn production by strains of <i>Corynebacterium diphtheriae</i> using emission spectroscopy, high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, a diode array detector, and mass spectrometry. Emission spectroscopy revealed characteristic porphyryn emission spectra in all strains, with coproporphyrin III predominating. Qualitative analysis via different chromatography methods revealed identified coproporphyrin III, uroporphyrin I, and protoporphyrin IX in all the strains. Quantitative analysis revealed strain-dependent coproporphyrin III production. More studies are needed to investigate the relationship between porphyryn production and the virulence potential of <i>Corynebacterium diphtheriae</i>.</p>
Author Comments:	<p>To Chemistry & Biodiversity Doctor Meghan Lucas</p> <p>Dear Editor-in-Chief, We are sending the manuscript entitled "Porphyryn profile and levels produced by <i>Corynebacterium diphtheriae</i> strains isolated from cases of diphtheria and invasive infections" for publication in the Chemistry & Biodiversity under the category of Research Papers. In this work we carried out the chemical characterization and quantification of porphyryns produced by <i>Corynebacterium diphtheriae</i> using emission spectroscopy and high-performance liquid chromatography with different detectors. In addition to provide some relevant information about the infections caused by <i>Corynebacterium diphtheriae</i>, we discussed the metabolism of the heme group and its possible</p>

	<p>relationship with the virulence mechanisms of this important pathogen. We guarantee that the manuscript describes original research and is not published by another scientific journal. All the authors agreed to the submission and to the order in which their names are listed in the byline in addition to the fact that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process.</p> <p>The manuscript does not contain experiments using animals, does not contain human studies and was registered (CAAE 25825119.1.0000.5259) and approved by the Research Ethics Committee of Pedro Ernesto University Hospital/Rio de Janeiro State University. The consent to participate was not required because the investigated isolate was taken as a part of standard care (diagnostic purposes).</p> <p>The authors also declare that they have no conflicts of interest.</p> <p>Sincerely, Dr. Ana Luiza de Mattos Guaraldi ORCID 0000-0003-2522-0416</p> <hr/> <p>Corresponding author: Dr Ana Luiza de Mattos Guaraldi. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar. Vila Isabel, RJ, Brasil, CEP 20 551-030. Phone: +55 21 2868 8280. E-mail: aguaraldi@gmail.com</p>
Section/Category:	
Additional Information:	
Question	Response
Dedication	
<p>This journal supports data sharing and has adopted an Expects Data Sharing policy:</p> <ul style="list-style-type: none"> - You are encouraged to make your data available, for instance in a public repository. - Your article must include a Data Availability Statement; please select a template from the options below or provide a custom Statement. - When data is openly available, please provide the name and URL/DOI of the repository and cite the data in the references section of your manuscript. <p>Is your data available?</p>	<p>Data available on request from the authors</p>
<p>Please confirm the selected template for your Data Availability Statement below, which will be published as part of your article if it is accepted for publication.</p>	<p>The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.</p>

ANEXO C - formato final do 1^o artigo científico aceito



Accepted Article

Porphyrin Production by *Corynebacterium diphtheriae* Strains from Clinical Isolates

Gabriela Batista Alves,^[a, c] Mônica Regina da Costa Marques Calderari,^[b]
Eduardo Nunes da Fonseca,^[b] Louisy Sanches dos Santos,^[a] and
Ana Luiza de Mattos-Guaraldi^{*[a]}

Porphyrins are intermediate metabolites involved in the biosynthesis of vital molecules, including heme, cobalamin, and chlorophyll. Bacterial porphyrins are known to be proinflammatory and are associated with biofilm formation. This study investigated porphyrin production by strains of *Corynebacterium diphtheriae* using emission spectroscopy, high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, diode array detector, and mass spectrometry. Emission spectroscopy

revealed characteristic porphyrin emission spectra in all strains, with coproporphyrin III predominating. Qualitative analysis by different chromatographic methods identified coproporphyrin III, uroporphyrin I, and protoporphyrin IX in all strains. Quantitative analysis revealed strain-dependent coproporphyrin III production. Further studies are required to investigate the relationship between porphyrin production and the virulence potential of *Corynebacterium diphtheriae*.

Introduction

Corynebacterium diphtheriae is the main causative agent of classic respiratory and cutaneous diphtheria, a toxemic disease whose prevention depends on the implementation of effective immunization programs using diphtheria toxoid vaccines. In recent decades, the increasing number of atypical infections caused by non-diphtheria toxin (DT) producing and DT-producing *C. diphtheriae* strains in partially or non-immunized individuals (adults and children) has become a matter of concern, including invasive infections such as endocarditis and pneumonia.^[1–4] Despite all relevant knowledge acquired in different aspects concerning clinical, epidemiological, laboratorial, and pathogenic properties over the last years, eradication of *C. diphtheriae* diseases has not yet been achieved.

Reported studies that first described the production of porphyrins by microorganisms date back to the 1920s.^[5] Porphyrin is a class of cyclic organic compounds consisting of four pyrrole rings connected by a methylene group.

These molecules are part of the heme group metabolic pathway and are derived from a common precursor, 5-aminolevulinic acid (ALA), and their synthesis follows a common pathway between prokaryotes and eukaryotes for several steps.^[6,7] The production of porphyrins is regulated by the ALA

concentration and high levels of exogenously added ALA may lead to the accumulation and secretion of porphyrins. The heme group is involved in almost all major metabolic and respiratory processes found in biological systems. For a long time, it has been accepted that eukaryotes and prokaryotes use the same metabolic intermediates in their heme synthesis pathways, with protoporphyrin being the final intermediate into which iron is inserted to produce protoheme. However, recent years studies have shown that in Firmicutes and Actinobacteria iron is inserted into coproporphyrin III, instead of protoporphyrin as an intermediate as observed in other prokaryotes and eukaryotes.^[8,9]

From a prokaryotic perspective, the ability to make modified tetrapyrroles enriches metabolic capacity and provides ecological advantages, allowing the host to rapidly switch between environmental conditions and these differences make heme biosynthesis a potential target for new antimicrobial compounds.^[9–12]

Most human pathogens have the capacity to synthesizing the heme group. However, the contribution of heme synthesis to the pathogenesis of bacterial pathogens is little studied. In *S. aureus*, heme biosynthesis is essential for causing disease. Mutants lacking heme biosynthesis genes show significant defects in colonization and virulence. This highlights the insufficiency of heme acquisition alone for organ colonization. Additionally, other pathogens identified through transposon-sequencing and molecular docking studies studies also require heme biosynthesis for effective infection.^[13–20]

The first research report on porphyrins produced by *C. diphtheriae* observed the presence of red and fluorescent pigments in the filtrates from cultures of this microorganism.^[21] Subsequently, the influence of iron concentration in the culture medium on porphyrin production by *C. diphtheriae* was verified.^[22] Additional analyses of the absorption bands of diphtherial porphyrins suggested that *C. diphtheriae* strains produce 98–99% coproporphyrin III, in addition to uroporphyrin

[a] G. B. Alves, L. S. dos Santos, A. L. de Mattos-Guaraldi
Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Rio de Janeiro State University, Av. 28 de Setembro, 87 – Fundos, 3º andar, Vila Isabel, RJ CEP 20 551–030, Brazil
E-mail: aguaraldi@gmail.com

[b] M. R. d. C. M. Calderari, E. N. da Fonseca
Analytical Center Fernanda Coutinho, Rio de Janeiro State University, R. São Francisco Xavier, 524 – Maracanã, Rio de Janeiro, RJ CEP 20550–013, Brazil

[c] G. B. Alves
General and Inorganic Chemistry Laboratory, Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro, Rua Senador Furtado, 121, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ CEP 20270–021, Brazil

I and one other uncharacterized type.^[23] In the 1980's, fluorescence assays by using Wood's Lamp based on porphyrin production were reported by our research group as a novel approach for the routine screening of *C. diphtheriae*.^[24]

Studies on the use of siderophores by *C. diphtheriae* as a virulence factor showed a relationship between the concentration of siderophores and the porphyrins produced by bacterial strains, indicating its role as a cofactor of iron-dependent enzymes.^[25]

To date, there is limited knowledge regarding porphyrins and the metabolism of heme group in *C. diphtheriae*. Additional qualitative and quantitative studies are necessary to characterize these porphyrins, to elucidate this important metabolic pathway, and to shed light on the virulence factors used by *C. diphtheriae* strains involved in different types of infections worldwide, independent of DT production.

The aim of this study was to investigate the presence and levels of the main intermediates in heme group biosynthesis (coproporphyrin III, uroporphyrin I and protoporphyrin IX) produced by *C. diphtheriae* strains without and with ALA supplementation using emission spectrometry and high-resolution chromatography coupled with fluorescence, UV absorption and mass spectrometry detectors.

Results and Discussion

Effect of 5-Aminolevulinic Acid Supplementation on Porphyrin Production

The effects of ALA supplementation on porphyrin production was evaluated in ATCC 27010 and HC04 strains. The strains were grown under the same conditions in media without ALA supplementation and with ALA supplementation at a concentration of 2.0 mM. Porphyrin extracts were analyzed by emission spectroscopy, HPLC-MS and HPLC-DAD.

The use of emission spectroscopy demonstrated the presence of porphyrins in all two *C. diphtheriae* strains tested and in both cultivation conditions, with similar and characteristic emission spectra with two emission peaks in the region of 600 nm and 650 nm, as shown in Figure 1. The addition of ALA enhanced the fluorescence intensity of the emission peaks, demonstrating a significant increase of porphyrin production by *C. diphtheriae* tested strains with the addition of ALA to culture, however the wavelength of the emission peaks did not change (Table 1).

The HPLC-MS analysis detected the presence of m/z ratio signals for coproporphyrin III ($[M+H]^+ = 655$), uroporphyrin I ($[M+H]^+ = 830$), and protoporphyrin IX ($[M+H]^+ = 563$) in all two strains of *C. diphtheriae* tested and in both cultivation conditions as shown in Table 2.

Analysis of porphyrin extracts from *C. diphtheriae* strains by HPLC-DAD confirmed the presence of coproporphyrin III and uroporphyrin I in all two of *C. diphtheriae* strains tested and in both cultivation conditions. Protoporphyrin IX was not detected in any of strains as shown in Table 3.

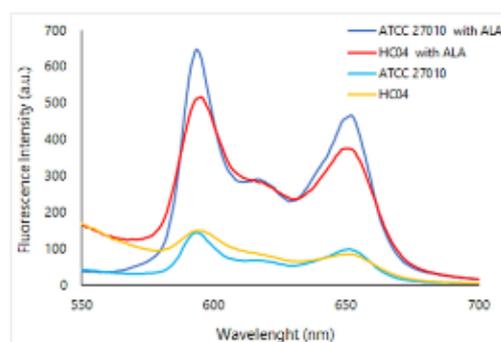


Figure 1. Emission spectra of porphyrin extracts in HCl 5% of *C. diphtheriae* ATCC 27010 and HC04 strains cultured in the absence and presence of ALA (2 mM). Emission spectra were obtained at an excitation wavelength of 399 nm and an emission wavelength of 591 nm.

Table 1. Emission peak wavelengths of porphyrin standards in HCl 5% and porphyrin extract from *C. diphtheriae* strains in HCl 5%. The strains were cultivated in the absence and presence of ALA (2 mM). The emission spectra were obtained at an excitation wavelength of 399 nm and an emission wavelength of 591 nm.

Porphyrins	Emission peaks (nm)	
Coproporphyrin III	596	649
Protoporphyrin IX	605	652
Uroporphyrin I	600	649
ATCC 27010	595	650
ATCC 27010 with ALA	595	649
HC04	596	648
HC04 with ALA	596	649

Table 2. Retention time of porphyrin standards and extract of porphyrins produced by *C. diphtheriae* ATCC 27010 and HC04 strains cultured in the absence and presence of ALA (2 mM) according to HPLC-MS.

Standard/ Bacterial Strains	Uroporphyrin I precursor ion $[M+H]^+ = 830$ (min)	Coproporphyrin III precursor ion $[M+H]^+ = 655$ (min)	Protoporphyrin IX precursor ion $[M+H]^+ = 563$ (min)
Standard	10.83	15.74	28.47
ATCC27010	10.87	15.74	28.46
ATCC27010 with ALA	10.86	15.69	28.45
HC04	10.85	15.71	28.42
HC04 with ALA	10.86	15.70	28.42

Quantification of coproporphyrin III by HPLC-DAD shows that the addition of ALA increases the amount of coproporphyrin III by about 2-fold for the two strains studied, as shown in Figure 2. The calibration curve and the results of the validation method used in this analysis are shown below in the section on the quantitative analysis of the porphyrins produced by the

Table 3. Retention time of porphyrin standards and extract of porphyrins produced by *C. diphtheriae* ATCC 27010 and HC04 strains cultured in the absence and presence of ALA (2 mM) according to HPLC-DAD.

Standard/Bacterial Strains	Uroporphyrin I (min)	Coproporphyrin III (min)	Protoporphyrin IX (min)
Standards	5.75	9.09	11.7
ATCC27010	5.80	9.11	Not detect
ATCC27010 with ALA	5.79	9.11	Not detect
HC04	5.80	9.11	Not detect
HC04 with ALA	5.79	9.11	Not detect

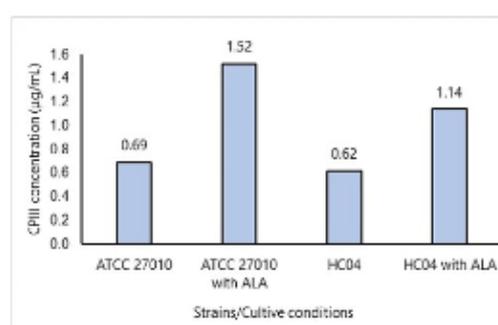


Figure 2. Quantification of coproporphyrin III produced by *C. diphtheriae* ATCC 27010 and HC04 strains cultured in the absence and presence of ALA (2 mM). Quantification was performed by HPLC-DAD at the wavelength of 400 nm. CPIII, coproporphyrin III.

strains used in this study. Supplementation of ALA in the ATCC 27010 and HC04 culture strains resulted in a proportional increase in the production of coproporphyrin III, while the profile of the porphyrins under investigation remained unaltered.

Qualitative Analysis of Porphyrin Production by *C. diphtheriae*

The chemical characterization of the porphyrins produced by corynebacterial strains upon ALA supplementation (2 mM) was performed using emission spectroscopy and high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to the following detection systems: mass spectrometry detector (HPLC-MS), multipath detector/fluorescence detector (HPLC-MWD-FD), and diode array detector (HPLC-DAD). Emission spectroscopy showed the production of porphyrin in all *C. diphtheriae* strains studied, presenting similar and characteristic emission spectra of porphyrins,^[66,27] with two emission peaks in the region of 600 nm and 650 nm (Table 4). The analysis of the emission spectra obtained indicates the predominance of coproporphyrin III, however, these analysis does not allow identifying the presence of other porphyrins in the extracts (Figure 3).

Table 4. Emission peak wavelengths of porphyrin standards and extracts of porphyrins from *C. diphtheriae* strains cultivated with ALA addition (2 mM). Emission spectra were obtained at an excitation wavelength of 399 nm and an emission wavelength of 591 nm. Standards and extracts were in 5% HCL

Standard/Bacterial Strains	Emissions peaks (nm)	
Coproporphyrin III standard	596	649
Protoporphyrin IX standard	605	652
Uroporphyrin I standard	600	649
ATCC 27010	595	650
ATCC 27012	595	650
HC01	594	651
HC02	594	651
HC02	594	651
HC03	594	651
HC04	596	648
HC06	595	650
TR241	594	648
TR402	595	650

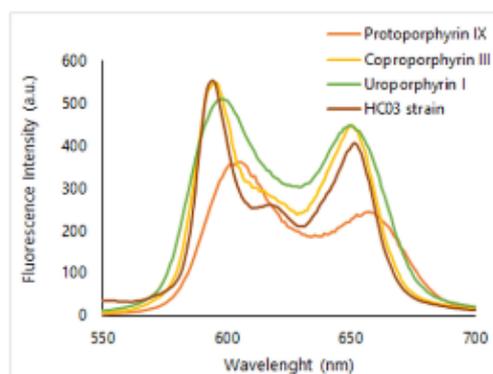


Figure 3. Emission spectra of the porphyrin dication standards and the porphyrin extracts of *C. diphtheriae* HC03 strain cultivated with ALA addition (2 mM). Emission spectra were obtained at an excitation wavelength of 399 nm and an emission wavelength of 591 nm. Standards and extracts were in 5% HCL

The analysis of the extracts from *C. diphtheriae* strains by HPLC-FD detected not only coproporphyrin III but also uroporphyrin I in all the strains studied. In addition, protoporphyrin IX was detected in only 2 of the 9 strains studied (Table 5). A typical HPLC-FD chromatogram of the HC03 strain and standards is shown in Figure 4.

The use of the DAD detector confirmed the presence of coproporphyrin III and uroporphyrin I in all strains tested. However, protoporphyrin IX was not detected in any of them (Table 6). A typical HPLC-DAD chromatogram obtained from the porphyrin extract of HC03 strain is shown in Figure 5.

The HPLC-MS analysis detected the m/z ratio for CPIII ($[M+H]^+ = 655.5$) and the doubly charged parent ion ($[M+2H]^{2+} =$

Table 5. Retention time (min) of porphyrin standards and extracts of porphyrins from *C. diphtheriae* strains cultivated with ALA addition (2 mM), according to HPLC-FD.

Standard/Bacterial Strains	Uroporphyrin I (min)	Coproporphyrin III (min)	Protoporphyrin IX (min)
Standards	6.89	10.72	14.02
ATCC 27010	6.98	10.81	Not detect
ATCC 27012	6.96	10.81	Not detect
HC01	6.96	10.81	Not detect
HC02	6.94	10.79	Not detect
HC03	6.98	10.81	14.05
HC04	6.99	10.82	Not detect
HC06	6.99	10.82	14.04
TR402	6.97	10.82	Not detect
TR241	6.97	10.82	Not detect

Table 6. Retention time (min) of porphyrin standards and extract of porphyrins from *C. diphtheriae* HC03 strain cultivated with ALA addition (2 mM), according to HPLC-DAD.

Standard/Bacterial Strains	Uroporphyrin I (min)	Coproporphyrin III (min)	Protoporphyrin IX (min)
Standards	5.75	9.09	11.7
ATCC 27010	5.77	9.11	Not detect
ATCC 27012	5.76	9.12	Not detect
HC01	5.77	9.11	Not detect
HC02	5.73	9.09	Not detect
HC03	5.76	9.11	Not detect
HC04	5.79	9.11	Not detect
HC06	5.79	9.11	Not detect
TR402	5.75	9.11	Not detect
TR241	5.79	9.11	Not detect

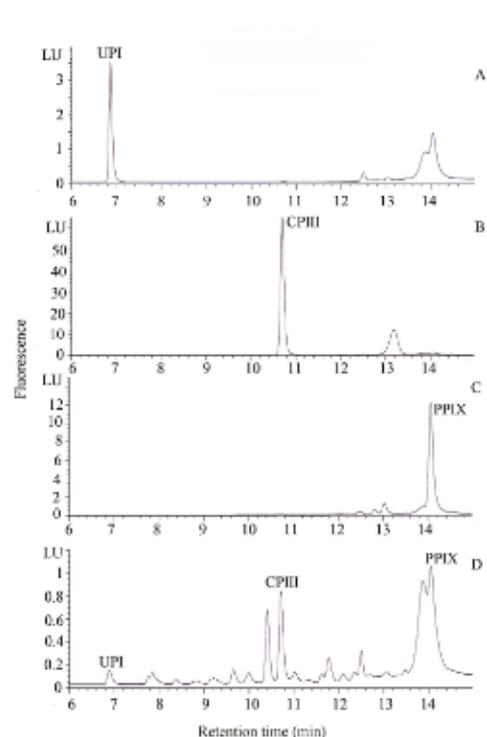


Figure 4. HPLC-MWD-FD chromatograms. Chromatogram A, B and C are representative of uroporphyrin I, coproporphyrin III and protoporphyrin IX standards respectively and chromatogram D is representative of porphyrin extract from *C. diphtheriae* HC03 strain cultivated with ALA addition (2 mM). PPIX, protoporphyrin IX; CPIII, coproporphyrin III; UPI, uroporphyrin I.

328.5) in Total Ion Chromatogram (TIC) and specific ion monitoring for all strains studied. Protoporphyrin IX and

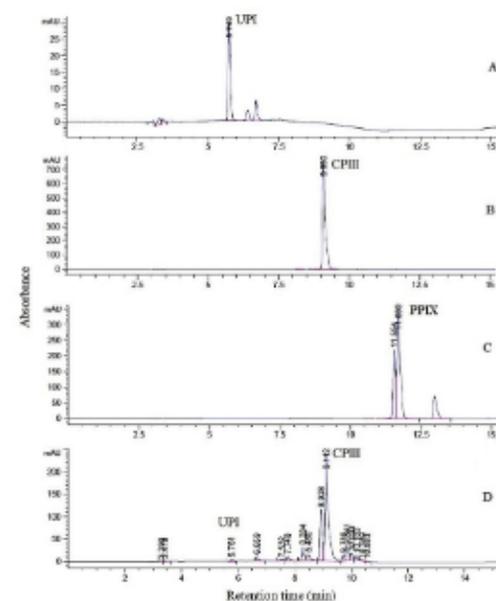


Figure 5. HPLC-DAD chromatograms. Chromatograms A, B and C are representative of uroporphyrin I, coproporphyrin III and protoporphyrin IX standards respectively and chromatogram D is representative of porphyrin extract from *C. diphtheriae* HC03 strain cultivated with ALA addition (2 mM). PPIX, protoporphyrin IX; CPIII, coproporphyrin III; UPI, uroporphyrin I.

uroporphyrin I were not detected in the TIC of any strain. However, upon specific ion monitoring, the presence of their ions was detected as shown in Table 7. The chromatograms related to HPLC-MS of the *C. diphtheriae* HC04 strain are shown in Figure 6.

Qualitative analyses of porphyrin production revealed that the tested *C. diphtheriae* strains (n=9) produced coproporphyrin III, protoporphyrin IX and uroporphyrin I. This property

Table 7. Retention time (min) of porphyrin standards and extract of porphyrins from *C. diphtheriae* strains cultivated with ALA addition (2 mM), according to HPLC-MS.

Standard/Bacterial Strains	Uroporphyrin I precursor ion $[M + H]^+ - 830$ (min)	Coproporphyrin III precursor ion $[M + H]^+ - 655$ (min)	Protoporphyrin IX precursor ion $[M + H]^+ - 563$ (min)
Standard	10.83	15.74	28.47
ATCC 27010	Not detect	15.71	28.46
ATCC 27012	Not detect	15.71	28.52
HC01	Not detect	15.75	28.50
HC02	Not detect	15.7	28.51
HC03	Not detect	15.7	28.49
HC04	10.82	15.72	28.50
HC06	10.89	15.72	28.50
TR402	Not detect	15.73	28.52
TR241	Not detect	15.74	28.50

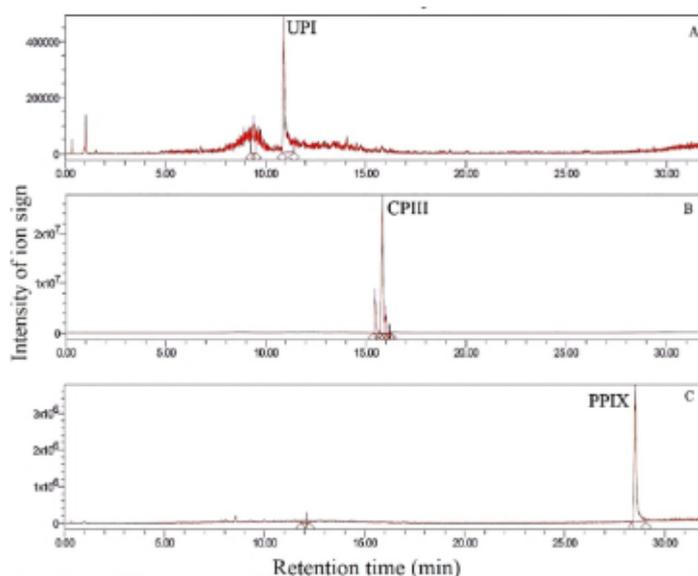


Figure 6. HPLC-MS chromatograms of the porphyrin extract from *C. diphtheriae* HC04 strain cultivated with ALA addition (2 mM). Chromatogram A is representative of uroporphyrin I (ion $[M + H]^+ - 830$); chromatogram B is representative of coproporphyrin III (ion $[M + H]^+ - 655$) and the chromatogram C is representative of protoporphyrin IX (ion $[M + H]^+ - 563$). PPIX, protoporphyrin IX; CPiII, coproporphyrin III; UPI, uroporphyrin I.

shown to be independent of DT production, as confirmed by ATCC 27010 (DT-negative) and ATCC 27012 (DT-positive) strains used as controls.

Coproporphyrin III was identified in all strains and in the different analytical techniques used, indicating its quantitative predominance in comparison to the other porphyrins studied.

The HPLC-DAD chromatogram showed other signals with absorption spectra typical of porphyrins,^{29c} with a maximum absorption band (called Soret) close to 400 nm and four other smaller bands (called Q bands) in the region of 500–700 nm

(Figure 7). This finding suggests the presence of porphyrins other than those investigated in this work.

Quantitative Analysis of Coproporphyrin III Produced by *C. diphtheriae*

Due to the predominance of coproporphyrin III in the extracts obtained from *C. diphtheriae* strains, calibration curves and

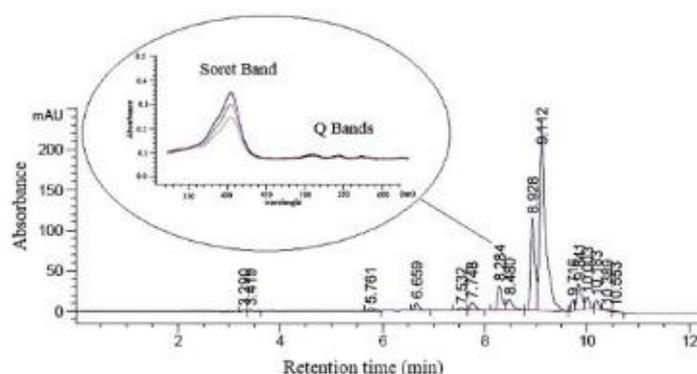


Figure 7. HPLC-DAD chromatogram of porphyrin extract from *C. diphtheriae* HC03 strain cultivated with ALA addition (2 mM), with wavelength set at 400 nm. The absorption spectrum of the signal at 8.24 min is highlighted above.

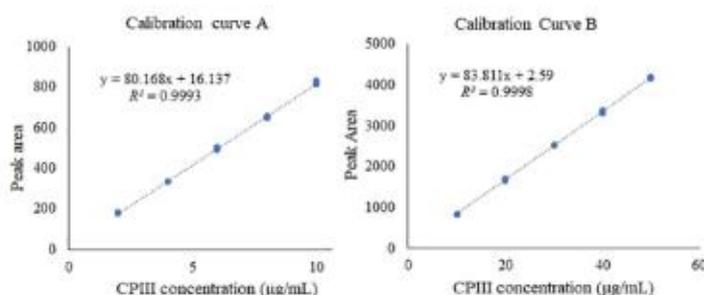


Figure 8. Calibration curves for coproporphyrin III obtained from HPLC-DAD with wavelength set at 400 nm, showing the linearity and equation used for quantification of coproporphyrin III in porphyrins extracts of *C. diphtheriae* strains. Curve A – 2.0 µg/mL to 10 µg/mL. Curve B – 10 µg/mL to 50 µg/mL. CPIX, coproporphyrin III.

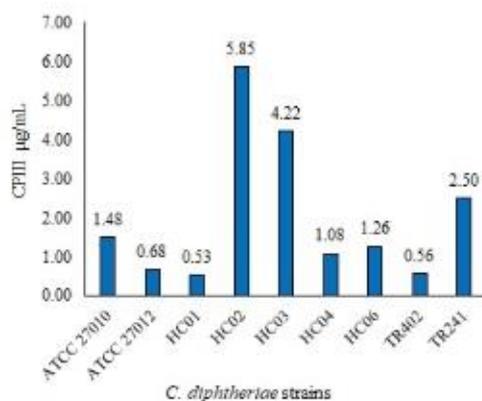


Figure 9. Quantification of coproporphyrin III produced by *C. diphtheriae* strains cultivated with ALA addition (2 mM), obtained from HPLC-DAD with the wavelength at 400 nm. CPIX, coproporphyrin III.

validation of the method for its quantification by HPLC-DAD were performed.

The linearity of the calibration curves was high, demonstrated by the correlation coefficient (R^2) being higher than 0.99 for both curves, as shown in Figure 8. The LOD was determined to be 0.27 µg and the LOQ was determined to be 0.82 µg. The standard deviation (SD) for calibration curve A was ± 0.60329 µg/mL and for curve B was ± 0.34159 µg/mL.

The quantification of coproporphyrin III produced by corynebacterial strains upon ALA supplementation (2 mM) revealed significantly different values among the strains used in the study, as shown in Figure 9.

Discussion

Many biological processes depend on the heme prosthetic group present in essential proteins, such as globins, peroxidases

and cytochromes. During infection, bacterial pathogens must acquire heme from the host or synthesize heme.

With a few notable exceptions, including *Bartonella henselae*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus* spp., most human pathogens encode complete heme biosynthetic pathways.^[28–37] However, the contribution of heme synthesis to the pathogenesis of bacterial pathogens remains largely unexplored. For *Staphylococcus aureus*, whose reliance on heme acquisition during infection has been well established, it is now clear that heme biosynthesis is essential to cause disease in murine models of infection. Studies using mutants for genes involved in heme biosynthesis showed a reduction in colonization and bone destruction in a murine model of osteomyelitis.^[38] Similar studies using gene silencing of the final steps of the heme metabolic pathway in *Brucella*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* have also shown a decrease in colonization capacity in different murine tissues.^[20,32,33]

Initially, it was generally accepted that the heme metabolic pathway was conserved among organisms with the final step of the pathway consisted of the insertion of iron into protoporphyrin IX producing protoheme. However, during the last decade, the studies have reported that *Actinobacteria* and *Firmicutes* use a different metabolic pathway, called the non-canonical pathway, which is able to synthesize heme through the oxidation of coproporphyrinogen to coproporphyrin III and the insertion of ferrous iron to form Fe-coproporphyrin (coproheme) with subsequent decarboxylation of coproheme and protoheme formation.^[9–10] These differences in heme synthesis strategies between Gram-positive bacterial pathogens and the human host offer the potential for bacteria specific therapeutics that disrupt heme synthesis while preserving the host metabolic pathway.

A previous study showed that the addition of ALA at concentrations of 1–2 mM to cultures of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* resulted in a significant increase in porphyrin synthesis. Cultures without ALA supplementation did not produce detectable amounts of porphyrins, indicating that ALA supplementation is essential to induce the porphyrin biosynthetic pathway in these bacteria. The study shows that the profile of porphyrins produced changes according to the concentration of ALA used in the medium. However, coproporphyrin III was the predominant porphyrin at all concentrations studied.^[39] The analysis of the profile of porphyrins produced by *Propionibacterium acnes* showed a predominance of protoporphyrin IX in cultures to which no ALA was added, indicating that the bacteria preferentially accumulate protoporphyrin in this case. However, the addition of ALA at a concentration of 1.8 mM was observed to increase the proportion of coproporphyrin III and uroporphyrin I.^[25]

The results of the present analysis of the porphyrin extracts showed homogeneity in the pattern of porphyrins produced, with a predominance of coproporphyrin III in all *C. diphtheriae* strains tested and in cultures without and with ALA supplementation, suggesting the use of the non-canonical pathway for the synthesis of the heme group by this species. Further studies, including research into the copro-heme and proto-heme groups

are required to elucidate this process for *C. diphtheriae* and other *Corynebacterium* species.

Although the coproporphyrin III was predominantly produced by all the *C. diphtheriae* strains tested, the results of the quantitative analysis of coproporphyrin III production demonstrated a strain-dependent propriety that was not directly correlated with the origin, biovar, sucrose fermentation or DT production abilities. Porphyrin production has been associated with biofilm formation by a variety Gram-positive and Gram-negative human pathogens and in influencing the host immune response. A study involving the nasal and skin microbiota showed that coproporphyrin III production by *Propionibacterium* spp. induced aggregation and biofilm formation in *S. aureus* samples and mediated the interspecies relationships in the skin microbiota. The production of coproporphyrin III by *Propionibacterium* also seems to stimulate the production of IL-8 by keratinocytes, which has been shown to influence the host immune response.^[36–39] A variety of *C. diphtheriae* strains isolated from clinical cases can form biofilm on different types of surfaces.^[40,41] There is considerable evidence to justify the need for further studies to elucidate the role of porphyrins in pathogen-host interactions. The chemical characterization of these molecules represents a crucial initial step in this direction.

Conclusions

This study elucidates the porphyrin production profiles of *C. diphtheriae* strains isolated from diphtheria cases and invasive infections and grown without and with the addition of ALA (2 mM). Through a comprehensive analysis using emission spectroscopy and high-performance liquid chromatography coupled to different detectors, we identified coproporphyrin III, uroporphyrin I and protoporphyrin IX in all the strains cultivated with 2 mM ALA supplementation ALA and in the two strains that were cultivated without ALA. The addition of ALA to the culture medium at a concentration of 2 mM caused an increase in the amount of porphyrin produced in the two strains used. The pattern of porphyrins examined was not altered by ALA supplementation.

The quantitative analysis performed in this study suggests a strain-dependent production of coproporphyrin III, highlighting the heterogeneity of porphyrin levels in between *C. diphtheriae* isolates. Despite the variation in the amount of coproporphyrin III, the predominance of coproporphyrin III was consistent across strains, suggesting a potential dependence on the non-canonical heme synthesis pathway. Previous research has linked porphyrin production to biofilm formation and modulation of the host immune response in other bacterial species. Consequently, further research is needed to elucidate the role of porphyrins in the *C. diphtheriae* pathogenesis and their potential as therapeutic targets.

Experimental Section

Bacterial Collection

C. diphtheriae strains used in this investigation, origin, clinical and microbiological features are presented in Table 8.

Experiments were performed with microorganisms from stock cultures and grown in Trypticase Soy Broth (TSB; Difco Laboratories, USA) at 37 °C for 48 h. Clinical samples were previously isolated from clinical specimens and identified as *C. diphtheriae* in the Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Importance, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro (LDCIC/UERJ), the Collaborating Center and Reference for Diphtheria Research/Ministry of Health, Brazil. Stock cultures in TSB medium supplemented with 20% glycerol were maintained at –70 °C.

Culture Conditions and Porphyrin Extraction

For each strain, 3 mL inoculum was prepared for each sample in TSB with an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.3 and subsequently inoculated in 50 mL of TSB supplemented with 2 mM 5-aminolevulinic acid (ALA; Sigma-Aldrich, USA) and incubated at 37 °C for 5 days. The bacterial growth was then estimated by measuring the OD_{600} . For the preliminary test to investigate the effect of ALA on porphyrin production, a culture was also carried out under the same conditions with the culture medium without ALA supplementation.

Porphyrins were then extracted from each bacterial suspension by using 25 mL of ethyl acetate/acetic acid (Sigma-Aldrich, USA) solution (1:4 v/v) and transferred to a 5 mL of 5% HCl (Sigma-Aldrich, USA), as previously described.^{19,42} Porphyrins were collected for both spectroscopic and chromatographic analyses.

Preparation of Porphyrin Standard Solutions

The porphyrin standards used included uroporphyrin I (UPI) (Sigma-Aldrich, USA), coproporphyrin III (CPIII) (Santa Cruz Biotechnology, USA) and protoporphyrin IX (PPIX) (Sigma-Aldrich, USA), which were dissolved in 5% HCl and remained stable for at least 24 h.

Spectrofluorometric Analysis

Emission spectra were acquired using an Agilent Cary Eclipse fluorescence spectrometer (Agilent Technologies, USA) equipped

with xenon flash lamp (80 Hz). The instrument was operated with an excitation wavelength of 399 nm and an emission wavelength of 591 nm. The width of the emission slit was adjusted to 20 nm and that of the excitation beam to 1.5 nm.⁴³ The wavelength accuracy is 1.5 nm and quartz cuvettes with an optical path of 1.00 cm were used.

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Methods

All methods used during the present study were performed based on previously described assays⁴³ with modifications detailed below. The porphyrin standards used in HPLC methods were the same as those previously described for the spectroscopic analysis.

HPLC-MS assays were performed by using PerkinElmer Altus Ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) systems (PerkinElmer, USA), including an autosampler, a column temperature controller, interfaced with an Altus SQ detector mass spectrometer and an Altus UPLC BEH C18 column (5 μ m particle size; 2.1x150 mm, PerkinElmer, USA) and connect to Empower 3.0 software (Waters Corporation, USA). The column temperature was 30 °C, and the porphyrins were separated by a 6 min gradient elution and a two-component mobile phase consisting of acetonitrile as solvent A and Milli-Q water acidified with formic acid 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) as solvent B. Gradient elution commenced upon injection at 5:95 (A:B), which was changed to 100:0 (A:B) in 30 min and returned to initial conditions within 32 min. The column was allowed to equilibrate for 5 min at 5:95 (A:B) before the next injection and the flow rate used was 0.3 mL/min, with a maximum flow rate of 0.5 mL/min. The capillary voltage was 3.5 kV, with a cone voltage per tune, a desolvation temperature of 450 °C, a source temperature of 150 °C, a carrier gas flow (nitrogen) of 800 L/h and in the cone rate of 40 L/h. Continuum data were acquired in the positive ion mode, the ratios of mass (m/z) of 563 (PPIX), 655 (CPIII) and 830 (UPI) were monitored and the total ion chromatograms were verified.

HPLC-MWD-FD assays were performed by an Agilent 1200 Infinity chromatograph system (Agilent Technologies, USA), which included an autosampler, and a column temperature controller, equipped with a multi-length ultraviolet (UV) detector and a fluorescence detector connected to Agilent ChemStation software (Agilent, USA). Porphyrins were separated on an ACE C18 Aq column (5 μ m particle size, 250x4.6 mm, Advanced Chromatography Technologies Ltd., Aberdeen, Scotland). The mobile phase was composed of methanol as solvent A and ammonium acetate as solvent B. Gradient elution commenced upon injection of 20:80 (A:B), which was changed to

Table 8. Origin, clinical and microbiological features of *C. diphtheriae* strains used in this study.

Strain	Biovar	Origin	Diphtheria toxin production ¹⁹	Sucrose fermentation
ATCC ⁴⁴ 27010	<i>mitis</i>	Type strain from the ATCC	–	–
ATCC ⁴⁴ 27012	<i>mitis</i>	Strain Reference from ATCC	†	–
HC01	<i>mitis</i>	Endocarditis (blood sample)	–	†
HC02	<i>mitis</i>	Endocarditis (blood sample)	–	†
HC03	<i>mitis</i>	Endocarditis (blood sample)	–	†
HC04	<i>gravis</i>	Endocarditis (blood sample)	–	–
HC06	<i>gravis</i>	Endocarditis (blood sample)	–	–
TR241	<i>mitis</i>	Classic respiratory diphtheria	†	†
TR402	<i>beliantii</i>	Pneumonia (lung)	–	†

⁴⁴ ATCC, American Type Culture Collection (USA). ¹⁹ Diphtheria toxin production assessed using Elek's test.

50:50 (A:B) in 3 min, 100:0 (A:B) in 7 min and between 10 to 17 min the initial conditions of 20:80 (A:B) were maintained. The column was allowed to equilibrate for 3 min with 20:80 (A:B), before the next injection and the flow rate used was 0.7 mL/min. The column temperature was 30 °C. The excitation and emission wavelengths used in the fluorescence detector were 395 and 630 nm, respectively, and the PMT gain factor of 13. With a multichannel UV detector, the wavelength (λ) of 400 nm was monitored.

HPLC-DAD experiments were carried out by an Agilent 1200 HPLC instrument (Agilent Technologies, USA), including an autosampler, a column temperature controller, and a diode array detector, connected to Agilent ChemStation software. Porphyrins were separated on a Hypersil Gold C18 column (5 μ m particle size; 250 \times 4.6 mm, Thermo Fisher Scientific Inc, USA). The elution conditions were the same as those used for HPLC-MWD-FD, the wavelength of 400 nm was monitored and UV spectra between 190 nm and 640 nm were recorded.

Quantitative Analysis

Quantitative analysis was carried out by HPLC-DAD using the methodology described above. From a stock solution of 1000 μ g/mL of coproporphyrin III in 5% HCl, two different calibration curves were prepared: (A) one from 2 to 10 μ g/mL and (B) a second from 10 to 50 μ g/mL. Both curves were performed in triplicate. Chromatographic peak area abundances (based on HPLC-DAD chromatograms) were obtained using ChemStation software (version 10.1, Agilent Technologies), where the peaks were integrated and exported to Microsoft Excel for quantification. Statistical analysis was carried out by the Action Stat software and using the linearity study (Ordinary Least Squares Method) and the Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantitation (LOQ) were calculated.

Qualitative Analysis

The identity of the porphyrins present in the samples was obtained by comparing the signal retention times (all HPLC methods), mass ratios (m/z) (HPLC-MS), absorption spectra (HPLC-DAD) obtained and emission spectra for the porphyrin extracts and for the standards used.

Author Contributions

Conceptualization: Gabriela Batista Alves and Ana Luiza de Mattos Guaraldi. Methodology, formal analysis and data curation: Gabriela Batista Alves, Mônica Regina da Costa Marques Calderari and Eduardo Nunes da Fonseca. Writing: Gabriela Batista Alves. Writing – review and editing: Gabriela Batista Alves, Ana Luiza de Mattos Guaraldi and Louisy Sanches dos Santos. Funding acquisition, Project administration, Supervision, and Resources: Ana Luiza de Mattos Guaraldi, Louisy Sanches dos Santos and Mônica Regina da Costa Marques Calderari.

Acknowledgements

Financial resources were provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

(88882.315426/2019-01), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ (E-26/211.220/2021; E-26/210.889/2019; E-26/202.653/2019), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (309948/2018-5) and Sub-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR-2/UERJ).

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords: *Corynebacterium diphtheria* · Fluorescence spectroscopy · Mass spectrometry · Porphyrins · UV/Vis spectroscopy

- [1] A. L. Mattos-Guaraldi, L. S. Santos, V. V. Vieira, *Manual of Clinical Microbiology - Coryneform Gram-Positive Rods**, American Society Of Microbiology Press, 2023, 13th edition, USA.
- [2] L. Ott, J. Moller, A. Burkovski, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, DOI 10.3390/ijms23063298.
- [3] M. Hennart, L. G. Panunzi, C. Rodrigues, Q. Gaday, S. L. Baines, M. Barros-Pinkelnig, A. Carmi-Leroy, M. Dazas, A. M. Wehenkel, X. Didelot, J. Toubiana, E. Badell, S. Brisse, *Genome Med.* 2020, 12, DOI 10.1186/s13073-020-00805-7.
- [4] B. M. Forde, A. Henderson, E. G. Playford, D. Looke, B. C. Henderson, C. Watson, J. A. Steen, H. E. Sidjabat, G. Laurie, S. Muttaiah, G. R. Nimmo, G. Lampe, H. Smith, A. V. Jennison, B. McCall, H. Carroll, M. A. Cooper, D. L. Paterson, S. A. Beatson, *Clin. Infect. Dis.* 2021, 73, DOI 10.1093/cid/ciaa1147.
- [5] H. Fischer, H. Fink, *Physiol. Chem.* 1925, 150, 243–260.
- [6] K. M. Smith, *Porphyrins - Comprehensive Coordination Chemistry II* (Eds: J. A. McCleverty, T. J. Meyer), vol. 1. Pergamon, 2003, pp. 493–506.
- [7] M. Shepherd, A. E. Medlock, H. A. Dailey, *Porphyrin Metabolism - Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier, 2004, 3, 415–419.
- [8] H. Dailey, S. Gerdes, T. Dailey, J. Burch, J. D. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015, 112, 2210–2215.
- [9] H. A. Dailey, T. A. Dailey, S. Gerdes, D. Jahn, M. Jahn, M. R. O'Brian, M. J. Warren, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2017, 81, DOI 10.1128/mbr.00048-16.
- [10] J. E. Choby, E. P. Skaar, *J. Mol. Biol.* 2016, 428, 3408–3428.
- [11] Y. Nitzan, M. Gutterman, Z. Malik, B. Ehrenberg, *Photochem. Photobiol.* 1992, 55, 89–96.
- [12] L. K. Jackson, T. A. Dailey, B. Anderle, M. J. Warren, H. A. Bergonia, H. A. Dailey, J. D. Phillips, *Biomolecules* 2023, 13, DOI 10.3390/biom13101485.
- [13] E. P. Skaar, M. Humayun, T. Bae, K. L. DeBord, O. Schneewind, *Science* (1979) 2004, 305, DOI 10.1126/science.1099930.
- [14] N. Hammer, M. Reniere, J. Cassat, Y. Zhang, A. Hirsch, M. I. Hood, E. Skaar, *mBio* 2013, 30, 1–9.
- [15] S. Karrer, R. M. Szeimies, S. Ernst, C. Abels, W. Bäuml, M. Landthaler, *Lasers Med. Sci.* 1999, 14, DOI 10.1007/s101030050021.
- [16] M. T. Hopp, D. Domingo-Fernández, Y. Gadiya, M. S. Detzel, R. Graf, B. F. Schmalohr, A. T. Kodamullil, D. Imhof, M. Hofmann-Apitius, *Biomolecules* 2021, 11, DOI 10.3390/biom11050644.
- [17] C. Von Eiff, C. Heilmann, R. A. Proctor, C. Woltz, G. Peters, F. Götz, *J. Bacteriol.* 1997, 179, DOI 10.1128/jb.179.15.4706-4712.1997.
- [18] N. D. Hammer, J. E. Cassat, M. J. Noto, L. J. Lojek, A. D. Chadha, J. E. Schmitz, C. B. Creech, E. P. Skaar, *Cell Host Microbe* 2014, 16, DOI 10.1016/j.chom.2014.09.002.
- [19] V. Rapozzi, A. Juarranz, A. Habib, A. Ihan, R. Strgar, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2021, 35, DOI 10.1016/j.pdpdt.2021.102381.

- [20] M. Almirón, M. Martínez, N. Sanjuan, R. Ugalde, *Infect Immun.* **2001**, *69*, 6225–6230.
- [21] C. B. Coulter, F. M. Stone, *J. Gen. Physiol.* **1931**, May, *14* (5), 583–596.
- [22] A. M. Pappenheimer, *J. Biol. Chem.* **1947**, *167*, 251–259.
- [23] C. H. Gray, L. B. Holt, *Biochem. J.* **1948**, *43*, 191–193.
- [24] L. D. Formiga, T. C. Camello, A. L. Mattos-Guaraldi, L. B. A. Rangel, A. C. F. Assis, *Rev. Microbiol.* **1983**, *14*, 172–173.
- [25] L. M. Russell, S. J. Cryz, R. K. Holmes, *Infect Immun.* **1984**, *45*, 143–149.
- [26] M. Gouterman, *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, *6*, 138–163.
- [27] D. Dolphin, H. Budzikiewicz, *Mass Spectrometry of Porphyrins – The Porphyrins*, Elsevier, **1978**, vol 3, pp. 395–465.
- [28] L. Frankenberg, M. Brugna, L. Hederstedt, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6351–6356.
- [29] A. Sander, S. Kretzer, W. Bredt, K. Oberle, S. Bereswill, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *189*, 55–59.
- [30] M. Baureder, L. Hederstedt, *Adv Microbiol.*, Elsevier Ltd, Burlington **2013**, pp. 1–43.
- [31] E. L. Biberstein, P. D. Mini, M. Gills, *J. Bacteriol.* **1963**, *89*, 814–819.
- [32] D. Skurnik, D. Roux, H. Aschard, V. Cattoir, D. Yoder-Himes, S. Lory, G. Pier, *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, DOI 10.1371/journal.ppat.1003582.
- [33] N. Wang, E. Ozer, M. Mandel, A. Hauser, *mBio* **2014**, *5*, DOI 10.1128/mBio.01163-14.
- [34] G. C. Bohm, L. Gándara, G. Di Venosa, L. Mamone, F. Buzzola, A. Casas, *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *177*, DOI 10.1016/j.bcp.2020.114016.
- [35] S. Ramstad, C. M. Futsaether, A. Johnsson, *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *40*, DOI 10.1016/S1011-1344(97)00039-0.
- [36] M. S. Wollenberg, J. Claesen, I. F. Escapa, K. L. Aldridge, M. A. Fischbach, K. P. Lemon, *mBio* **2014**, *5*, DOI 10.1128/mBio.01286-14.
- [37] M. Schaller, M. Loewenstein, C. Borelli, K. Jacob, M. Vogeser, W. H. C. Burgdorf, G. Plewig, *Br. J. Dermatol.* **2005**, *153*, 66–71.
- [38] V. J. Torres, D. L. Stauff, G. Pishchany, J. S. Bezradica, L. E. Gordy, J. Iturregui, K. L. L. Anderson, P. M. Dunman, S. Joyce, E. P. Skaar, *Cell Host and Microbe* **2007**, *1*, 109–119.
- [39] D. L. Stauff, E. P. Skaar, *Contrib. Microbiol.* **2009**, *16*, 120–135.
- [40] D. L. R. Gomes, C. A. S. Martins, L. M. D. Faria, L. S. Santos, C. S. Santos, P. S. Sabbadini, M. C. Souza, G. B. Alves, A. C. P. Rosa, P. E. Nagao, G. A. Pereira, R. Hirata, A. L. Mattos-Guaraldi, *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 1419–1427.
- [41] A. L. Mattos-Guaraldi, D. L. R. Gomes, R. S. Peixoto, E. A. B. Barbosa, F. Napoleão, P. S. Sabbadini, K. R. N. dos Santos, R. Hirata, *J. Med. Microbiol.* **2013**, *62*, 754–760.
- [42] R. Romiti, M. Schaller, K. Jacob, G. Plewig, *Arch. Dermatol. Res.* **2000**, *292*, 320–322.
- [43] C. Taylor, L. K. Duffy, F. G. Plumley, R. T. Bowyer, *Environ. Res.* **2000**, *84*, 56–63.

Manuscript received: April 25, 2024

Accepted manuscript online: August 7, 2024

Version of record online: ■■■■■

ANEXO D - Comprovação de aceite do 1^o artigo científico

Date: 05 Aug 2024
To: "Ana Luiza Mattos-Guaraldi" aguaraldi@gmail.com
From: "Chemistry and Biodiversity" editor@chembiodiv.ch
Subject: Decision on your manuscript cbdv.202401011R1 for Chemistry and Biodiversity

Manuscript number: cbdv.202401011R1
MS Type: Research Article
Title: "Porphyrin Production by Corynebacterium diphtheriae Strains from Clinical Isolates"
Correspondence Author: Dr Ana Luiza Mattos-Guaraldi

Dear Dr Mattos-Guaraldi,

Thank you for submitting the revised version of your above-mentioned manuscript. We sent the paper back to the referee(s) and they are satisfied with the changes made. Accordingly, we are pleased to inform you that the revised version of the above-mentioned paper has been accepted for publication in Chemistry and Biodiversity. Your paper will now be processed for production.

IMPORTANT: COPYRIGHT & LICENSING

The final version of your article can only be published once we have received a signed license agreement. You will soon receive an email invitation to register or log in to Wiley Author Services [here](#) (you will receive an e-mail from **cs-author@wiley.com** shortly). After logging into Wiley Author Services, please follow the on-screen instructions to confirm your corresponding author(s) and sign the appropriate license agreement.

In order to find out whether the cost of publishing your manuscript Open Access is covered by one of our national agreements, check our website: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/open-access/affiliation-policies-payments/index.html>. The primary corresponding author's affiliation is to be used to determine eligibility for some open access funding. It is important to correctly select this affiliation to qualify for these funds.

Yours sincerely,
Dr. Yuzhu Song
Deputy Editor
Chemistry and Biodiversity

on behalf of

Editorial Office Staff
Chemistry and Biodiversity

Wiley-VHCA
Seefeldstrasse 69
Postfach
CH-8024 Zürich
e-mail: chembiodiv@wiley.com
<http://www.cb.wiley.com>

ANEXO E - Comprovação de submissão do 2º artigo científico

 ACS Infectious Diseases[Home](#)

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to ACS Infectious Diseases

Manuscript ID id-2024-00799v

Title Photodynamic inactivation mediated by endogenous porphyrins of *Corynebacterium diphtheriae* in planktonic and biofilm forms

Authors Alves, Gabriela
Calderari, Monica R. C. M.
Fonseca, Eduardo
Sant'anna, Lincoln
Santos, Louisy
Guaraldi, Ana Luiza

Date Submitted 04-Oct-2024

[Author Dashboard](#)

ANEXO F - Formato final do 2^o artigo científico submetido

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Photodynamic inactivation mediated by endogenous porphyrins of *Corynebacterium diphtheriae* in planktonic and biofilm forms

Journal:	<i>ACS Infectious Diseases</i>
Manuscript ID	id-2024-00799v
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	04-Oct-2024
Complete List of Authors:	Alves, Gabriela; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Calderari, Monica R. C. M.; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química - Central Analítica Fernanda Coutinho Fonseca, Eduardo; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química - Central Analítica Fernanda Coutinho Sant'anna, Lincoln; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Relevância Clínica Santos, Louisy; Rio de Janeiro State University, Microbiology Guaraldi, Ana Luiza; Rio de Janeiro State University, Microbiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Title

Photodynamic inactivation mediated by endogenous porphyrins of *Corynebacterium diphtheriae* in planktonic and biofilm forms

Author names and affiliations

Gabriela Batista Alves^{1,3}

Mônica Regina da Costa Marques Calderari²

Eduardo Nunes da Fonseca²

Lincoln de Oliveira Sant'anna¹

Louisy Sanches dos Santos¹

Ana Luíza Mattos-Guaraldi¹

¹Rio de Janeiro State University, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

²Rio de Janeiro State University, Analytical Center Fernanda Coutinho, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

³Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro, General and Inorganic Chemistry Laboratory, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

Corresponding author

Gabriela Batista Alves

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Laboratório de Química Geral e Química Inorgânica

Rua Senador Furtado, 121 - Maracanã – Rio de Janeiro/RJ – CEP: 20270-021

Telephone number: (+55) 21 2566 7779 E-mail: gabriela.alves@ifrj.edu.br

Abstract

Photodynamic inactivation has emerged as a promising approach to combat bacterial infections by using light activation of photosensitizers to induce microbial death. This study investigated the potential of endogenous porphyrins produced by *Corynebacterium diphtheriae* as photosensitizers for photodynamic inactivation. Qualitative analysis revealed the presence of porphyrins in all strains studied, with coproporphyrin III predominating. The addition of 5-aminolevulinic acid enhanced porphyrin production as evidenced by increased fluorescence intensity. In addition, high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection analyses confirmed the presence of coproporphyrin III and protoporphyrin IX in all strains and the 5-aminolevulinic acid supplementation did not alter the porphyrin profiles. Quantitative analysis showed that strain-dependent coproporphyrin III levels were significantly increased with 5-aminolevulinic acid supplementation. Additionally, biofilm formation was positively correlated with porphyrin production, suggesting a role for porphyrins in biofilm formation. Photoinactivation experiments showed that the strains responded differently to light exposure, with 5-aminolevulinic acid supplementation reducing the time required for significant CFU/mL reduction. In addition, biofilm survival exceeded planktonic cell survival, highlighting the challenges posed by biofilm structures to photodynamic inactivation efficacy. Despite the variable responses observed, all strains exhibited a reduction in viability following light exposure, demonstrating the potential of endogenous porphyrins for antimicrobial photoinactivation applications.

Keywords

Antimicrobial agents, biofilm, *Corynebacterium diphtheriae*, photoinactivation, porphyrin

1
2
3 *Corynebacterium diphtheriae* is the causative agent of classic respiratory and
4
5 cutaneous diphtheria, a toxemic disease whose prevention depends on the implementation
6
7 of effective immunization programs by using diphtheria toxoid vaccines. In addition to
8
9 diphtheria, systemic infections, often caused by non-diphtheria toxin producing strains,
10
11 are increasingly observed. Cases of infections due to *C. diphtheriae* strains expressing
12
13 resistance to antimicrobial agents used in therapies have been also reported (1–4). These
14
15 facts demonstrated the relevance of additional research concerning innovative strategies
16
17 for treating different types of infections caused by this pathogen, independent of
18
19 diphtheria toxin production and also to support antimicrobial therapies.
20
21
22
23

24
25 Photodynamic inactivation (PDI) of bacteria has been shown to be an efficient
26
27 antimicrobial approach for killing antibiotic-sensitive bacteria as well as multidrug-
28
29 resistant bacteria. The PDI technique uses the ability of photosensitizing molecules
30
31 which, when exposed to visible light, produce reactive oxygen species (ROS) responsible
32
33 for the oxidation of many biological molecules (enzymes, proteins, lipids, and nucleic
34
35 acids) causing the death of the target pathogen (5–7).
36
37

38
39 Previous reported studies have shown that porphyrins are efficient photosensitizers,
40
41 due to their physical and chemical characteristics of absorbing light in blue part of the
42
43 electromagnetic spectrum and are capable to transfer this energy to oxygen and generating
44
45 reactive oxygen species such as hydrogen peroxide and oxygen radicals (8–11).
46
47

48
49 Porphyrins are intermediate metabolites in the biosynthesis of vital molecules as
50
51 heme proteins. The heme group is essential to the function of these proteins, which are
52
53 involved in energy generation by the electron transport chain, detoxification of host
54
55 immune effectors, and other processes. The 5-aminolevulinic acid (ALA) is the early
56
57 precursor of heme group from bacterial and eukaryotic cells. The production of
58
59 porphyrins is regulated by ALA concentration. High levels of exogenously added ALA
60

1
2
3 may lead to the accumulation and secretion of porphyrins that may be used as endogenous
4
5 photosensitizer (12–14).
6

7
8 For a long time, it was accepted that eukaryotes and prokaryotes used the same
9
10 metabolic intermediates in their heme synthesis pathways, with protoporphyrin being the
11
12 final intermediate into which iron was inserted to produce protoheme. However, studies
13
14 reported in recent years have shown that in Actinomycetes and Bacillotas, iron is inserted
15
16 into coproporphyrin III, but not into protoporphyrin (13,15).
17

18
19 In the United States of America, during the year of 1930, the first reported research
20
21 describing porphyrins produced by *C. diphtheriae* observed the presence of red and
22
23 fluorescent pigments in filtered cultures (16). In the United Kingdom, during the year of
24
25 1948, a reported study demonstrated the production of coproporphyrin III by *C.*
26
27 *diphtheriae* strains (17). In Brazil, fluorescence assays by using Wood Lamp due to
28
29 porphyrin production were reported as a novel approach for screening of *C. diphtheriae*
30
31 strains during laboratorial diagnoses procedures in the 1980's (18). Chemical analysis of
32
33 porphyrin extracts carried out in a recent study with strains of *C. diphtheriae* showed the
34
35 predominance of coproporphyrin III in all tested strains. Furthermore, quantitative
36
37 analysis revealed that ALA supplementation increased the amount of coproporphyrin III
38
39 produced (19).
40
41
42
43
44
45

46 Photoinactivation using the endogenous production of porphyrins used as
47
48 photosensitizers molecules that have been shown to be an effective for a variety of Gram-
49
50 negative and Gram-positive bacteria (20). Studies have reported results for
51
52 *Propionibacterium acnes* in the treatment of acne (21,22), in ulcers associated with
53
54 *Helicobacter pylori* (23–25), and with *Salmonella enterica* strains (26). In rat models,
55
56 photodynamic inactivation with ALA addition (ALA-PDI) has also been employed *in*
57
58 *vivo* for the treatment of osteomyelitis with *S. aureus* infections (27,28).
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

There is a variety of responses to photodynamic therapy among the different species of bacterial pathogens, including total eradication and absence of effect from exposure to adequate light. Gram-negative bacteria are generally more resistant to PDI treatment. This can be explained by the difference in the structures of their outer membranes compared to those of Gram-positive bacteria. It is generally accepted that the peptidoglycan layer of Gram-positive strains has a much higher permeability than the outer membranes of Gram-negative bacteria, facilitating the absorption of ALA molecules and the flow of porphyrins produced by the investigated pathogen (14,29).

The aim of this study was to verify the potential of coproporphyrin III produced by *C. diphtheriae* strains as a photosensitizer employing ALA and to correlate the degree of photodynamic response with the amount of coproporphyrin III production by photoinactivation from bacterial planktonic cells and sessile forms from biofilms.

Results and Discussion

Qualitative analysis of porphyrin production by *C. diphtheriae* strains

The analysis of the porphyrin extracts from *C. diphtheriae* strains by HPLC-DAD confirmed the presence of coproporphyrin III in all three tested strains and uroporphyrin I was detected in only ATCC27010 and HC04 strains. However, protoporphyrin IX was not detected in any of them. Retention times are shown in Table 1.

Table 1. Retention time of porphyrin standards and extract of porphyrins obtained in HPLC-DAD.

Standard/Bacterial Strains	Uroporphyrin I (min)	Coproporphyrin III (min)	Protoporphyrin IX (min)
Standards	5.75	9.09	11,7
ATCC27010	5.80	9.11	Not detect
ATCC27010 with ALA	5.79	9.11	Not detect
HC04	5.80	9.11	Not detect
HC04 with ALA	5.79	9.11	Not detect
2962	Not detect	9.11	Not detect
2962 with ALA	Not detect	9.11	Not detect

C. diphtheriae strains were cultured in the absence and presence of ALA (2 mM).

The HPLC-MS analysis detected the m/z ratio for CPIII ($[M+H]^+ = 655$) and the doubly charged parent ion ($[M+2H]^{2+} = 328.5$) in Total Ion Chromatogram (TIC) and specific ion monitoring for all strains studied. Protoporphyrin IX and uroporphyrin I were not detected in the TIC of any strain. However, upon specific ion monitoring, the presence of their ions was detected in some strains as shown in Table 2. Coproporphyrin III was found in all strains and conditions and supplementing ALA in the culture medium did not change the porphyrins profile detected.

Table 2. Retention time (min) of porphyrin standards and extract of porphyrins obtained in HPLC-MS

Standard/Bacterial Strains	Uroporphyrin I precursor ion (minutes) [M+H] ⁺ = 830 (min)	Coproporphyrin III precursor ion (minutes) [M+H] ⁺ = 655 (min)	Protoporphyrin IX precursor ion (minutes) [M+H] ⁺ = 563 (min)
Standard	10.83	15.74	28.47
ATCC27010	10.87	15.74	28.46
ATCC27010 with ALA	10.86	15.69	28.45
HC04	10.85	15.71	28.42
HC04 with ALA	10.86	15.70	28.42
2962	Not detect	15.75	28.50
2962 with ALA	Not detect	15.71	28.47

C. diphtheriae strains were cultured in the absence and presence of ALA (2 mM).

The chromatograms of the extracts obtained from the ATCC27010 and HC04 strains cultures with the addition of ALA exhibited larger peak areas for the UPI, CPIII, and PPIX signals when compared to the extracts from the cultures without ALA, indicating an increase in the amount produced of the three porphyrins under investigation. The only exception was the protoporphyrin IX peak area of sample HC04, which exhibited a decrease in the ALA culture as shown in Table 3.

Table 3. Peak areas of extract of porphyrins obtained in HPLC-MS

Standard/Bacterial Strains	Uroporphyrin I Peak Area	Coproporphyrin III Peak Area	Protoporphyrin IX Peak Area
ATCC27010	2.05×10^{06}	2.10×10^{08}	2.50×10^{07}
ATCC27010 with ALA	7.38×10^{06}	4.64×10^{08}	4.86×10^{07}
HC04	3.57×10^{06}	1.23×10^{08}	4.02×10^{07}
HC04 with ALA	1.22×10^{07}	2.20×10^{08}	1.54×10^{07}
2962	Not detect	6.01×10^{07}	2.53×10^{06}
2962 with ALA	Not detect	1.14×10^{08}	6.58×10^{06}

C. diphtheriae strains were cultured in the absence and presence of ALA (2 mM).

It has also been described that the type of porphyrins produced varies according to the duration of exposure to ALA. Short incubation times tend to accumulate more lipophilic

1
2
3 porphyrins, such as protoporphyrin IX, while longer periods result in a majority of
4 hydrophilic porphyrins, such as coproporphyrin III and uroporphyrin I (31,32). Future
5 studies, with different culture times and varying ALA concentrations, are needed to detail
6 the influence of this supplementation on the profile of the porphyrins produced by *C.*
7
8
9
10
11
12
13 *diphtheriae*.

14
15 For a long time, it was believed that the heme group metabolic pathway was unique
16 across species. However, in the last decade, it has been shown that while the initial steps
17 are conserved, the final stages can occur via two pathways. The classical pathway, found
18 in some Gram-negative bacteria and eukaryotes, converts coproporphyrinogen III to
19 protoporphyrin IX, which then forms protoheme. The non-canonical pathway, present in
20 Actinomycetes and Bacillotas, oxidizes coproporphyrinogen III to coproporphyrin III,
21 then forms coproheme, which is decarboxylated to protoheme. Although the pathways
22 have been identified, annotating the related genes remains challenging. Studies on
23 *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* suggest that a single enzyme may act on both
24 coproporphyrinogen and protoporphyrinogen, with a preference for coproporphyrin III
25 (13,33,34).

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 The detection of only coproporphyrin III in the total ion chromatograms of all the
42 strains studied shows the predominance of coproporphyrin III, reinforcing the hypothesis
43 that the non-canonical heme group synthesis pathway is used. The analysis of specific ion
44 monitoring was able to detect coproporphyrin III and protoporphyrin IX in the extracts of
45 all the strains used in this study, corroborating the hypothesis of the dual function of
46 coproporphyrinogen oxidase.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Quantitative analysis of coproporphyrin III produced by *C. diphtheriae*

Due to the predominance of coproporphyrin III in the extracts obtained from *C. diphtheriae* strains, calibration curves and validation of the method for its quantification by HPLC-DAD were performed. Statistical analysis was carried out by the Action Stat software and using the linearity study (Ordinary Least Squares Method) using $p < 0,05$. The limit of detection (LOD) was determined in 0.27 μg and the limit of quantification (LOQ) in 0.82 μg . The standard deviation (SD) for calibration curve A was ± 0.60329 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and for curve B was ± 0.34159 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The quantification of coproporphyrin III in the studied extracts revealed significantly different values among *C. diphtheriae* strains used in the study as shown in Figure 1. Supplementing the culture medium with ALA increased the amount of coproporphyrin III produced in all studied strains.

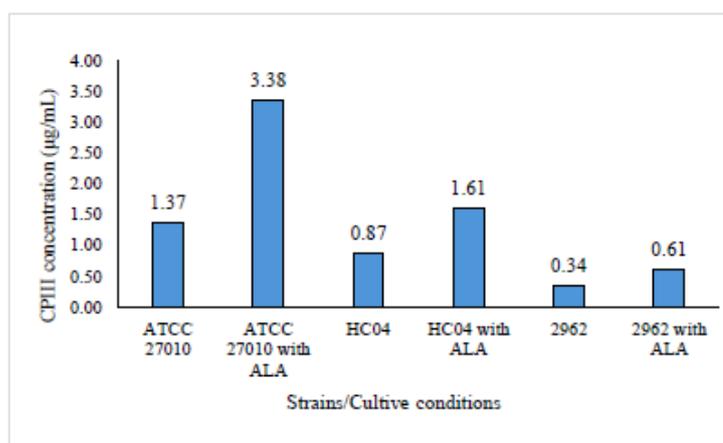


Figure 1. Quantification of coproporphyrin III produced by *C. diphtheriae* strains cultured in the absence and presence of ALA (2 mM). Quantification was performed by HPLC-DAD at the wavelength of 400 nm. Standard deviation = $\pm 0,60329$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. LOD = 0,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and LOQ = 0.82 μg

CPIII, coproporphyrin III

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The influence of ALA supplementation on the profile of porphyrins produced by Gram-negative and Gram-positive bacteria has already been described in studies on the photoinactivation of microorganisms. For species such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, it was observed that porphyrin synthesis peaked at concentrations of 1-2 mM ALA. However, the increase in the amount of porphyrin depends on the type of cell, with Gram-positive bacteria, being more likely to accumulate coproporphyrin III after ALA administration, while Gram-negative bacteria tend to accumulate other porphyrin intermediates (19,31,35–37)

24 Biofilm formation

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The tests showed that all strains were able to form biofilm and the addition of ALA to the culture medium did not change the amount of biofilm produced. Table 4 shows the average CFU/mL in the biofilm for each sample and study condition, as well as the standard deviation (SD). Figure 2 shows the log 10 of the CFU/mL for each sample and cultivation condition, along with the results of the statistical tests.

39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 4. *C. diphtheriae* strains cultured in the absence and presence of ALA (2 mM) in the biofilm formation test.

Strains/Culture conditions	Mean of CFU/mL	Standard Deviation (SD)
ATCC27010	1.80×10^{10}	2.00×10^{09}
ATCC27010 with ALA	1.90×10^{10}	2.00×10^{09}
HC04	3.23×10^{07}	5.13×10^{06}
HC04 with ALA	3.70×10^{07}	6.08×10^{06}
2962	1.20×10^{06}	1.00×10^{05}
2962 with ALA	1.27×10^{06}	2.08×10^{05}

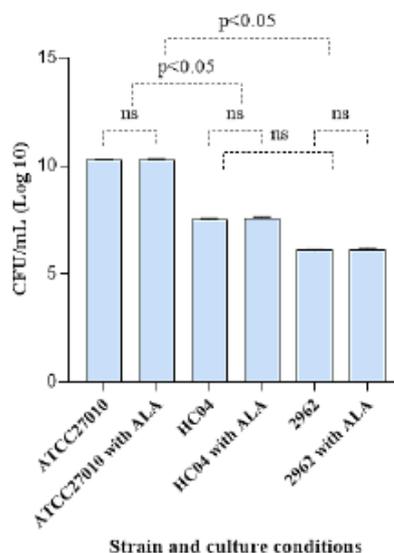


Figure 2. Biofilm cultured of *C. diphtheriae* strains cultivated in the absence and presence of ALA (2 mM). The addition of ALA to the cultures did not result in a notable change in the number of CFU/mL in the biofilms formed. The ATCC27010 strain produced more biofilm than the HC04 and 2962 strains. Statistical differences were evaluated through one-way ANOVA, with a confidence level of 95% ($P < 0.05$). ns, not statistically significant.

The results point to greater biofilm formation by the strains that produce more coproporphyrin III in the cultures without the addition of ALA. However, the addition of ALA did not cause an increase in biofilm formation by *C. diphtheriae* strains. Previous studies have shown that heme group metabolism is involved in signal transduction, acting as a cofactor for gas/redox sensors and modulating behaviors such as response to nitric oxide and biofilm formation (38,39). Data suggested that higher levels of biofilm formation by the strains that produce more coproporphyrin III may be linked more to the availability and presence of these signaling heme proteins than to the amount of heme group precursor present in the culture medium.

Photoinactivation of planktonic cells and biofilm

All *C. diphtheriae* tested strains responded to some degree to exposure to light. Figure 3 showed the results of photoinactivation of planktonic cells and biofilms. The time of exposure to light required to cause a reduction in the number of CFU/mL was directly correlated to the amount of C_{PIII} produced by each strain. The ATCC27010 strain showed a reduction in the number of CFU/mL with only 30 min of exposure to light, in cultures without and with ALA. In contrast, 2962 strain which produces much less C_{PIII}, showed a reduction in the number of CFU/mL only after 60 min of exposure in the culture with the addition of ALA and 90 min of exposure in the culture without ALA.

The addition of aminolevulinic acid (ALA) to the culture resulted in a reduction in the time of exposure to light needed to cause a significant decrease in the number of CFU/mL in both HC04 and 2962 strains. This reduction was observed in both experiments with planktonic cells and biofilms, with the time of exposure to light being reduced from 60 min to 30 min for HC04 strain and from 90 min to 60 min for the 2962 strain. In Table 5 was presented the survival fraction in planktonic cells and biofilm cultures, with and without the addition of ALA, after 90 min of exposure to light. The addition of ALA was observed to enhance the efficiency of photoinactivation for all the strains and conditions studied. After 90 min of exposure, the cultures with added ALA had a reduction of 1-2 log of CFU/mL more than the cultures without ALA.

A comparison of survival fraction between planktonic cells and biofilm revealed that, except for strain ATCC27010, all exhibited an increase in biofilm survival. Previous studies have described that biofilm structures may affect the interaction of the photosensitizer as well as reduce the quantity of light reaching the bacteria, thereby decreasing the effectiveness of the photosensitizing process (40,41).

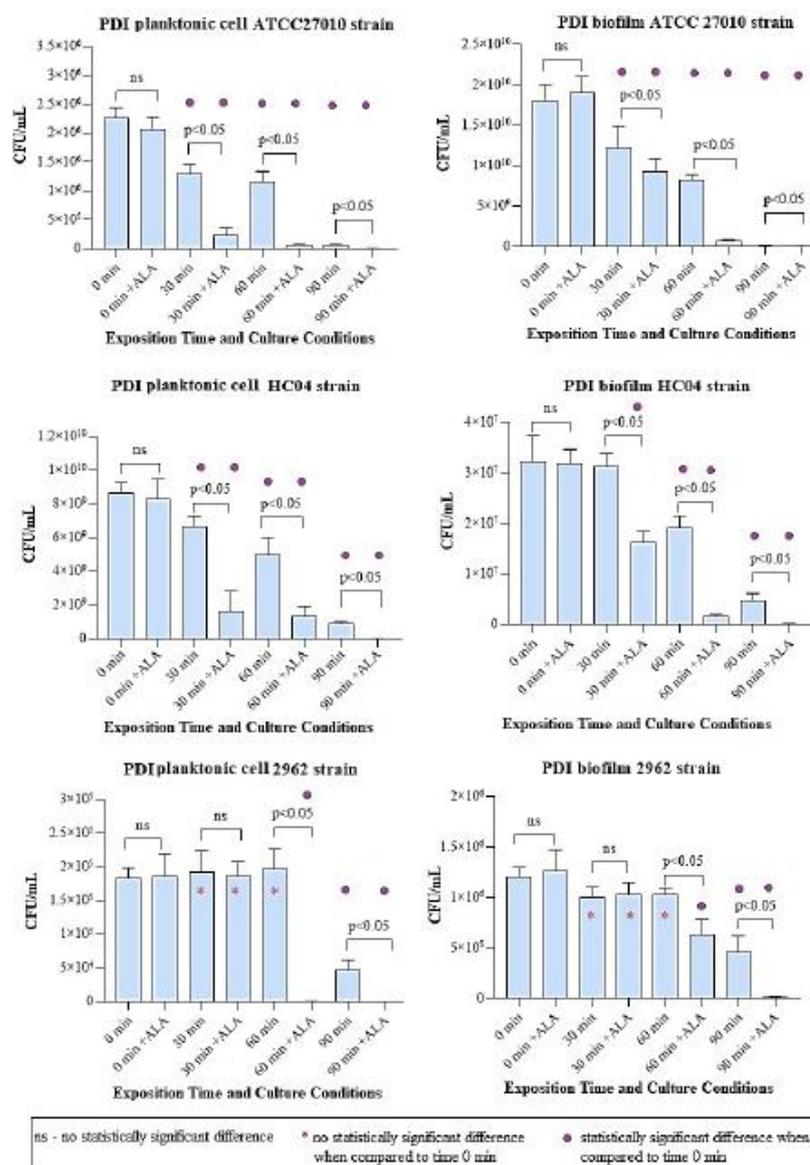


Figure 3. Photodynamic inactivation of planktonic cells and biofilm of *C. diphtheriae* strains cultivated in the absence and presence of ALA 2 mM (+ALA) and using light exposure times of 30 min, 60 min and 90 min. The results were compared with cultures not exposed to light (0 min). The results obtained in the cultures without and with ALA supplementation were also compared. Statistical differences were evaluated through one-way ANOVA, with a confidence level of 95% ($P < 0.05$).

ns, not statistically significant.

Table 5. Survival fractions (N/N_0) from *C. diphtheriae* strains cultures after 90 min of light exposure

Bacterial Strain/Type of cell	Survival fraction (N/N_0)	
	Without ALA	With ALA
ATCC27010 planktonic cells	2.32×10^{-02}	1.16×10^{-03}
ATCC27010 sessile cells	6.85×10^{-03}	1.23×10^{-03}
HC04 planktonic cells	1.04×10^{-01}	2.17×10^{-03}
HC04 sessile cells	1.47×10^{-01}	2.94×10^{-03}
2962 planktonic cells	2.55×10^{-01}	7.14×10^{-04}
2962 sessile cells	3.89×10^{-01}	1.05×10^{-02}

The strains were cultivated in the absence and presence of ALA (2 mM) and exposed to 400 nm wavelength light for 90 minutes.

N_0 – CFU/mL before exposure to light dose.

N – CFU/mL after 90' of exposure to light dose.

This study showed a reduction in bacterial viability for all tested strains and culture conditions studied after exposure to LED light at 400 nm, for both planktonic cells and biofilms. The strains studied showed different degrees of response to PDI. Several authors have previously described that the response to the PDI is markedly strain-dependent both in Gram-positive and Gram-negative bacteria (42–45). Therefore, although it was not possible to eradicate the strains at the exposure times and light doses studied, it is assumed that this can be overcome with adjustments to the light source, exposure time and cultivation conditions. Several factors have been identified as contributing to the susceptibility of this pathogen, including the composition of the cell wall, the levels and types of porphyrins, and the presence of protection mechanisms. A better understanding of the metabolism of the heme group and the mechanisms involved in the photoinactivation process is necessary and could lead to new methods to increase the effectiveness of antimicrobial PDI.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Conclusion

In conclusion, the present study demonstrated the potential of porphyrins produced by *C. diphtheriae* strains as a photosensitizer for photoinactivation, both in planktonic cells and biofilms. Moreover, the addition of 5-aminolevulinic acid (ALA) increased the production of coproporphyrin III, enhancing the efficacy of photodynamic therapy. Qualitative and quantitative analyses revealed strain-dependent variations on porphyrins production by *C. diphtheriae*, which correlated with the degree of bacterial susceptibility to photoinactivation. Data also suggested that biofilm formation may be influenced by the presence of porphyrins, indicating a potential role of these molecules in bacterial signaling pathways.

This study provided insight into the potential innovative strategies for combating this pathogen. Future studies should focus on optimizing light exposure parameters and elucidating the mechanisms underlying bacterial photoinactivation. This will further advance the application of photodynamic therapy as a promising approach for controlling and treating bacterial infections, including those caused by *C. diphtheriae*.

Methods

Origin of bacterial strains

The origin and clinical and microbiological features of *C. diphtheriae* strains used in this investigation are presented in Table 6.

Table 6. Origin, clinical and microbiological features of *Corynebacterium diphtheriae* strains used in this study

Strain	Origin	<i>tox</i> gene
ATCC27010	Type strain	Negative
HC04	Endocarditis (blood sample)	Negative
2962	Cutaneous diphtheria (skin)	Negative

ATCC, American Type Culture Collection (USA)

Experiments were performed with microorganisms from stock cultures and grown in Trypticase Soy Broth (TSB; Difco Laboratories, USA) at 37°C for 48 h. Clinical samples were previously isolated from clinical specimens and identified as *C. diphtheriae* in the Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University (LDCIC/UERJ), the Collaborating Center for Diphtheria Research/Ministry of Health, Brazil. Stock cultures in TSB medium supplemented with 20% glycerol were maintained at -70°C. To confirm the identification of *C. diphtheriae* and to study DT production, multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assays were performed as previously described with primer pairs targeting the following genes: *rpoB*, *dtxR*, and *tox* (30).

Culture conditions and porphyrin extraction

The porphyrins produced in cultures without ALA and with 2 mM ALA were analyzed. An inoculum of 3 mL was prepared for each strain in TSB with an optical density of 0.3 at 600 nm (OD₆₀₀). Then 1 mL was transferred to 2 flasks, each containing 50 mL of TSB. One was supplemented with 2 mM 5-aminolevulinic acid (ALA; Sigma-Aldrich, USA) and the other was not supplemented with ALA. The *C. diphtheriae* strains were added and the flasks were incubated at 37°C for 48h. Then, bacterial growth was evaluated by measuring the OD₆₀₀.

Porphyrins were then extracted from each bacterial suspension by using 25 mL of ethyl acetate/acetic acid (Sigma-Aldrich, USA) solution (1:4 v/v) and transferred to a 5mL of

1
2
3 5% HCl (Sigma-Aldrich, USA), as previously described (46). The porphyrins extracted
4
5 in the two culture conditions (without and with ALA supplementation) were analyzed
6
7 using high-resolution chromatography coupled with UV absorption and mass
8
9 spectrometry detectors.
10

11 12 13 **Preparation of porphyrin standard solutions**

14
15 The porphyrin standards used included uroporphyrin I (UPI) (Sigma-Aldrich, USA),
16
17 coproporphyrin III (CPIII) (Santa Cruz Biotechnology, USA) and protoporphyrin IX
18
19 (PPIX) (Sigma-Aldrich, USA), which were dissolved in 5% HCl and remained stable for
20
21 at least 24 h.
22
23

24 25 26 **High-performance liquid chromatography (HPLC) methods**

27
28 All HPLC methods used during the present study were performed based on previously
29
30 described assays (47) with modifications detailed below.
31
32

33
34 HPLC-MS assays were performed by using PerkinElmer Altus Ultra-high-
35
36 performance liquid chromatography (UHPLC) systems (PerkinElmer, USA), including
37
38 an autosampler, a column temperature controller, interfaced with an Altus SQ detector
39
40 mass spectrometer and an Altus UPLC BEH C18 column (5 μm particle size; 2.1 \times 150
41
42 mm, PerkinElmer, USA) and connect to Empower 3.0 software (Waters Corporation,
43
44 USA). The column temperature was 30°C, and the porphyrins were separated by a 6 min
45
46 gradient elution and a two-component mobile phase consisting of acetonitrile as solvent
47
48 A and Milli-Q water acidified with formic acid 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) as solvent
49
50 B. Gradient elution commenced upon injection at 5:95 (A:B), which was changed to 100:0
51
52 (A:B) in 30 min and returned to initial conditions within 32 min. The column was allowed
53
54 to equilibrate for 5 min at 5:95 (A:B) before the next injection and the flow rate used was
55
56 0.3 mL/min, with a maximum flow rate of 0.5 mL/min. The capillary voltage was 3.5 kV,
57
58
59
60

1
2
3 with a cone voltage per tune, a desolvation temperature of 450°C, a source temperature
4
5 of 150°C, a carrier gas flow (nitrogen) of 800 L/h and in the cone rate of 40 L/h.
6
7

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Continuum data were acquired in the positive ion mode, the ratios of mass (m/z) of 563 (PPIX), 655 (CPIII) and 830 (UPI) were monitored and the total ion chromatograms were verified.

HPLC-DAD experiments were carried out by an Agilent 1200 HPLC instrument (Agilent Technologies, USA), including an autosampler, a column temperature controller, and a diode array detector, connected to Agilent ChemStation software. Porphyrins were separated on a Hypersil Gold C18 column (5 μm particle size; 250 x 4.6 mm, Thermo Fisher Scientific Inc, USA). The mobile phase was composed of methanol as solvent A and ammonium acetate as solvent B. Gradient elution commenced upon injection of 20:80 (A:B), which was changed to 50:50 (A:B) in 3 min, 100:0 (A:B) in 7 min and between 10 to 17 min the initial conditions of 20:80 (A:B) were maintained. The column was allowed to equilibrate for 3 min with 20:80 (A:B), before the next injection and the flow rate used was 0.7 mL/min. The column temperature was 30°C. The excitation and emission wavelengths used in the fluorescence detector were 395 nm and 630 nm, respectively, and the PMT gain factor of 13. With a multichannel UV detector, the wavelength of $\lambda = 400$ nm was monitored and UV spectra between 190 nm and 640 nm were recorded.

Qualitative analysis of porphyrin production

The three main intermediates in heme group biosynthesis (coproporphyrin III, uroporphyrin I and protoporphyrin IX) were analyzed in porphyrin extract from *C. diphtheriae* strains cultivated with and without ALA supplementation. The analytical

1
2
3 techniques used were High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with
4
5 UV absorption (HPLC-DAD) and mass spectrometry (HPLC-MS) detectors.
6
7

8 **Quantitative analysis of coproporphyrin III**

9
10
11 Coproporphyrin III was quantified using HPLC-DAD. Initially two different
12
13 calibration curves were prepared from coproporphyrin III maintained in a stock solution
14
15 of 1000 µg/mL in 5% HCl: Curve A - one from 2 to 10 µg/mL; Curve B - a second from
16
17 10 to 50 µg/mL. Both curves were performed in triplicate. Chromatographic peak area
18
19 abundances (based on HPLC-DAD chromatograms) were obtained using ChemStation
20
21 software (version 10.1, Agilent Technologies), where the peaks were integrated. The peak
22
23 area table was exported to Microsoft Excel for quantitation. Statistical analysis was
24
25 carried out by the Action Stat software and using the linearity study (Ordinary Least
26
27 Squares Method) using $p < 0,05$ and the Limit of Detection (LOD), and Limit of
28
29 Quantitation (LOQ) were calculated.
30
31
32

33 **Photoinactivation of planktonic cultures**

34
35
36 The photoinactivation tests on planktonic cultures were carried out without and
37
38 with ALA supplementation (2 mM) and using light exposure times of 0 min (no light
39
40 exposition), 30 min, 60 min and 90 min. The effect of ALA supplementation to the culture
41
42 medium was also analyzed by comparing the results between cultures without and with
43
44 the addition of ALA.
45
46
47

48
49
50 The methodology used was carried out based on previously described method
51
52 (31). An inoculum of 3 mL was prepared for each strain in TSB with an optical density
53
54 of 0.3 at 600 nm (OD_{600}). Then 1 mL was transferred to 2 flasks, each containing 50 mL
55
56 of TSB. One was supplemented with 2 mM ALA and the other was not supplemented
57
58
59
60

1
2
3 with ALA. The *C. diphtheriae* strains were added and the flasks were incubated at 37°C
4
5 for 48h. Then, bacterial growth was evaluated by measuring the OD₆₀₀.
6

7
8 Then, an amount of 1000 µL of these cultures were transferred to 24-multiwell plates.
9
10 Two plates were prepared for each strain. One with culture with ALA supplementation
11 and the other without ALA supplementation. The 24-multiwell containing bacteria were
12 placed on a glass slide and illuminated from above 20°C at 10 cm during 30 min, 60 min
13 and 90 min. The light array consisted of two 400 nm/7 W LED lamps with a fluence rate
14 of 155 mW/cm². The number of CFU/ml was determined after plating an aliquot of serial
15 dilutions on agar plates.
16
17
18
19
20
21
22
23

24 All experiments were carried out in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) and
25 Student's t-test were used to determine statistical significance employing the GraphPad
26 Prism 9 software. A value of $p < 0.05$ was considered significant.
27
28
29
30
31

32 **Biofilm formation and photodynamic inactivation**

33
34
35 The photoinactivation tests on biofilm cultures were carried out without and with
36 ALA supplementation (2 mM) and using light exposure times of 0 min (no light
37 exposition), 30 min, 60 min and 90 min. The effect of ALA supplementation to the culture
38 medium was also analyzed by comparing the results between cultures without and with
39 the addition of ALA.
40
41
42
43
44
45
46

47 The methodology used was carried out according to the previous study with the
48 changes described below (31,48). An amount of 1000 µL of bacteria (OD₆₀₀ of 0.3) in
49 TSB was placed into each well of 24-multiwell plates, containing plastic Thermanox®
50 coverslip in each well. Two plates were prepared for each strain, one supplemented with
51 2 mM ALA and the other without ALA supplementation. After 48 h of incubation the 24-
52 multiwell containing bacteria were placed on a glass slide and illuminated from above at
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 20°C at 10 cm during 30 min, 60 min and 90 min. The light array consisted of two 400
4
5 nm/7 W LED lamps with a fluence rate of 155 mW/cm².
6
7

8
9 Then, each individual Thermanox® coverslip was transferred to a sterile plastic tube
10 of 15 mL containing 5 ml of phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.2 and immersed in
11 an ultrasonic bath (E15-H; Elmasonic, Singen, Germany). Sonication was carried out at
12 37 kHz with an output power of 240 W, at 37°C for 5 min. After sonication, the coverslips
13 were discarded, and the number of CFU/mL was determined after plating an aliquot of
14 serial dilutions on agar plates.
15
16
17
18
19
20
21

22 All experiments were carried out in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) and
23 Student's t-test were used to determine statistical significance employing the Graphpad
24 Prism 9 software. A value of $p < 0.05$ was considered significant.
25
26
27
28
29

30 Funding

31
32
33 Financial resources were provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
34 de Nível Superior – CAPES (88882.315426/2019-01), Fundação de Amparo à Pesquisa
35 do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ (E-26/211.220/2021; E-26/210.889/2019; E-
36 26/202.653/2019), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
37 CNPq (309948/2018-5) and Sub-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade
38 do Estado do Rio de Janeiro (SR-2/UERJ).
39
40
41
42
43
44
45
46

47 Conflict of interest

48 The authors declare that they have no conflicts of interest.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Ott L, Möller J, Burkovski A. Interactions between the Re-Emerging Pathogen *Corynebacterium diphtheriae* and Host Cells. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. 2022.
2. Hennart M, Panunzi LG, Rodrigues C, Gaday Q, Baines SL, Barros-Pinkelnic M, et al. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. Genome Med. 2020;12(1).
3. Forde BM, Henderson A, Playford EG, Looke D, Henderson BC, Watson C, et al. Fatal Respiratory Diphtheria Caused by β -Lactam-Resistant *Corynebacterium diphtheriae*. Clinical Infectious Diseases. 2021;73(11).
4. Mattos-Guaraldi AL, Santos LS, Vieira VV. Manual of Clinical Microbiology -Coryneform Gram-Positive Rods*. 12th ed. American Society of Microbiology Press; 2023.
5. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective. Lasers Surg Med. 2006;38(5):468–81.
6. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). Vol. 42, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998.
7. Oyim J, Omolo CA, Amuhaya EK. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy: Advancements in Porphyrin-Based Photosensitize Development. Vol. 9, Frontiers in Chemistry. 2021.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

8. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. Vol. 33, *Current Opinion in Microbiology*. 2016.
9. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004;3(5).
10. Kim H, Lee YR, Jeong H, Lee J, Wu X, Li H, et al. Photodynamic and photothermal therapies for bacterial infection treatment. *Smart Molecules*. 2023;1(1).
11. Savelyeva IO, Zhdanova KA, Gradova MA, Gradov O V., Bragina NA. Cationic Porphyrins as Antimicrobial and Antiviral Agents in Photodynamic Therapy. Vol. 45, *Current Issues in Molecular Biology*. 2023.
12. Choby JE, Skaar EP. Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *J Mol Biol*. 2016 Aug 28;428(17):3408–28.
13. Dailey HA, Dailey TA, Gerdes S, Jahn D, Jahn M, O'Brian MR, et al. Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2017 Mar;81(1).
14. Nitzan Y, Salmon-Divon M, Shporen E, Malik Z. ALA induced photodynamic effects on Gram positive and negative bacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004;3(5):430–5.
15. Dailey H, Gerdes S, Dailey T, Burch J, Phillips JD. Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(7):2210–5.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
16. Coulter CB, Stone FM. The occurrence of porphyrins in cultures of *C. diphtheriae*. *J Gen Physiol*. 1931;May:583–96.
17. Gray CH, Holt LB. The isolation of coproporphyrin III from *Corynebacterium diphtheriae* culture filtrates. *Biochem J*. 1948;43(2):191–3.
18. Formiga LD, Camello TC, Mattos-Guaraldi AL, Rangel LBA, Assis ACF. Teste de fluorescência e pesquisa da atividade pirazina-carboxilamidase (PYZ) na identificação do bacilo diftérico atoxinogênico. *Revista de Microbiologia*. 1983;14:172–3.
19. Alves GB, da Costa Marques Calderari MR, Nunes da Fonseca E, Sanches Santos L, Mattos-Guaraldi AL. Porphyrin Production by *Corynebacterium diphtheriae* Strains from Clinical Isolates. *Chem Biodiversity*. 2024;
20. Harris F, Pierpoint L. Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial Agent. *Med Res Rev*. 2012;32(6).
21. Ashkenazi H, Malik Z, Harth Y, Nitzan Y. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;35(1).
22. Zdrada J, Stolecka-Warzecha A, Odrzywolek W, Deda A, Błońska-Fajfrowska B, Wilczyński S. The use of light in the treatment of acne vulgaris—a review. Vol. 20, *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2021.
23. Luo Q, Liu C, Zhang A, Zhang D. Research progress in photodynamic therapy for *Helicobacter pylori* infection. Vol. 29, *Helicobacter*. 2024.
24. Wilder-Smith CH, Wilder-Smith P, Grosjean P, Van Den Bergh H, Woodtli A, Monnier P, et al. Photoeradication of *Helicobacter pylori* using 5-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- aminolevulinic acid: Preliminary human studies. *Lasers Surg Med.* 2002;31(1).
25. Choi S, Lee H, Chae H. Comparison of in vitro photodynamic antimicrobial activity of protoporphyrin IX between endoscopic white light and newly developed narrowband endoscopic light against *Helicobacter pylori* 26695. *J Photochem Photobiol B.* 2012;117.
26. Polnickaitė-Smirnova E, Buchovec I, Bagdonas S, Sužiedėlienė E, Ramanavičius A, Anusevičius Ž. Photoinactivation of *Salmonella enterica* exposed to 5-aminolevulinic acid: Impact of sensitization conditions and irradiation time. *J Photochem Photobiol B.* 2022;231.
27. Bisland SK, Chien C, Wilson BC, Burch S. Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochemical and Photobiological Sciences.* 2006;5(1).
28. Karrer S, Szeimies RM, Ernst S, Abels C, Bäuml W, Landthaler M. Photodynamic inactivation of staphylococci with 5-aminolaevulinic acid or photofrin. *Lasers Med Sci.* 1999;14(1).
29. A. P, F. H. Light Activated Compounds as Antimicrobial Agents - Patently Obvious? *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2008;1(2).
30. Pimenta FP, Hirata R, Rosa ACP, Milagres LG, Mattos-Guaraldi AL. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. Vol. 57, *Journal of Medical Microbiology.* 2008.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

31. Bohm GC, Gándara L, Di Venosa G, Mamone L, Buzzola F, Casas A. Photodynamic inactivation mediated by 5-aminolevulinic acid of bacteria in planktonic and biofilm forms. *Biochem Pharmacol.* 2020 Jul 1;177.
32. Amos-Tautua BM, Songca SP, Oluwafemi OS. Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. *Molecules.* 2019;24(13).
33. Dailey HA, Gerdes S, Dailey TA, Burch JS, Phillips JD. Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(7):2210–5.
34. Choby JE, Skaar EP. Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *J Mol Biol.* 2016;428(17):3408–28.
35. Jones LM, Dunham D, Rennie MY, Kirman J, Lopez AJ, Keim KC, et al. In vitro detection of porphyrin-producing wound bacteria with real-time fluorescence imaging. *Future Microbiol.* 2020 Mar 1;15(5):319–32.
36. Dietel W, Pottier R, Pfister W, Schleier P, Zinner K. 5-Aminolaevulinic acid (ALA) induced formation of different fluorescent porphyrins: A study of the biosynthesis of porphyrins by bacteria of the human digestive tract. *J Photochem Photobiol B.* 2007;86(1).
37. Zdubek A, Maliszewska I. On the Possibility of Using 5-Aminolevulinic Acid in the Light-Induced Destruction of Microorganisms. *Int J Mol Sci.* 2024;25.
38. Fu J, Hall S, Boon EM. Recent evidence for multifactorial biofilm regulation by heme sensor proteins NosP and H-NOX. Vol. 50, *Chemistry Letters.* 2021.

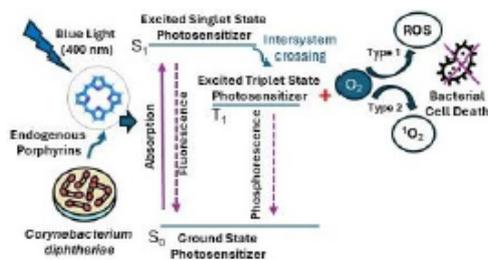
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

39. Fu J, Nisbett LM, Guo Y, Boon EM. NosP Detection of Heme Modulates *Burkholderia thailandensis* Biofilm Formation. *Biochemistry*. 2023;62(16).
40. Lin HY, Chen CT, Huang CT. Use of merocyanine 540 for photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cells. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(11).
41. Strauss WSL, Sailer R, Schneckenburger H, Akgün N, Gottfried V, Chetwer L, et al. Photodynamic efficacy of naturally occurring porphyrins in endothelial cells in vitro and microvasculature in vivo. *J Photochem Photobiol B*. 1997;39(2).
42. Grinholc M, Nakonieczna J, Negri A, Rapacka-Zdonczyk A, Motyka A, Fila G, et al. The agr function and polymorphism: Impact on *Staphylococcus aureus* susceptibility to photoinactivation. *J Photochem Photobiol B*. 2013;129.
43. Gándara L, Mamone L, Dotto C, Buzzola F, Casas A. Sae regulator factor impairs the response to photodynamic inactivation mediated by Toluidine blue in *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;16.
44. Kossakowska M, Nakonieczna J, Kawiak A, Kurlenda J, Bielawski KP, Grinholc M. Discovering the mechanisms of strain-dependent response of *Staphylococcus aureus* to photoinactivation: Oxidative stress toleration, endogenous porphyrin level and strain's virulence. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10(4).
45. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2015;14(8).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

46. Romiti R, Schaller M, Jacob K, Plewig G. High-performance liquid chromatography analysis of porphyrins in *Propionibacterium acnes*. Arch Dermatol Res. 2000;292(6):320–2.
47. Taylor C, Duffy LK, Plumley FG, Bowyer RT. Comparison of spectrofluorometric and HPLC methods for the characterization of fecal porphyrins in river otters. Environ Res. 2000;84(1):56–63.
48. Bjerkan G, Witso E, Bergh K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. Acta Orthop. 2009;80(2):245–50.

Table of Contents



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

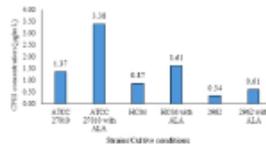


Figure 1. Quantification of coproporphyrin III produced by *C. diphtheriae* strains cultured in the absence and presence of ALA (2 mM). Quantification was performed by HPLC-DAD at the wavelength of 400 nm. Standard deviation = +/- 0.60329 µg/mL. LOD = 0.27 µg/mL and LOQ = 0.82 µg CPHIII, coproporphyrin III

Figure 1. Quantification of coproporphyrin III produced by *C. diphtheriae* strains cultured in the absence and presence of ALA (2 mM). Quantification was performed by HPLC-DAD at the wavelength of 400 nm. Standard deviation = +/- 0.60329 µg/mL. LOD = 0.27 µg/mL and LOQ = 0.82 µg CPHIII, coproporphyrin III

338x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

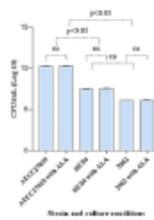


Figure 2. Biofilm cultured of *C. diphtheriae* strains cultivated in the absence and presence of ALA (2 mM). The addition of ALA to the cultures did not result in a notable change in the number of CFU/mL in the biofilms formed. The ATCC27010 strain produced more biofilm than the HC04 and 2962 strains. Statistical differences were evaluated through one-way ANOVA, with a confidence level of 95% ($P < 0.05$). ns, not statistically significant.

Figure 2. Biofilm cultured of *C. diphtheriae* strains cultivated in the absence and presence of ALA (2 mM). The addition of ALA to the cultures did not result in a notable change in the number of CFU/mL in the biofilms formed. The ATCC27010 strain produced more biofilm than the HC04 and 2962 strains. Statistical differences were evaluated through one-way ANOVA, with a confidence level of 95% ($P < 0.05$). ns, not statistically significant.

338x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

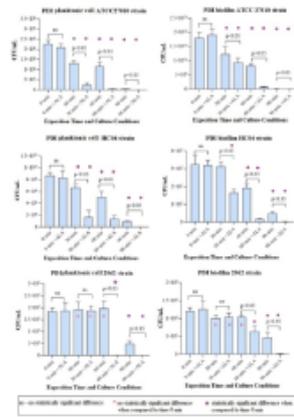


Figure 3. Photodynamic inactivation of planktonic cells and biofilm of *C. diphtheriae* strains cultivated in the absence and presence of ALA 2 mM (+ALA) and using light exposure times of 30 min, 60 min and 90 min. The results was compared with cultures not exposed to light (0 min). The results obtained in the cultures without and with ALA supplementation were also compared. Statistical differences were evaluated through one-way ANOVA, with a confidence level of 95% ($P < 0.05$). ns, not statistically significant.

Figure 3. Photodynamic inactivation of planktonic cells and biofilm of *C. diphtheriae* strains cultivated in the absence and presence of ALA 2 mM (+ALA) and using light exposure times of 30 min, 60 min and 90 min. The results were compared with cultures not exposed to light (0 min). The results obtained in the cultures without and with ALA supplementation were also compared. Statistical differences were evaluated through one-way ANOVA, with a confidence level of 95% ($P < 0.05$). ns, not statistically significant.

338x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

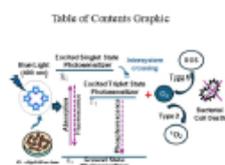


Table of Contents

338x190mm (96 x 96 DPI)