

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**OTIMIZANDO O EFEITO ANTIMICROBIANO DA
TERAPIA FOTODINÂMICA COM
FOTOSSENSIBILIZADORES FENOTIAZÍNICOS PELA
ADIÇÃO DE ETANOL OU CARREADOR DE
OXIGÊNIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Emilia Pithan Prochnow

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**OTIMIZANDO O EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA
FOTODINÂMICA COM FOTOSSENSIBILIZADORES
FENOTIAZÍNICOS PELA ADIÇÃO DE ETANOL OU
CARREADOR DE OXIGÊNIO**

Emilia Pithan Prochnow

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Odontologia, com ênfase em Periodontia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

Orientadora: Prof. Dra. Karla Zanini Kantorski

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**OTIMIZANDO O EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA
FOTODINÂMICA COM FOTOSSENSIBILIZADORES
FENOTIAZÍNICOS PELA ADIÇÃO DE ETANOL OU CARREADOR DE
OXIGÊNIO**

elaborado por
Emilia Pithan Prochnow

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas

COMISSÃO EXAMINADORA

Karla Zanini Kantorski, Prof. Dra.
(Presidente/Orientador - UFSM)



Rafael Guerra Lund, Prof. Dr. (UFPel)



Eduardo José Gaio, Prof. Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 27 de Agosto de 2014.

À minha amada filha **Olga**, que tão logo estará em meus braços. Já és muito especial e faz com que eu queira me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Te amo muito minha mimosa!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora **Karla Zanini Kantorski**, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos, pela orientação nesses dois anos de mestrado, pela compreensão, pelo suporte nos momentos difíceis, pelos conselhos... **Muito obrigada prof!**

Aos professores **Carlos Heitor Cunha Moreira** e **Fabício Batistín Zanatta** pelos ensinamentos e experiências divididos.

Aos professores **Marcos Antonio Villetti**, **Carmem Kloster** e **Roberto Christí Vianna** pela receptividade, conversas e ensinamentos.

Ao meu marido amado, **Jaime Schuler**, que me faz ver a vida com outros olhos, sempre me apoiando, dando suporte para que eu siga em frente e lute pelos meus objetivos. Me tornei uma pessoa melhor e mais forte ao teu lado.

À toda minha família, **Paí e Mãe, Laura e Alexandre, Julia e Bruno, Manuela, Valentina, Catarina e baby da Juju**, pelo incentivo, apoio incondicional, maravilhosos momentos de descontração e felicidade... Sem vocês eu não chegaria até aqui!

Aos amigos do Lepol, especialmente a **Thí, Fran e o Augusto**, foi muito legal ter conhecido e convivido com vocês, certamente tornaram o ambiente de trabalho muito mais leve.

À minha grande amiga **Mari**, sabes o quanto és importante para mim, fizemos essa caminhada juntas, dividimos angústias, alegrias e conquistas. Sem tí não conseguiria ter realizado este trabalho. Obrigada por tudo!

Ao **Daniilo**, sempre disposto a me ajudar. Muito obrigada pelas conversas, experiências compartilhadas e ensinamentos.

À **Cíbele**, que nesta etapa final do trabalho foi incansável. Muito obrigada pelo apoio e ajuda. A Olga e eu agradecemos muito!

Aos professores da banca, **Rafael Guerra Lund** e **Eduardo José Gaio**, por aceitarem participar deste importante momento. Certamente as contribuições aprimorarão meu trabalho.

Ao pessoal da periodontia, em especial às queridas amigas **Lêca, Cami, Ju e Marcela** (que foi "emprestada" à perío) pela amizade, convivência momentos de risadas e descontração.

Às **colegas da turma de mestrado** e ao **Gabi**, pelo convívio, trocas de experiências e agradáveis momentos de descontração. Foi muito bom estar com vocês.

Ao coordenador do PPGCO, professor **Luiz Felipe Valandro**, pela competência e dedicação ao programa de Pós-Graduação. Foi um privilégio sua orientação durante a iniciação científica. Aprendi muito.

A todos os professores do PPGCO, em especial **Thiago Ardenghi** pelos conselhos e ensinamentos transmitidos. És um exemplo para mim. Te admiro muito.

À funcionária **Jéssica Dalcin da Silva** pelo empenho, dedicação, competência e disponibilidade.

Ao pessoal da **Especialização** em Periodontia da UFRGS, pela compreensão, apoio e ensinamentos.

À **CAPES** pelo apoio financeiro, através de bolsa, durante o mestrado.

A todas pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. **Muito obrigada!**

*“Quando tudo nos parece dar errado
Acontecem coisas boas
Que não teriam acontecido
Se tudo tivesse dado certo.”*

Renato Russo

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

OTIMIZANDO O EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM FOTOSSENSIBILIZADORES FENOTIAZÍNICOS PELA ADIÇÃO DE ETANOL OU CARREADOR DE OXIGÊNIO

AUTORA: EMILIA PITHAN PROCHNOW

ORIENTADORA: KARLA ZANINI KANTORSKI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de Agosto de 2014.

Formulações de Azul de Metileno (AM) e Azul de Toluidina (AT) contendo etanol ou carreador de oxigênio foram avaliadas quanto ao efeito antimicrobiano em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Formulações fotoativadas continham os fotossensibilizados (Fs) (250 μM) diluídos em água tamponada (pH 5,6 - acetato de sódio/ácido acético), etanol 10% (tampão:álcool etílico 90:10), etanol 20% (tampão:álcool etílico 80:20) e emulsão com perfluordeceno, tampão e triton-X100 (60:35:5). Biofilmes sem tratamento e expostos ao tampão, etanol 10% e 20% sem fotoativação foram avaliados como controles. A produção de oxigênio singlete dos Fs foi mensurada por meio da foto-oxidação do 1,3-difenilisobenzofuran. Os dados de foto-oxidação e UFC (\log_{10}) foram avaliados por *One-Way* ANOVA e post hoc *Tukey* e *Dunnett*, respectivamente. Teste *t-Student* avaliou diferenças entre os Fs na mesma formulação. AM apresentou maior produção do oxigênio-singlete. Tampão ou etanol 10% não tiveram efeito antimicrobiano. Etanol 20% reduziu significativamente a viabilidade bacteriana (1,2 \log_{10} , $P=0,009$). As menores médias de UFC \log_{10} foram observadas com AM e etanol 10% ($P=0,052$; redução de 2,18 \log_{10}) e 20% ($P=0,053$; redução de 2,18 \log_{10}). Reduções microbianas do AM e AT em água foram de 1,13 \log_{10} e 1,10 \log_{10} , respectivamente. Com o carreador as reduções foram de 1,74 e 1,70 para AM e AT, respectivamente. Formulações de AM contendo etanol são comparáveis a alguns antibióticos no tratamento de biofilmes de *P. aeruginosa in vitro*.

Palavras-chave: Azul de metileno. Azul de toluidina. Biofilme. Laser. Doença periodontal. Terapia fotodinâmica antimicrobiana.

ABSTRACT

Masters Dissertation
Dentistry Sciences Post-Graduation Program
Federal University of Santa Maria

OPTIMIZING THE EFFECT OF ANTIMICROBIAL THERAPY PHOTODYNAMIC WITH PHENOTHIAZINE PHOTSENSITIZERS BY ADDITION OF ETHANOL OR OXYGEN CARRIER

AUTHOR: EMILIA PITHAN PROCHNOW

TUTOR: KARLA ZANINI KANTORSKI

Date and Local of Defense: Santa Maria, 2014, August 27.

Formulations of Methylene Blue (MB) and toluidine blue (TB) with ethanol or oxygen carrier were evaluated for antimicrobial effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Formulations photoactivated had photosensitizers (Ps) (250 μ M) diluted in PBS (pH 5.6 - sodium acetate / acetic acid), 10% ethanol (buffer:ethanol 90:10), 20% ethanol (buffer:ethanol 80:20) and perfluorodecalin emulsion, buffer and triton-X100 (60: 35: 5). The controls were biofilms untreated and without photoactivation. The production of singlet oxygen was measured by photo-oxidation of 1,3-difenilisobenzofuran. The data of photo-oxidation and CFU (\log_{10}) were evaluated by One-Way ANOVA and post hoc Tukey and Dunnett, respectively. Student t-test assessed differences between the Ps in the same formulation. MB showed higher singlet-oxygen production. Buffer or ethanol 10% hadn't antimicrobial effect. Ethanol 20% reduced the bacterial viability (1.2 \log_{10} , $p = 0.009$). The lower mean CFU were observed with MB and ethanol 10% ($P = 0.052$; reduction of 2.18 \log_{10}) and 20% ($P = 0.053$; reduction of 2.18 \log_{10}). Microbial reductions in water MB and TB were 1.13 \log_{10} and 1.10 \log_{10} , respectively. With carredor reductions were 1.74 and 1.70 for MB and TB, respectively. MB formulations containing ethanol are comparable to some antibiotics in treating *P. aeruginosa* biofilms *in vitro*.

Key-words: Methylene blue. Toluidine blue. Biofilm. Periodontitis. Periodontal disease. Photodynamic therapy.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A -	Absorbância
A₀ -	Absorbância inicial
AM -	Azul de metileno
AT -	Azul de toluidina
BHI -	Infusão cérebro coração
cm -	Centímetros
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DO -	Densidade óptica
DPBF -	1,3-difenilisobenzofuran
EROs -	Espécies reativas de oxigênio
Fs -	Fotossensibilizador
J -	Joule
k -	Constante cinética
ln -	Logarítimo neperiano
log -	Logarítimo
LPS -	Lipopolissacarídeos
m -	Metro
min -	Minutos
mL -	Mililitro
mm -	milímetro
mW -	Miliwatts
nm -	Nanômetro
PBS -	Solução salina tamponada com fosfato
PFC -	Perfluorocarbonos
pH -	Potencial hidrogeniônico
rpm -	Rotações por minuto
s -	Segundos
t -	Tempo
TFDa -	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

UFC -	Unidade formadora de colônia
UV -	Ultravioleta
Vis -	Visível
λ -	Comprimento de onda
μM -	Micromolar (mol.L^{-1})
μs -	Microsegundos

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Normas da Revista <i>Photochemistry and Photobiology</i> , utilizadas para preparação do artigo	53
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 ARTIGO	22
Resumo	23
Introdução.....	24
Materiais e Métodos	26
Resultados	29
Discussão	31
Referências	35
Tabelas	42
Figuras	43
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença de natureza infecto inflamatória que acomete os tecidos que sustentam os dentes. O processo etiopatogênico tem como fator etiológico primário o biofilme bacteriano aderido as superfícies dentárias, e interagindo com um hospedeiro suscetível (PAGE; KORNMAN, 1997). Como consequência, ocorre destruição dos tecidos periodontais de suporte ao longo do tempo, resultando na perda do elemento dentário. As periodontites são altamente prevalentes entre indivíduos adultos tanto em países desenvolvidos (ALBANDAR; BRUNELLE; KINGMAN, 1999), como em países em desenvolvimento (SUSIN et al., 2004) tendo importante impacto na qualidade de vida das pessoas (AL-HARTHI et al., 2013).

O tratamento padrão-ouro das doenças periodontais consiste na desorganização mecânica do biofilme, por meio de raspagem e alisamento radicular (COOB, 2002). Com este tratamento, as superfícies dentárias tornam-se biocompatíveis ocorrendo resolução do processo inflamatório e cicatrização tecidual. Estudos longitudinais tem demonstrado que esta modalidade de tratamento associada com um programa periódico de controle do biofilme permitem a estabilidade dos níveis de inserção periodontal e a manutenção dos dentes ao longo dos anos (AXELSSON et al., 2004; CHECCHI et al., 2002; FARDAL et al., 2004).

Contudo, em algumas situações, a efetividade do tratamento pode ser limitada por características anatômicas que dificultam a adequada descontaminação das superfícies radiculares (WENNSTRÖM; DAHLÉN; RAMBERG, 2011). A carga bacteriana remanescente pode impedir o processo de cicatrização (ALWAELI; AL-KHATEEB; AL-SADI, 2013).

Nestas situações clínicas, o uso de antimicrobianos vem sendo proposto (SLOTS et al., 2004). Dentre as estratégias antimicrobianas utilizadas no tratamento das periodontites estão os antibióticos e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa).

Em duas revisões sistemáticas com metanálise, Sgolastra et al. (2012a, 2012b) verificaram diferenças estatisticamente significantes a favor da raspagem e alisamento radicular associada ao uso de antibióticos sistêmicos em comparação ao tratamento mecânico somente. O ganho de inserção clínica foi de 0,21mm (IC 95%,

0,02-0,4) e de 0,42mm (IC 95%, 0,23-0,61) maior com a terapia combinada nas periodontites crônicas e agressivas, respectivamente.

Devemos considerar que antibióticos administrados sistemicamente podem apresentar repercussões também sistêmicas, como infecções oportunistas em outros sítios e reações de hipersensibilidade. Além disso, o desenvolvimento de resistência de bactérias patogênicas é um problema emergente, consequência do grande volume de prescrições, das prescrições inadequadas, e da falta de adesão dos pacientes em seguir integralmente o regime de tratamento. Bactérias multiplicam-se rapidamente, e aquelas que sofrem mutação na presença de antibióticos para favorecer sua sobrevivência, podem tornar-se predominantes na população microbiana (CASSELL; MEKALANOS, 2001; HAMBLIN; HASAN, 2004; YOSHIKAWA, 2002). Assim, o benefício clínico do uso de antibióticos sistêmicos no tratamento das periodontites e os possíveis eventos adversos decorrentes do seu uso devem ser considerados na tomada de decisão.

A TFDa tem sido considerada uma alternativa para o tratamento de infecções localizadas apresentando baixa probabilidade de desenvolver resistência bacteriana (GOULART et al., 2010; HAMBLIN; HASAN, 2004; MAISCH, 2007; WAINWRIGHT et al., 1997)

A TFDa consiste na aplicação de um fármaco fotossensível, conhecido como fotossensibilizador (Fs) que é ativado por luz com comprimento de onda adequado. Uma vez ativado na presença de oxigênio molecular, o Fs gera espécies de oxigênio citotóxicas capazes de danificar componentes celulares como membranas (STARK, 2005), proteínas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004) e ácidos nucleicos (RAVANAT et al., 2000) resultando em morte celular (SOUKOS; GOODSON, 2011).

Decorrida a fotoativação, o Fs absorve energia passando do seu estado fundamental para o estado singleto de alta energia. Nesta forma, o Fs pode perder energia na forma de fluorescência ou calor, voltando ao seu estado fundamental; ou pode passar ao estado tripleto, menos energético, porém mais estável. O Fs no estado tripleto, pode sofrer dois tipos de reações (Figura 1). Na reação tipo I, o Fs reage diretamente com um substrato, como bactérias ou moléculas do meio, produzindo radicais livres e superóxido. Na reação tipo II, o Fs reage com oxigênio molecular formando oxigênio singleto (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; MAISCH, 2007). Os produtos gerados a partir das reações tipo I e II, são citotóxicos, mas o oxigênio singleto tem sido considerado o principal responsável pelo efeito

antimicrobiano da TFDa (GEORGE; KISHEN, 2007; MEISEL; KOCHER, 2005; WAINWRIGHT et al., 1998). As reações tipo I e tipo II podem ocorrer simultaneamente, e a razão entre elas depende da concentração de substrato e oxigênio, e do tipo de Fs utilizado (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

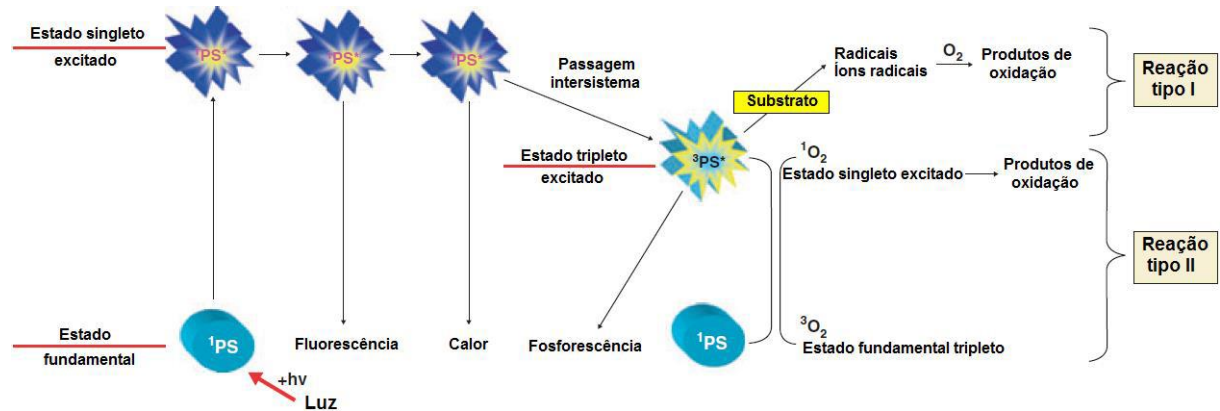


Figura 1- Reações tipo I e tipo II na TFDa (adaptado de SOUKOS; GOODSON, 2011). PS- fotossensibilizador.

Mais de quatrocentos compostos são conhecidos com propriedades fotossensibilizantes incluindo corantes, medicamentos, cosméticos, produtos químicos e substâncias naturais (SANTAMARIA; PRINO, 1972; ZHOU; ZHAO, 2012).

Um Fs ideal deve possuir alto rendimento quântico de oxigênio singlete, alta afinidade de ligação aos microrganismos, amplo espectro de ação, baixa afinidade de ligação as células teciduais, baixa probabilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana, mínimo risco de promover processos mutagênicos, e baixa toxicidade (JORI et al., 2006). O comprimento de onda capaz de ativar o Fs deve estar situado na janela terapêutica (entre 600 e 800 nm), pois bandas de absorção em comprimentos de onda mais curtos, menores que 600 nm, possuem menor penetração tecidual e são mais prováveis de causar fotossensibilidade. Por outro lado, bandas de absorção em altos comprimentos de onda, maiores que 800 nm, não permitirão que os fótons tenham energia suficiente para o estado tripleto do Fs transferir energia ao oxigênio molecular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Em comprimentos de onda acima de 1200 nm, ocorre intensa absorção por moléculas de água inviabilizando o processo (SIBATA; COLUSSI; OLEINICK, 2000).

Os Fs derivados das fenotiazinas, como o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina (AT), possuem estruturas químicas similares, compostas de um sistema de anel aromático tricíclico planar (Figura 2). A carga positiva das suas moléculas favorece a interação com as paredes celulares bacterianas carregadas negativamente (WAINWRIGHT, 2003), induzindo dano localizado e possibilitando penetração intracelular (MERCHAT et al., 1996). Ambos, AM e AT, são considerados hidrofílicos. Contudo, o AT é menos hidrofílico que o AM o que parece favorecer mais a sua interação com componentes da parede celular. O AM, por ser mais hidrofílico, tem a passagem pelos canais proteína-porina da membrana externa bacteriana facilitada, os quais são preenchidos por água (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001). Os espectros de absorção são similares entre os azuis, aproximadamente 660 nm e 630 nm para o AM e AT, respectivamente (ROLIM et al., 2012), dentro da janela terapêutica.

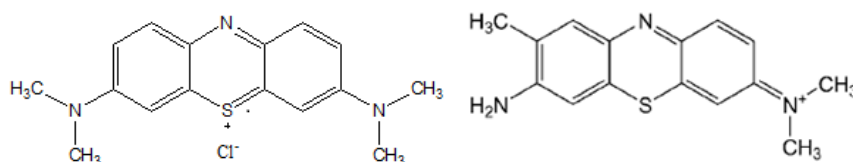


Figura 2 – Estrutura molecular do AM e do AT (RAGÀS et al., 2010).

AM e AT são considerados agentes fotodinâmicos membrana-destrutivos. Eles se ligam aos polifosfatos da membrana externa de bactérias e produzem danos a lipídeos e proteínas. Portanto, sua reatividade com a membrana bacteriana deveria aumentar com sua hidrofobicidade. Assim, o AT por ser menos hidrofílico que o AM seria um Fs de membrana mais efetivo. Bhatti et al. (1998) verificaram que 86,7% do AT aplicado ligou-se a parede celular de *Porphyromonas gingivalis*, enquanto 5,4% ligou-se a membrana plasmática, e somente 7,9% penetrou no citoplasma. Por outro lado, o AM tem demonstrado danificar o DNA bacteriano intercalando-se com a estrutura do ácido nucleico, especialmente em regiões ricas

em guanina-citosina, levando a uma quebra de cadeia e degradação oxidativa das bases via oxigênio singleto (WAINWRIGHT, 2000, 2002). Adicionalmente, entre os componentes celulares, o AM acumula-se preferencialmente na mitocôndria, visto que este corante é atraído pelo ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial (SEVERINO et al., 2003). Assim, o mecanismo pelo qual o efeito antimicrobiano da TFDa ocorre depende da forma como o Fs interage com a membrana externa bacteriana ou se tem capacidade de atravessá-la interagindo com estruturas intracelulares (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001). Comparações do efeito antimicrobiano da TFDa utilizando AM versus AT estão disponíveis em culturas planctônicas de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Nestes estudos, o AT foi mais efetivo na redução da viabilidade bacteriana do que o AM (ROLIM et al., 2012; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001).

A literatura demonstra que bactérias Gram-positivas apresentam maior suscetibilidade a TFDa do que bactérias Gram-negativas (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; WAINWRIGHT, 1998). A membrana externa destas é composta por lipopolissacarídeos (LPS) e canais de porina que atuam como barreira, realizando uma eficiente e seletiva difusão de substâncias para o espaço intracelular. Esta característica torna as bactérias Gram-negativas mais resistentes à ação fotodinâmica de alguns Fs, a menos que a permeabilidade de sua membrana externa seja modificada (NITZAN et al., 1992).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, amplamente encontrada na natureza. É um patógeno oportunista que se multiplica facilmente em pacientes imunocomprometidos, sendo responsável por infecções hospitalares (BALASUBRAMANIAN et al., 2013). *P. aeruginosa* tem se tornado resistente a certos antibióticos, complicando o tratamento das infecções pela habilidade em formar biofilmes (SHARMA et al. 2014). O mecanismo acontece por processos de mutação, os quais alteram a expressão e função dos cromossomos; e pela aquisição de genes resistentes por elemento genéticos móveis, como plasmídeos (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

Em formas planctônicas, periodontopatógenos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* foram suscetíveis a TFDa utilizando como Fs AM (CHAN; LAI, 2003) e AT (BHATTI et al., 1998; QIN et al., 2008). Redução microbiana também tem sido observada quando os microrganismos bucais estão presentes em biofilmes

mono- ou multi-espécies tanto na utilização de AM (DUTRA et al., 2013; FONTANA et al., 2009; GEORGE; KISHEN, 2007) como de AT (O'NEILL; HOPE; WILSON, 2002; RIOS et al., 2011).

Em modelos de periodontite experimental em animais, o uso coadjuvante da TFDa à raspagem e alisamento radicular tem demonstrado benefícios adicionais em comparação ao tratamento mecânico somente. Esses achados tem sido observados como menor perda óssea na região de furca (ALMEIDA et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; FERNANDES et al., 2010; GARCIA et al., 2013a, 2013b). Em ratos, quando a TFDa foi realizada utilizando AT versus AM, nenhuma diferença entre os Fs foi observada com relação a perda óssea (GARCIA et al., 2013b). Entretanto, os autores observaram que a concentração mais baixa de ambos os Fs, AM e AT (100 µg/mL) resultou em melhor efeito do que concentração mais elevada (10 mg/mL).

Em ensaios clínicos randomizados, os resultados parecem convergir para efeitos adicionais com a utilização da terapia combinada (raspagem e alisamento radicular associado com TFDa) (ALWAEELI; AL-KHATEEB; AL-SADI, 2013; GE et al., 2011). Ensaios clínicos randomizados compararam o efeito de raspagem e alisamento radicular versus raspagem associada com TFDa. Alguns estudos utilizaram como Fs o AM (BALATA et al., 2013; CAMPOS et al., 2013; GE et al., 2011; GIANELLI et al. 2012), enquanto outros utilizaram o AT (BASSIR et al., 2013; POURABBAS et al., 2014; RÜHLING et al., 2010; THEODORO et al., 2012). Alguns autores apontaram vantagens para a terapia combinada em termos de redução de profundidade de sondagem, ganho de inserção clínica e redução de sangramento a sondagem (CAMPOS et al., 2013; GE et al., 2011; GIANELLI et al., 2012; THEODORO et al., 2012). Em recente metanálise, SGOLASTRA et al. (2013) verificaram que apesar de diferenças estatísticas significantes a favor da terapia combinada quanto a redução de profundidade de sondagem (média de 0,19 mm, IC 95% 0,07-0,31) e ganho de inserção clínica (média 0,37 mm, IC 95% 0,26-0,47), os benefícios clínicos foram considerados de pequena magnitude. Assim, a TFDa como coadjuvante ao tratamento periodontal não deve ser indicada (SGOLASTRA et al., 2013).

Os ensaios clínicos randomizados que avaliaram a TFDa no tratamento das periodontites utilizaram como Fs o AM ou AT diluído em água. Há evidências de que esta formulação resulta em limitada produção de oxigênio singlete associada com

curta meia vida (MEISEL; KOCHER, 2005) e baixo potencial de difusão do mesmo (OCHSNER et al., 1997).

O efeito antimicrobiano do Fs pode ocorrer pela produção de quantidade suficiente de oxigênio singleto próximo a membrana externa das bactérias, de maneira que este possa se difundir para o interior celular produzindo danos letais (DAHL et al., 1987, 1989). Como consequência, o Fs deve estar em íntimo contato com a célula-alvo para que o oxigênio singleto gerado possa exercer seu efeito antimicrobiano, visto que apresenta pequena distância de difusão (20 nm) e curta meia-vida de duração (MEISEL; KOCHER, 2005; OCHSNER et al., 1997). Entretanto, o solvente utilizado na formulação do Fs pode modificar a meia-vida do oxigênio singleto, sendo consideravelmente maior em etanol (20 μ s) do que em água (4 μ s) (MEISEL, KOECHER, 2005).

George & Kishen (2007), demonstraram que a inclusão de um solvente menos polar do que a água, como o etanol por exemplo, aumentou o efeito antimicrobiano da TFDa frente a biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Dutra et al. (2013) demonstraram que a produção de espécies reativas de oxigênio oriundas da reação tipo I e tipo II foi maior em formulação de AM contendo etanol em comparação a água somente. Esses achados foram atribuídos a maior produção de oxigênio singleto e aumento da sua meia vida (20 μ s), e a menor agregação molecular do AM na presença de etanol.

Severino e colaboradores (2003) demonstraram que as características fotofísicas e fotoquímicas do AM são moduladas pela quantidade e o tipo de dímero formado, atuando na competição pelo estado excitado tripleto do Fs entre transferências eletrônicas (Fs-Substrato) e energéticas (Fs-Oxigênio). As moléculas na forma de dímeros apresentam menor efetividade na captação de energia (PATIL et al., 2002), atuando predominantemente nas reações envolvendo trocas eletrônicas com o substrato (reação tipo I), com menor produção de oxigênio singleto (reação tipo II). Assim, tendo em vista que o oxigênio singleto é o componente citotóxico da TFDa, uma formulação que estabilize a porção monomérica é preferível para fins terapêuticos (GEORGE; KISHEN, 2007).

No biofilme dental, existem áreas com diferentes gradientes de oxigênio, inclusive de anaerobiose (STEWART; FRANKLIN, 2008), onde o efeito antimicrobiano da TFDa pode ser comprometido. Deste modo, há necessidade da

presença de oxigênio molecular para que o efeito antimicrobiano ocorra e o oxigênio singlete seja gerado na reação. Essa limitação foi demonstrada por George & Kishen (2008), pela utilização de uma substância carreadora de oxigênio (perfluorodecaleno) na formulação do Fs durante a TFDa com o intuito de aumentar a disponibilidade de oxigênio e facilitar a propagação de luz durante a irradiação, aumentando assim, a foto-oxidação e a produção de oxigênio singlete, e consequentemente o efeito fotodinâmico.

O uso de perfluorocarbonos (PFC), como, por exemplo, perfluorodecalenos foi proposto como carreador de oxigênio em 1966 (CLARK; GOLAN,1966). Tais substâncias podem dissolver grande volume de gases respiratórios como oxigênio e gás carbônico. Eles são imiscíveis em solução aquosa, devendo ser emulsificados para uso biológico, aumentando a concentração de oxigênio dentro dos microrganismos. A estabilidade dos PFC em soluções aquosas depende da temperatura e de dois mecanismos de ação, coalescência e difusão molecular (FREIRE et al., 2005).

Assim, nosso objetivo foi avaliar as propriedades fotoquímicas e antimicrobianas de formulações contendo AM ou AT diluídos em etanol (10% e 20%) e propriedades antimicrobianas de emulsões contendo carreador de oxigênio. Nossa hipótese conceitual é de que as formulações contendo fotossensibilizador azul de toluidina e emulsões contendo carreador de oxigênio apresentarão melhores propriedades.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as propriedades antimicrobianas dos fotossensibilizadores Azul de Metileno e Azul de Toluidina em formulações contendo etanol a 10% e 20%, ou carreador de oxigênio em biofilmes de *P. aeruginosa in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de oxigênio singleto pelo AM e AT nas formulações contendo etanol por meio de reações fotoquímicas;
- Avaliar o efeito fotodinâmico antimicrobiano do AM e AT nas diferentes formulações em biofilmes de *P. aeruginosa in vitro*.

3 ARTIGO

Carreador de oxigênio ou etanol potencializando o efeito fotodinâmico antimicrobiano de fenotiazínicos em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*.

Emilia Pithan Prochnow¹, Mariteli Righi Martins¹, Cibele Bruno Campagnolo¹, Marcos Antonio Villetti², Roberto Christ Vianna³, Karla Zanini Kantorski*¹

¹. Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço: Rua Marechal Floriano Peixoto 1184, 97015-372, Santa Maria/RS, Brasil.

². Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço: Avenida Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria/RS, Brasil.

³. Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço: Rua dos Andradas 1614, 97010-491, Santa Maria/RS, Brasil.

*Autor correspondente: kzkantorski@hotmail.com (Karla Zanini Kantorski)

RESUMO

Formulações de Azul de Metileno (AM) e Azul de Toluidina (AT) contendo etanol ou carreador de oxigênio foram avaliadas quanto ao efeito antimicrobiano em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Formulações fotoativadas continham os fotossensibilizados (Fs) (250 μ M) diluídos em água tamponada (pH 5,6 - acetato de sódio/ácido acético), etanol 10% (tampão:álcool etílico 90:10), etanol 20% (tampão:álcool etílico 80:20) e emulsão com perfluordecileno, tampão e triton-X100 (60:35:5). Biofilmes sem tratamento e expostos ao tampão, etanol 10% e 20% sem fotoativação foram avaliados como controles. A produção de oxigênio-singlete dos Fs foi mensurada por meio da foto-oxidação do 1,3-difenilisobenzofuran. Os dados de foto-oxidação e UFC (\log_{10}) foram avaliados por *One-Way* ANOVA e post hoc *Tukey* e *Dunnnett*, respectivamente. Teste *t-Student* avaliou diferenças entre os Fs na mesma formulação. AM apresentou maior produção do oxigênio singlete. Tampão ou etanol 10% não tiveram efeito antimicrobiano. Etanol 20% reduziu significativamente a viabilidade bacteriana (1,2 \log_{10} , $P=0,009$). As menores médias de UFC \log_{10} foram observadas com AM e etanol 10% ($P=0,052$; redução de 2,18 \log_{10}) e 20% ($P=0,053$; redução de 2,18 \log_{10}). Reduções microbianas do AM e AT em água foram de 1,13 \log_{10} e 1,10 \log_{10} , respectivamente. Com o carreador as reduções foram de 1,74 e 1,70 para AM e AT, respectivamente. Formulações de AM contendo etanol são comparáveis a alguns antibióticos no tratamento de biofilmes de *P. aeruginosa in vitro*.

Palavras-chave: Azul de metileno. Azul de toluidina. Biofilme. Laser. Doença periodontal. Terapia fotodinâmica antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença de natureza infecto inflamatória que acomete os tecidos que sustentam os dentes (1) podendo resultar na perda do elemento dentario. As periodontites são altamente prevalentes entre indivíduos adultos em países desenvolvidos (2), e em países em desenvolvimento (3) tendo importante impacto na qualidade de vida das pessoas (4).

O tratamento padrão-ouro das doenças periodontais consiste na desorganização mecânica do biofilme por meio de raspagem e alisamento radicular (5). Em algumas situações, as características anatômicas dificultam a adequada descontaminação mecânica (6) e o uso coadjuvante de antibióticos tem sido proposto (7). O benefício clínico desta associação (8,9) e considerações sobre reações adversas e desenvolvimento de resistência bacteriana (10-12) tem colocado em discussão o uso de antibióticos para o tratamento das periodontites. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) vem sendo proposta para o tratamento de infecções localizadas apresentando baixa probabilidade de desenvolver resistência bacteriana (11,13-15).

Diversos ensaios clínicos randomizados compararam o tratamento mecânico versus tratamento mecânico associado com a TFDa sobre a resolução da inflamação e cicatrização dos tecidos periodontais (16-23). Em recente metanálise, SGOLASTRA et al. (2013) (24) verificaram que apesar de diferenças estatísticas significantes a favor da terapia combinada quanto a redução de profundidade de sondagem (média de 0,19 mm, IC 95% 0,07-0,31) e ganho de inserção clínica (média 0,37 mm, IC 95% 0,26-0,47), os benefícios clínicos foram considerados de pequena magnitude.

Nosso estudo se propõe a estudar os mesmos fotossensibilizadores utilizados nos estudos clínicos supracitados (azul de metileno e azul de toluidina) por serem hidrosolúveis, com carga positiva, e por apresentaram intensa absorção dentro da janela terapêutica (25), sendo seguros para uso clínico. Entretanto, nós testamos alterações na formulação com objetivo de aumentar o efeito antimicrobiano.

A adição de etanol na formulação pode resultar em aumento da produção (26,27), meia vida (28), e potencial de difusão (29) do oxigênio singleto. Este é considerado o principal produto antimicrobiano gerado na reação fotodinâmica devido a sua alta atividade oxidativa (28-30). A adição de um carreador de oxigênio pode aumentar a disponibilidade deste em áreas de baixo gradiente de oxigênio ou de anaerobiose comuns nos biofilmes (31), o que pode potencializar o efeito antimicrobiano (32).

A literatura demonstra que bactérias Gram-negativas apresentam menor susceptibilidade a TFDa do que bactérias Gram-positivas (30,33). *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, oportunista que se multiplica facilmente em pacientes imunocomprometidos, sendo grande responsável por infecções hospitalares (34). O mecanismo de resistência desta bactéria, acontece por processos de mutação, os quais alteram a expressão e função dos cromossomas; e pela aquisição de genes resistentes por elementos genéticos móveis, como plasmídeos (35).

Nosso objetivo foi avaliar a TFDa em biofilmes de *P. aeruginosa*, utilizando formulações contendo AM ou AT diluídos em etanol (10% e 20%) e emulsões contendo carreador de oxigênio. Nossa hipótese conceitual é de que a formulação contendo AT e carreador de oxigênio apresentará o melhor efeito antimicrobiano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das formulações: Os Fs utilizados foram azul de metileno e azul de toluidina (Sigma Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil).

As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (milliQ) e álcool etílico (Cromoline®, Diadema, SP, Brasil). Para o preparo das soluções tamponadas a 5,6 foram utilizados ácido acético (Vetec®) e acetato de sódio (Proquímios®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Perfluorodecalin (Acros Organics®, Nova Jersey, EUA) foi utilizado como carreador de oxigênio, e triton-X100 (Sigma Aldrich®) foi utilizado como surfactante no preparo das emulsões.

O pH das soluções foi ajustado com o auxílio de pHmetro DM-20 (Digimed®, São Paulo, SP, Brasil), soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio (Vetec®) foram utilizadas para alcançar o pH desejado.

Formulações: As formulações foram denominadas conforme o Fs e o solvente:

Tampão, tampão 5,6 (acetato de sódio/ácido acético); **AM/água**, AM diluído em tampão; **AM/etanol10%**, AM diluído em uma mistura de tampão e álcool etílico (90:10); **AM/etanol20%**, AM diluído em uma mistura de tampão e álcool etílico (80:20); **AM/carreador**, AM em uma emulsão de perfluorodecaleno:tampão:triton-X100 (60:35:5); **AT/água**, AM diluído em tampão; **AT/etanol10%**, AM diluído em uma mistura de tampão e álcool etílico (90:10); **AT/etanol20%**, AM diluído em uma mistura de tampão e álcool etílico (80:20); **AT/carreador**, AT em uma emulsão de perfluorodecaleno:tampão:triton-X100 (60:35:5).

Caracterização fotoquímica

Mensuração da produção de oxigênio singlete por 1,3-difenilisobenzofuran (DPBF): A produção de oxigênio singlete pelo AM e pelo AT nas diferentes formulações foi mensurada por meio da foto-oxidação do 1,3-difenilisobenzofuran (DPBF) (Sigma Aldrich®), sensível aos produtos resultantes da reação tipo II.

Soluções contendo DPBF (75 μM) e AM (2,5 μM) e, soluções com DPBF (75 μM) e AT (2,5 μM) foram colocadas em uma cubeta de quartzo e os espectros de absorvância avaliados por espectrofotômetro UV/Vis (Varian Cary 50 Bio) a temperatura de 25°C. Após a obtenção da varredura inicial, a formulação foi submetida a irradiações com laser de diodo de baixa potência (TheraLase – DMC, São Carlos, SP, Brasil), com potência útil do emissor de 30 mW por até 30 segundos (com intervalos de 1 segundo até 10 segundos, e 2 segundos até os 30 segundos).

A taxa de oxigênio singlete produzido pelo AM e pelo AT foi avaliada pelo decréscimo na intensidade de absorvância em 415 nm em função do tempo de irradiação. As avaliações foram realizadas em triplicata.

Efeito antimicrobiano do AM e AT nas diferentes formulações em biofilme *in vitro*: Biofilmes de cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* PA01, bactéria Gram-negativa, foram produzidos. Uma suspensão padronizada contendo 10^7 células/mL de microrganismo foi obtida com espectrofotômetro (Instrutherm, UV-1000A, São Paulo, SP, Brasil). Parâmetro de densidade óptica de 1 (DO_{600}) foi utilizado.

Formação dos biofilmes *in vitro*: Espécimes de acrílico com 8 mm de diâmetro foram colocados em placas de 24 poços (TPP, Suíça). 2 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Himedia Laboratories PVT. LTDA., Mumbai, Índia) acrescido de 5% de

sacarose foi pipetado em cada poço. Os espécimes submersos em BHI foram inoculados com 100 µL de suspensão microbiana padronizada (10^7 células/mL) e incubados em agitador orbital (Novatecnica, Modelo NT712, Piracicaba, SP, Brasil) com 75 rpm a 37°C por 5 dias. O caldo foi substituído a cada 24 horas. Decorrido o período de incubação, os espécimes foram lavados com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), com objetivo de remover as células não aderidas.

Inativação fotodinâmica dos biofilmes: O efeito antimicrobiano foi avaliado em formulações com foto-ativação (AM/água, AM/etanol 10%, AM/etanol 20%, AM/carreador, AT/água, AT/etanol 10%, AT/etanol 20%, AT/carreador) e em 3 formulações controles sem foto-ativação (tampão, etanol 10%, etanol 20%). Como controle negativo biofilme sem qualquer tratamento foi utilizado.

Após a lavagem com solução salina, os espécimes foram transferidos para novas placas de 24 poços e imersos em 1 mL de Fs (250 µM) nas diferentes formulações.

Nos grupos sem foto-ativação, a solução do Fs foi mantida em contato com o biofilme durante 15 minutos. Nos grupos com fotoativação, a solução do Fs foi mantida em contato com o biofilme durante 5 minutos sem aplicação de luz (período de incubação) e após, os biofilmes foram irradiados com laser diodo de baixa potência com comprimento de onda de 660 nm, modo de emissão contínua, potência útil de 30 mW, energia de 20 J e densidade de energia de 40 J/cm², durante 10 minutos.

Após, cada espécime contendo o biofilme foi colocado em tubo falcon contendo 10 mL de solução salina e colocado sob agitação em um vórtex (VELP Scientifica, 12dc) com potência de 15 W durante 30 segundos. Da solução

homogeneizada (10^0), diluições decimais (10^{-3} e 10^{-4}) foram realizadas. Alíquotas de 100 μL de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (*Himedia Laboratories PVT. Ltda., Mumbai, Índia*). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, um examinador cego para os grupos experimentais realizou a contagem das colônias formadas nas placas e o cálculo de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de suspensão (UFC/mL).

Cinco espécimes por formulação foram utilizados. O experimento foi realizado em triplicata.

Análise estatística: Dados dos ensaios fotoquímicos e de UFC (\log_{10}) foram expressos em média e desvio-padrão. Diferenças entre grupos foram avaliadas por meio do teste de variância *One-Way ANOVA* e teste post hoc *Tukey* para ensaios fotoquímicos e post hoc *Dunnett* para UFC(\log_{10}). Diferenças entre os tipos de fotossensibilizadores na mesma formulação foram avaliadas pelo teste *t-Student*. Nível de significância de 5% foi utilizado em todas as avaliações.

RESULTADOS

Mensuração da produção de oxigênio singleto por 1,3-difenilisobenzofuran (DPBF)

Os coeficientes de atividade fotodinâmica gerados pela foto-oxidação do DPBF (36) sensível ao oxigênio singleto estão apresentados na Tabela 1.

O Fs AM apresentou maior produção do oxigênio singleto, independente do solvente utilizado quando comparado ao AT. A inclusão do etanol nas formulações não resultou em aumento significativo da produção de oxigênio singleto.

Nas Figuras 1 e 2, podemos observar o decaimento de absorvância do DPBF (75 μM) com AM (2,5 μM) na formulação AM/etanol 10%; e do DPBF (75 μM) com AT (2,5 μM) na formulação AT/água após consecutivas irradiações, respectivamente. O comportamento demonstrado nas Figuras 1 e 2, representam o comportamento de todas as formulações avaliadas.

Os valores médios das constantes cinéticas (s^{-1}) de decomposição do DPBF nas diferentes formulações estão representados graficamente na Figura 3 e 4, para as formulações com AM e AT, respectivamente.

Inativação fotodinâmica dos biofilmes *in vitro*

Os resultados de UFC/mL (\log_{10}) e desvio padrão para as formulações sem fotoativação estão apresentados nas Tabelas 2. Nenhum efeito antimicrobiano foi observado com a solução tampão ou com etanol 10%. Com etanol 20%, houve redução microbiana significativa (aproximadamente 1,2 \log_{10} , $P=0,009$) em relação ao controle (ausência de tratamento).

Os valores médios de UFC \log_{10} e desvio padrão nas formulações submetidas a fotoativação estão apresentados na Tabela 3. Nenhuma das formulações apresentou redução microbiana significativa em relação ao grupo controle. As menores médias de UFC \log_{10} foram observadas nas formulações contendo AM e etanol. Embora a redução microbiana não tenha sido estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, os valores de P foram de 0,052 e 0,053 para etanol/10% e etanol/20%, respectivamente. Nas formulações com carreador de oxigênio, as reduções foram de 1,74 \log_{10} ($P=0,144$) e 1,70 \log_{10} ($P=0,077$) para AM e AT, respectivamente.

O comportamento antimicrobiano do AM e AT diluídos em água ou na emulsão com carreador de oxigênio foram similares. Por outro lado, o AM pareceu ser mais sensível a inclusão do etanol na sua formulação, apresentando menores valores médios de UFC \log_{10} em comparação ao AT, embora a significância estatística não tenha sido detectada.

DISCUSSÃO

Nossos resultados não demonstraram diferença estatística no efeito antimicrobiano sobre biofilmes de *P. aeruginosa* entre AM e AT, independente da formulação empregada. Portanto, nossa hipótese inicial, de que a TFDa utilizando AT e carreador de oxigênio apresentaria o maior efeito antimicrobiano não foi confirmada.

Com a utilização do carreador de oxigênio, AM e AT apresentaram redução microbiana 1,74 \log_{10} e 1,70 \log_{10} , respectivamente. O carreador de oxigênio promove oxigênio no meio, aumentando o potencial de foto-oxidação e a geração de oxigênio singlete (32). Entretanto, essa propriedade não resultou em significativa redução microbiana.

Nós verificamos que etanol 20% apresentou efeito antimicrobiano o que confirma resultados obtidos por Peters et al. (2003) (37). Esses autores verificaram que etanol em concentrações igual ou maior a 20% pode inibir o crescimento de biofilmes mono-espécie, enquanto que em concentrações maiores do que 30% esse efeito é observado em biofilmes multi-espécies. O mecanismo pelo qual o etanol exerce ação antimicrobiana envolve danos à membrana bacteriana e rápida desnaturação de proteínas levando à lise celular (38).

Quando etanol 20% foi utilizado na TFDa com AM e AT, a redução microbiana média aumentou em $0,9 \log_{10}$ e $0,2 \log_{10}$ em comparação ao etanol 20% sem foto-ativação, respectivamente, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa. Assim, esse efeito adicional pode ser atribuído aos produtos gerados a partir das reações tipo I e II do mecanismo fotodinâmico.

A inclusão do etanol nas formulações resultou em redução microbiana média de $2,18 \log_{10}$ e $2,16 \log_{10}$ para AM/etanol 10% e AM/etanol 20%, respectivamente. Com o AT a redução microbiana média foi menor, cerca de $0,58 \log_{10}$ e $1,10 \log_{10}$, respectivamente. Esses resultados apontam que as formulações com AM foram mais sensíveis a inclusão do etanol. A produção de oxigênio singlete com AM e etanol, independente da concentração, foi significativamente maior do que a do AT. Portanto, essa maior redução média do AM em etanol pode ser atribuída a maior produção do oxigênio singlete, que é considerado o principal responsável pela ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica (26,28,30).

Outro aspecto que devemos considerar, é o quanto a inclusão do etanol nas formulações pode otimizar o efeito antimicrobiano em comparação aos Fs diluídos somente em água. Nesse caso, a redução microbiana média foi de $1,13 \log_{10}$, $2,18 \log_{10}$, e $2,16 \log_{10}$ quando o AM foi diluído em água, etanol 10% e etanol 20%, respectivamente. Esses resultados demonstram que a adição do etanol promove uma redução de cerca de $1 \log_{10}$ em relação somente ao uso somente da água na solução. Esse comportamento pode ser atribuído a menor agregação molecular do AM em etanol, resultando em maior proporção de monômeros em relação a dímeros (26,27). Dímeros apresentam menor efetividade na captação de energia (39-41), atuando predominantemente nas reações envolvendo trocas eletrônicas com o substrato (reação tipo I), com menor produção de oxigênio singlete (reação tipo II).

Assim, uma formulação que estabilize a porção monomérica é preferível para fins terapêuticos (26). Outro aspecto refere-se ao aumento da meia vida do oxigênio singlete gerado na presença de etanol, aproximadamente 5 vezes maior em comparação ao produzido na presença de água (28). Isso pode proporcionar maior tempo para a interação do Fs com as células microbianas.

O comportamento do AM e AT quando diluídos em água foi semelhante no que tange ao efeito antimicrobiano, apesar do AM ter produzido significativamente mais oxigênio singlete. Assim, outros fatores podem estar associados com a ação antimicrobiana, como a produção de EROs, que podem ter importante papel na ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica em áreas com baixa disponibilidade de oxigênio ou anaerobiose. Usacheva et al., em 2001 (33) observaram maior efeito antimicrobiano da TFDa com o AT e em menores concentrações em comparação ao AM. Contudo os microrganismos, incluindo *P. aeruginosa*, estavam na sua forma planctônica. Em biofilmes, *P. aeruginosa* pode exibir uma resistência aos antimicrobianos 1000 vezes maior do que em cultura planctônica (42). Este microrganismo pode expressar variações fenotípicas transitórias associadas com sua habilidade de formar biofilme permitindo aumentar sua resistência aos antimicrobianos *in vivo* e *in vitro* (43). Portanto, é plausível que o efeito do AM e do AT em biofilmes de *P. aeruginosa* seja diferente do observado em culturas planctônicas.

Uma limitação do nosso estudo foi o poder estatístico. Nós não conseguimos identificar diferença estatística em relação ao efeito antimicrobiano em qualquer formulação. Yu et al. 2012 (44), verificaram que aztreonam reduziu cerca de 1 log₁₀ a viabilidade celular de biofilmes de *P. aeruginosa* formados sobre células epiteliais. Por outro lado, trombamicina foi mais efetiva com reduções maiores que 4 log₁₀. Em

recente estudo, Elkahtib & Noreddin (2014) (45), observaram que em biofilmes de *P. aeruginosa*, 8 vezes a concentração inibitória mínima de ciprofloxacina e, 4 vezes a de claritromicina foram necessárias para uma redução microbiana de 2,2 log₁₀ e 2,8 log₁₀, respectivamente. Nós verificamos uma redução de 2,18 log₁₀, e 2,16 log₁₀ quando o AM foi diluído em etanol 10% e etanol 20%, respectivamente. Ainda devemos considerar, que Elkahtib & Noreddin (2014) (45) avaliaram um biofilme de 24 horas, enquanto nós avaliamos um biofilme de 5 dias. Esse fator tempo é importante, visto que a literatura demonstra que biofilmes com maior tempo de formação apresentam maior resistência aos antimicrobianos (46,47). Assim, efeito semelhante ao obtido com antibióticos em altas concentrações pode ser obtido com a TFDa utilizando AM diluído em etanol. Como vantagens ressalta-se que a TFDa não apresenta risco ao desenvolvimento de bactérias resistentes (11,13-15) e não resulta em efeitos colaterais em outros sítios do organismo (13).

Conclui-se que o efeito fotodinâmico antimicrobiano pode ser otimizado utilizando fotossensibilizadores estabelecidos pela sua segurança clínica, mas alterando-se o solvente. Modelos microbianos mais complexos devem ser utilizados para suportar os achados iniciais do presente estudo.

REFERÊNCIAS

1. Page, R. C. and K. S. Kornman (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 14, 9-11.
2. Albandar, J. M., J. A. Brunelle and A. Kingman (1999) Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol*.70(1), 13-29.
3. Susin, C., C. F. Dalla Vecchia, R. V. Oppermann, O. Haugejorden and J.M. Albandar (2004) Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol*. 75(7), 1033-1041.
4. Al-harhi, L. S., M. P. Cullinan, J. W. Leichter and W. M. Thomson (2013) The impact of periodontitis on oral health-related quality of life: a review of the evidence from observational studies. *Aust Dent J*. 58(3), 274-277.
5. Cobb, C. M (2002) Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 29, 6-16.
6. Wennström, J. L., G. Dahlén and P. Ramberg (2011) Subgingival debridement of periodontal pockets by air polishing in comparison with ultrasonic instrumentation during maintenance therapy. *J Clin Periodontol*. 38, 820-827.
7. Slots, J (2004) Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol*. 75(11), 1553-1565.
8. Sgolastra, F., R. Gatto, A. Petrucci and A. Monaco (2012a) Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 83(6), 731-743.

9. Sgolastra, F., R. Gatto, A. Petrucci and A. Monaco (2012b) Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 83(6), 1257-1269.
10. Cassell, G. H. and J. Mekalanos (2001) Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *JAMA.* 285(5), 601-605.
11. Hamblin, M. R. and T. Hasan (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 3, 436-450.
12. Yoshikawa, T. T (2002) Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *J Am Geriatr Soc.* 50(7), 226-229.
13. Goulart, R. C., M. Bolean, T. P. Paulino, G. Thedei, S. L. Souza, A. C. Tedesco and P. Ciancaglini (2010) Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 28, 53-60.
14. Maisch, T. (2007) Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 22, 83-91.
15. Wainwright, M., D. A. Phoenix, J. Marland, D. R. Wareing and F. J. Bolton (1997) A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *Immunol Med Microbiol.* 19, 75-80.
16. Balata, M. L., L. P. de Andrade, D. B. N. Santos, A. N. Cavalcanti, U. R. Tunes, E. del P. Ribeiro and S. Bittencourt (2013) Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe

- chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. *J Appl Oral Sci*, 21(2), 208-214.
17. Campos, G. N., S. P. Pimentel, F. V. Ribeiro, R. C. V. Casarin, F. R. Cirano, C. H. C. Saraceni and M. Z. Casati (2013) The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 28, 317-324.
18. Ge, L., R. Shu, Y. Li, C. Li, L. Luo, Z. Song, Y. Xie and D. Liu (2011) Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planning in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg*. 29, 33-37.
19. Bassir, S. H., N. Molesmi, R. Jamali, S. Mashmouly, R. Fekrazad, N. Chiniforush, A. R. Shamsiri and H. Nowzari (2013) Photoactivated disinfection using light-emitting as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 40, 65-72.
20. Pourabbas, R., A. Kashefimeher, N. Rahmanpour, Z. Babaloo, A. Kishen, H. C. Tenenbaum and A. Azarpazhooh (2014) et al. Effects of photodynamic therapy on the clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split- mouth randomized clinical trial. *J Periodontol*.
21. Gianelli, M., L. Formigli, L. Lorenzini and D. Bani (2012) Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. A randomized split-mouth clinical trial. *J Clin Periodontol*. 39, 962-970.
22. Theodoro, L. H., S. P. Silva, J. R. Pires, G. H. G. Soares, A. E. F. Pontes, E. P. Zuza, D. M. P. Spolidório, B. E. C. de Toldedo and V. G. Garcia (2012) Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with

- nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci.* 27, 687-693.
23. Rühling, A., J. Fanghänel, M. Houshmand, A. Kuhr, P. Meisel, C. Schwahn and T. Kocher (2010) Photodynamic therapy of persistente pockets in maintenance patients – a clinical study. *Clin Oral Invest.* 14, 637-644.
24. Sgolastra, F., A. Petrucci, R. Gatto, G. Marzo and A. Monaco (2013) Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 28, 669-682.
25. Rolim, J. P., M. A. de-Melo, S. F. Guedes, F. B. Albuquerque-Filho, J. R. de Souza, N. Nogueira, I. C. Zanin and L. K. Rodrigues (2012) The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B.* 106, 40-46.
26. George, S. and A. Kishen (2007) Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt.* 12, 29-34.
27. Dutra, D. A., J. O. Barbosa, J. C. Junqueira, A. O. Jorge, M. A. Villetti and K. Z. Kantorski (2013) Evaluation of the photosensitizer methylene blue in different formulations for use in anti-microbial photodynamic therapy. Dissertation, Federal University of Santa Maria.
28. Meisel, P. and T. Kocher (2005) Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 79, 159-170.
29. Ochsner, M. J. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol B.* 39, 1-18.

30. Wainwright, M. (1998) A comparison of the bactericidal and photobactericidal activities of aminoacridines and bis(aminoacridines). *Lett Appl Microbiol.* 26, 6, 404-406.
31. Stewart, P. and M.J. Franklin (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 6, 3, 199-210.
32. George, S. and A. Kishen (2008) Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. *J Endod.* 34, 1119-1123.
33. Usacheva, M. N., M. C. Teichert and M. A. Biel (2001) Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 29, 165-173.
34. Balasubramanian, D., L. Schneper, H. Kumari and H. Mathee (2013) A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 41, 11-20.
35. Lister, P. D., D.J. Wolter and N. D. Hanson (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microb Rev.* 22(4), 582-610.
36. Hadjur, C., N. Lange, J. Rebstein, P. Monnier, H. van den Bergh and G. Wagnières (1998) Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta (tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. *J Photochem Photobiol B.* 45, 170-178.

37. Peters, M. B., R. M. Ward, H. S. Rane, S. A. Lee and M. C. Nover (2013) Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *Antimicrob Agents Chemoter.* 57, 74-82.
38. Macdonnell, G. and A. D. Russel (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*, 12: 1,147-179.
39. Patil, K. R. and P. Talap (2002) Self-aggregation of methylene blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄ NBr and urea. *Phys Chem Chem Phys.* 2, 4313-4317.
40. Severino, D., H. C. Junqueira, M. Gugliotti, D. S. Gabrielli and M. S. Baptista (2003) Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochem Photobiol.* 77, 459-468.
41. Gabrielli, D. S., E. Belisle, D. Severino, A. J. Kowaltowski and M. S. Baptista (2004) Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem Photobiol.* 79, 227-232.
42. Nickel, J. C., I. Ruseska, J. B. Wright and J. W. Costerton (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother.* 27, 619-624.
43. Drenkard E. and F.M. Ausubel (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature.* 416, 6882, 740-743.
44. Yu, Q., E. F. Griffin, S. Moreau-Marquis, J. D. Schwartzman, B. A. Stanton and G. A. O'Toole (2012) *In vitro* evaluation of tobramycin and aztreonam versus *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystics fibrosis-derived human airway epithelial cells. *J Antimicrob Chemother.* 67, 2673-2681.

45. Elkhatib W. and A. Noreddin (2014) Efficacy of ciprofloxacin-clarithromycin combination against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm sing *in vitro* experimental model. Microbi Drug Resist, Jul 22.
46. Anwar, H., J. L. Strap and J. W. Costerton (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrob Agents Chemother. 36(7), 1347-1351.
47. Singla, S., K. Harjai and S. Chhibber (2013) Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. J Antibiot. 66(2), 61-66.

Tabelas

Tabela 1. Coeficiente de atividade fotodinâmica nas diferentes formulações através da foto-oxidação do DPBF.

Grupos	AT	AM	p
Água	0,044 ^α	0,104 *	0,00
Etanol 10%	0,067 ^β	0,113 *	0,00
Etanol 20%	0,062 ^{α,β}	0,114 *	0,00

Linhas: teste *t-Student*.

Colunas: teste One-way ANOVA e post hoc *Tukey* entre formulações com mesmo pH. Símbolos diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$). Símbolos iguais representam igualdade estatística ($P \geq 0,05$).

Tabela 2. Média UFC/ml (\log_{10}) e desvio padrão de *P. aeruginosa* após exposição as formulações sem fotoativação.

	<i>P. aeruginosa</i> (média \pm dp)
Controle	6,60 (\pm 0,44)
Tampão	6,22 (\pm 0,30)
Etanol 10%	6,00 (\pm 0,72)
Etanol 20%	5,33 (\pm 0,45)*

Coluna: Teste *One-Way* ANOVA e post hoc *Dunnnett*. *Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0,05$).

Tabela 3. Média UFC/ml (\log_{10}) e desvio padrão de *P. aeruginosa* após terapia fotodinâmica antimicrobiana com diferentes formulações.

	AM	AT	p
Controle	6,60 (\pm 0,44)		
Água	5,47 (\pm 0,61)	5,50 (\pm 0,37)	0,93
Etanol 10%	4,42 (\pm 1,97)	6,01 (\pm 0,57)	0,12
Etanol 20%	4,44 (\pm 1,96)	5,10 (\pm 2,30)	0,63
Carreador	4,86 (\pm 0,50)	4,90 (\pm 0,29)	0,86

Linha: Teste *t-Student*.

Coluna: Teste *One-Way* ANOVA e post hoc *Dunnnett*. *Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0,05$).

Figuras

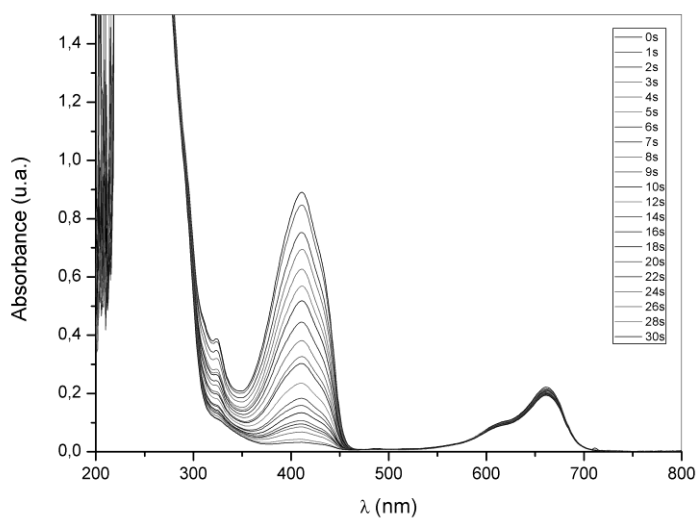


Figura 1. Decaimento de absorbância do DPBF (75 μM) com AM (2,5 μM).

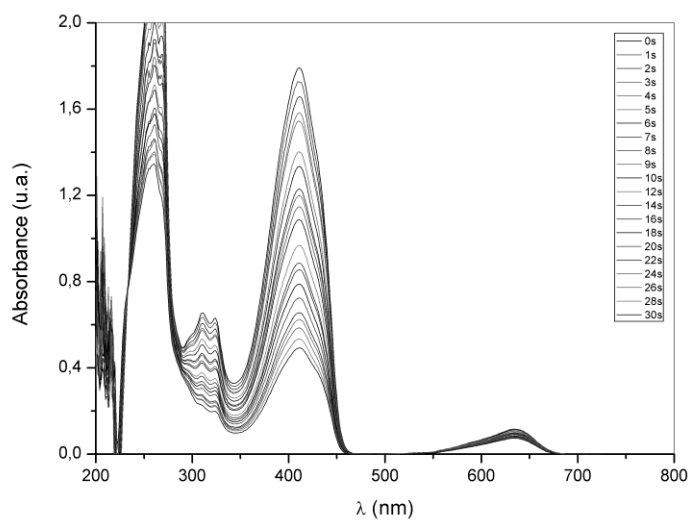


Figura 2. Decaimento de absorbância do DPBF (75 μM) com AT (2,5 μM).

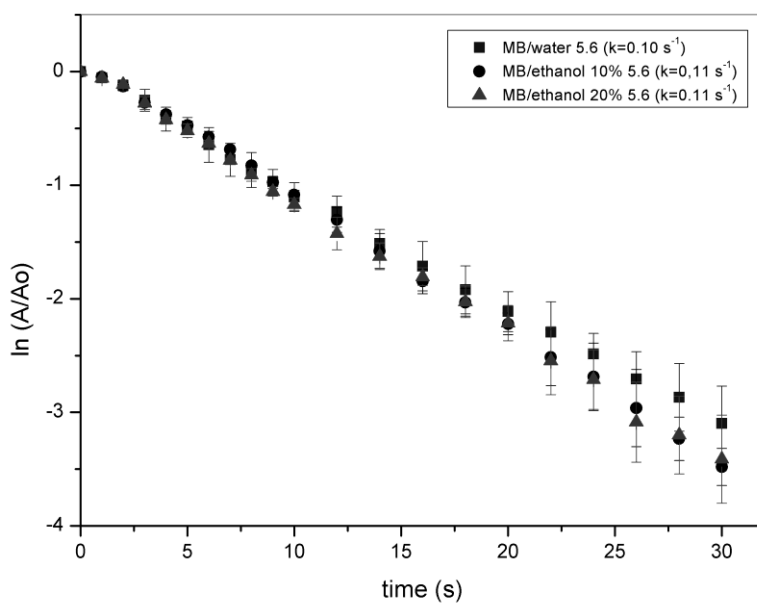


Figura 3. Cinética de decomposição fotolítica do DPBF ($k=s^{-1}$) com AM em função do tempo (s).

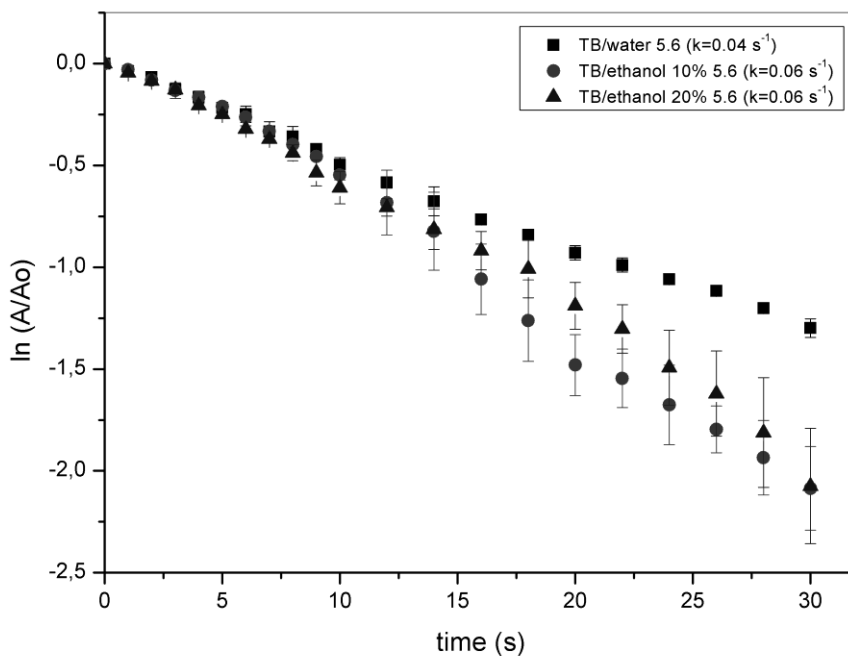


Figura 4. Cinética de decomposição fotolítica do DPBF ($k=s^{-1}$) com AT em função do tempo (s).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo não demonstrou diferença estatística no efeito antimicrobiano sobre biofilmes de *P. aeruginosa* entre AM e AT, independente da formulação empregada. A utilização do carreador de oxigênio e etanol em formulações contendo AM e AT apresentou redução microbiana, porém sem diferença estatística significativa.

O efeito fotodinâmico antimicrobiano pode ser otimizado utilizando fotossensibilizadores estabelecidos pela sua segurança clínica, mas alterando-se o solvente. No entanto, modelos microbianos mais complexos devem ser utilizados para suportar os achados iniciais do presente estudo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANDAR, J. M.; BRUNELLE, J. A.; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 1, p. 13-29, 1999.

AL-HARTHI, L. S. et al. The impact of periodontitis on oral health-related quality of life: a review of the evidence from observational studies. **Australian Dental Journal**, v. 58, n. 3, p. 274-277, 2013.

ALMEIDA, J. M. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 11, p. 2156-2165, 2008.

ALWAELI, H. A.; AL-KHATEEB, S. N.; AL-SADI, A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **Lasers in Medical Science**, 2013.

AXELSSON, S. et al. Effect of combined caries-preventive methods: a systematic review of controlled clinical trials. **Acta Odontologica Escandinavica**, v. 62, n. 3, 2004.

BALASUBRAMANIAN, D. et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 11-20, 2013.

BALATA, M. L. et al. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 2, p. 208-214, 2013.

BASSIR, S. H. et al. Photoactivated disinfection using light-emitting as na adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, p. 65-72, 2013.

BHATTI, M. et al. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochemistry and Photobiology**, v. 285, p. 370-376, 1998.

CAMPOS, G. N. et al. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 28, p. 317-324, 2013.

CARVALHO, A. S. et al. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 11, p. 735-740, 2011.

CASSELL, G. H.; MEKALANOS, J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. **Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 5, p. 601-605, 2001.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p. 279-293, 2004.

CHAN, Y.; LAI, C-H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 8, p. 51-55, 2003.

CHECCHI, L. et al. Retrospective study of tooth loss in 92 treated periodontal patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 7, p. 651-656, 2002.

CLARK, L.C.; GOLLAN, F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. **Science**, v. 152, n. 3730, p. 1755-1756, 1966.

COBB, C. M. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, s. 2, p. 6-16, 2002.

DAHL, T. A.; MIDDEN, W. R.; HARTMAN, P. E. Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, n. 3, p. 345-352, 1987.

DAHL, T. A.; MIDDEN, W. R.; HARTMAN, P. E. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 4, p. 2188-2194, 1989.

DUTRA, D. A. M. et al. Avaliação do fotossensibilizador azul de metileno em diferentes formulações para uso em terapia fotodinâmica antimicrobiana [dissertação]. Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

FARDAL, O.; JOHANNESSEN, A.C.; LINDEN, G.J. Tooth loss during maintenance following periodontal treatment in a periodontal practice in Norway. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 7, p. 550-555, 2004.

FERNANDES, L. A. et al. Radiographic assessment of photodynamic therapy as an adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, n. 3, p. 237-243, 2010.

FONTANA, C. R. et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, p. 751-759, 2009.

FREIRE, M. G. et al. Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 286, p. 224-232, 2005.

GARCIA, V. G. et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 4, p. 556-565, 2013a.

GARCIA, V. G. et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, 2013b.

GE, L. et al. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planning in the treatment of chronic periodontitis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2011.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 9, p. 1119-1123, 2008.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, n. 3, p. 29-34, 2007.

GIANELLI, M. et al. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. A randomized split-mouth clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, p. 962-970, 2012.

GOULART, R. C. et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, s. 1, p. 53-60, 2010.

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

JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006.

LISTER, P. D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v. 22, p. 83-91, 2007.

MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 79, n. 2, p. 159-170, 2005.

MERCHAT, M. et al. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 35, p. 149-157, 1996.

NITZAN, Y. et al. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 89-96, 1992.

O'NEILL, J. F.; HOPE, C. K.; WILSON, M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 31, p. 86-90, 2002.

OCHSNER, M. J. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontology** **2000**, v. 14, p. 9-11, Jun 1997.

PATIL, K. R.; TALAP, P. Self-aggregation of methylene blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄ NBr and urea. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 2, n. 19, p. 4313-4317, 2002.

PETERS, M. B. et al. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 74-82, 2013.

POURABBAS, R. et al. Effects of photodynamic therapy on the clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. **Journal of Periodontology**, 2014.

QIN, Y. et al. Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. **Lasers in Medical Science**, v. 23, p. 49-54, 2008.

RAGÀS, X. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 384-390, 2010.

RAVANAT, J.L. et al. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40601-40604, 2000.

RIOS, A. et al. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 6, p. 856-859, 2011.

ROLIM, J. P. M. L. et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 106, p. 40-46, 2012.

RÜHLING, A. et al. Photodynamic therapy of persistente pockets in maintenance patients – a clinical study. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, p. 637-644, 2010.

SANTAMARIA, L.; PRINO, G. List of photodynamic substances. **Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry**, v. 3, Pt 1: XI-XXXV, 1972.

SEVERINO, D. et al. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 459-468, 2003.

SGOLASTRA, F. et al. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 6, p. 731-743, 2012a.

SGOLASTRA, F. et al. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 6, p. 1257-1269, 2012b.

SGOLASTRA, F. et al. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 669-682, 2013.

SHARMA, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals**, v.42, p. 1-7, 2014.

SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L. Photodynamic Therapy: A new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-878, 2000.

SLOTS, J. Systemic antibiotics in periodontics. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 11, p. 1553-1565, 2004.

SOUKOS, S. N.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 143-166, 2011.

STARK, G. Functional consequences of oxidative membrane damage. Review. **Journal of Membrane Biology**, v.1, p. 1-16, 2005.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199-210, 2008.

SUSIN, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 7, p. 1033-1041, 2004.

THEODORO, L. H. et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. **Lasers in Medical Science**, v. 27, p. 687-693, 2012.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.

WAINWRIGHT, M. et al. A comparison of the bactericidal and photobactericidal activities of aminoacridines and bis(aminoacridines). **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 404-406, 1998.

WAINWRIGHT, M. et al. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75-80, 1997.

WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 4, p. 381-394, 2000.

WAINWRIGHT, M. Pathogen inactivation in blood products. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 127-143, 2002.

WAINWRIGHT, M; GIDDENS, R. M. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. **Dyes and Pigments**, v. 57, p. 245-257, 2003.

WENNSTRÖM, J. L.; DAHLÉN, G.; RAMBERG, P. Subgingival debridement of periodontal pockets by air polishing in comparison with ultrasonic instrumentation during maintenance therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 9, p. 820-827, 2011.

YOSHIKAWA, T. T. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? **Journal of American Geriatrics Society**, v. 50, n. 7, p. 226-229, 2002.

ZHOU, C. H.; ZHAO, X. Chemically modified fullerene derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: a first-principles study. **Journal of Computational Chemistry**, v. 33, n. 8, p. 861-867, 2012.

ANEXO A - Normas da Revista *Photochemistry and Photobiology*, utilizadas para preparação do artigo.

General Information

Photochemistry and Photobiology publishes peer-reviewed, original Research Articles, Rapid Communications, Research Notes, Technical Notes, Invited Perspective ("Highlight") Articles, Methods Papers and Invited Reviews. **Research Notes** and **Technical Notes** should follow the outline of regular Research Articles (see below) but not exceed 4 printed journal pages.

Perspective Articles, **Review Articles** and **Methods Papers** are usually published only after agreement with the Editor. Contact the Editor-in-Chief, Jean Cadet (jean.cadet@cea.fr) if you wish to submit such a paper. The outline of these papers is less strict but the Abstract, Introduction, and Conclusion are obligatory parts.

Review Articles are published with Author portraits and bibliographies and will be complimentary given Free access.

Topics span from Photochemistry, Photophysics and Phototechnology to Photosensory and Circadian Biology, Photosynthesis, Bio- and Chemiluminescence, Photomedicine, Photoprotection, Environmental Photobiology UV Effects and Vision.

The Journal occasionally publishes **Special Issues** which focus attention on specific areas of current interest. Manuscripts for **Special Issues** are either invited by a Guest Editor or contributed; in both cases they are peer-reviewed.

The editorial policy of the Journal is to publish manuscripts of the highest quality, combining scientific rigor, clarity, and brevity with rapid publication. To this end, all manuscripts are carefully reviewed by at least two independent specialists in the field and every effort is made to provide useful editorial assistance to authors.

HUMAN AND ANIMAL SUBJECTS

Journal policy requires that "research reported in *Photochemistry and Photobiology* using human or animal subjects or any tissue derived there from or recombinant DNA, shall have been conducted in accord with accepted ethical and humane practices, and shall have been approved by the pertinent institutional and/or governmental oversight group(s)."

Author Guidelines

For additional assistance visit Author Services for journal authors, now available at <http://authorservices.wiley.com>.

Manuscripts should be written in clear, concise English. Non-native English speakers are encouraged to have their manuscript language-edited before submission. You may find further information at: http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp.

OVERVIEW and file types

Manuscripts for *Photochemistry and Photobiology* must be submitted via the Scholar One online submission system (<http://mc.manuscriptcentral.com/php>).

The **main text** and **tables** should be uploaded in the form of Microsoft Word or RTF (Rich Text Format) - files. **Figures** and **Image files** must be uploaded separately from the text. Preferred formats are EPS or PDF for line art or combination images, TIFF for photographic images. See below for required resolutions. The written document and the figures will be merged into a single PDF file as part of the submission process.

A **Graphical Abstract** image and text should be uploaded as "Supplementary files for online purpose". The graphical abstract is intended to incite further reading and to help identify which papers are most relevant to the reader; it should be kept simple and clear to be easily understood by a larger audience. The image should relate

to, but does not have to be part of the paper. Recommended formats are JPEG, GIF, TIFF and EPS. A single image is preferred; avoid multiple panels. Avoid text in the image as much as possible, for any lettering or numbers use a large font. Colour is encouraged. A short, explicative text of not more than 100 words should be contained in a separate DOC-file.

Photochemistry and Photobiology urges authors to use the **manuscript template** available at: <http://mc.manuscriptcentral.com/php> as an easy tool to ensure that the manuscripts follow the journal format. Double space manuscript, references list, tables and figure legends. **Include page numbers and line numbering.** Use italics for scientific names only. Boldface, italic, subscript and superscript word-processing commands should be retained.

Footnotes should be avoided. If necessary, use standard footnote symbols in the order †, ‡, §, ||, ¶. Footnote the title only to show (a) that some or all of the material was presented at a meeting (give name, dates, and location of meeting), or (b) dedication of the paper. Current address of an author can be given in a footnote to the author's name.

Every paper by two or more authors must have a footnote to one author's name: "*Corresponding author: e-mail address (name)" The superscript * is reserved to identify the corresponding author.

Assemble the manuscript with a separate **Title page**. Section headings are: **Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Tables, Appendix** if needed, and **Figure Captions**. The Results and Discussion sections may be combined. The section heading Conclusion is allowed but not required. Section headings are capitalized. Do not use paragraph numbering.

Most figures will be printed in one-column width (8.3 cm). To avoid delays in production please test the legibility of your figures by photocopying them to this size. Complex figures may be printed over two columns, i.e. ~16.5 cm width.

Manuscript Format

TITLE PAGE

Use upper case for the first letter of each word in the title. Prepositions with 4 or fewer letters should be lower case. Do not use abbreviations in the title.

Name all authors with their full first and last names, as they should appear in print., followed by their institutional affiliations. Do not include titles or degrees. If authors are not all at the same institution, use superscript Arabic numerals (1,2,3...etc.) to indicate each author's affiliation.

Asterisk (*) the name of the corresponding author and provide the e-mail address.

ABSTRACT

The Abstract should consist of a single paragraph without subheadings and no more than 200 words., The intent of the study as well as the experimental approach, results, and significance of findings should be described in a concise manner. Footnotes and undefined abbreviations should not be used. Citation of previous work is discouraged; if a citation must be used, the form should be: [Jones, A. (1990) *Photochem Photobiol*, **58**, 79–83]. The Abstract should give a clear understanding of the paper's content also when read as a stand-alone text.

INTRODUCTION

The Introduction should provide readers with the purpose of the study and a concise review of pertinent literature. An extensive review of the literature should not be presented.

Spell out abbreviations the first time they are used in the text. Abbreviation lists are not printed but can, if necessary, be added as "supporting material".

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures should be described concisely, but with sufficient detail to allow repetition by experienced researchers. Previously published procedures must be cited and any significant variations described. For specialty items and difficult to find commercial vendors please provide the manufacturer's name and location.

RESULTS

A concise description of the results should be given, referring to the figures and tables. Only essential figures and tables should be included; often one or two sentences can be used instead of a simple bar graph. The same data should not be presented in both a figure and a table.

Do not embed figures in the text. Figures should be uploaded separate from the text file. They may all be contained in one file.

Tables, Structures and Schemes should be included in the text file.

Number all illustrations, tables and references in the order they're first cited in the text. Use Arabic numerals for both figures and tables: Fig. 1, Table 1 etc. Indicate the desired location of illustrations and tables in the text in the following manner:

>Figure1<

>Table1<

>Scheme 1<

Use the "Système International d'Unités" (SI) for quantities and units. Non-standard units must be defined. All nomenclature should follow established rules.

DISCUSSION

The Results and Discussion sections can be combined, if the logical sequence of material is improved thereby.

The discussion should be concise and not include unfounded speculation. Do not repeat the results from the previous section.

ACKNOWLEDGEMENTS

Technical assistance, advice from colleagues, gifts and financial support are acknowledged following the Discussion section. Begin at left margin with "*Acknowledgments*"; text of acknowledgment section follows on same line.

Previously published work. If any of the work has been previously published, the reference must be given. It is the author's responsibility to obtain copyright approval and include the appropriate acknowledgements of the original work.

SUPPORTING MATERIAL

Material that is supplementary to the printed text of an article (eg video clips, extra images, tables, lists of abbreviations etc.) can be hosted online with the journal at the discretion of the Editor.

Authors are required to provide a legend (include with your figure legends) explaining the content of the supplementary file(s).

Specific author guidelines for submitting supporting material can be found

at:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>

If supporting materials are to be posted online, please indicate in the text "(see Supporting Materials)".

Also include the following section in your manuscript before the references:

SUPPORTING MATERIALS

Table Sx and Figure Sx can be found at DOI: xxxx-xxxxxx.s1.

Authors may wish to submit supplementary materials for the intention of the reviewers and associate editors only (not to be posted on the web). In either case you will indicate the audience for whom the files are intended at the time of submission.

REFERENCES

For reference citations in text, use numbers in parentheses in the order of appearance. The references should be listed at the end of the paper, in numerical order. Each citation must have a distinct number (no multiple references). The names of all authors should be given; do not use"et al." in the list of references.

Submitted and in press articles can be included with the references if the journal is identified and complete title given. Provide the DOI number as soon as it is available.

Unpublished information should appear in the text only, as (J. Jones, unpublished data) or (J. Jones, personal communication).

Use the following format, including punctuation, for references (see Chem. Abstracts or Index Medicus for journal name abbreviations). Include both first and last page numbers.

Journal article:

1. Borkman, R. F., J. D. Tassin and S. Lerman (1981) The rates of photodestruction of tryptophan residues in human and bovine lens proteins. *Exp. Eye Res.* 32, 747–754.

Book:

2. Frolik, C.A. and J. A. Olsen (1984) Extraction, separation and chemical analysis of retinoids. In *Retinoids Vol. 1*. (Edited by M. B. Sporn, A. B. Roberts and D. S. Goodman), pp. 182–233. Academic Press, New York.

or

3. Turro, N. J. (1978) *Modern Molecular Photochemistry*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.

Material Accessed at a Website:

FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition (2004) Tattoos and Permanent Makeup. Available at: <http://www.crsan.fda.gov/~dms/cos-204.html>. Accessed on 1 June 2004.

Thesis or Dissertation:

KäÙ, H. P. S. (1995) Die Struktur des primären Donators P700 in Photosystem Untersuchungen mit Methoden der stationären und gepulsten Elektronenspinresonanz. Ph.D. thesis, Technische Universität Berlin.

Proceedings:

Kodera, Y. and H. Mino (1992) Pulsed EPR study of tyrosine-Z⁺ in photosystem II. In Research in Photosynthesis, Vol. II, (Edited by N. Murata), pp. 5.57–5.60. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Proceedings of the IXth International Congress on Photosynthesis, Nagoya, Japan, 30 August–4 September 1992.

In Press:

Dewar, M. S. J. and W. Thiel (1997) Ground states of molecules. J. Am. Chem. Soc. (In press, DOI: XXXXX.xxxxxx)

TABLES

Tables should be prepared in Word or imported from Excel and contained in the text file, placed after the references. To label tables, begin at left margin "Table 1." The caption follows immediately on the same line. Use the footnote symbols as described above, beginning with † on each table. If a table has more than six footnotes, double the symbols in sequence: ††, etc. Literature citations are given as in the text (a number in parentheses corresponding to the number in the Reference list).

SCHEMES AND STRUCTURES

All schemes and structures should be included in the text file. Refer to these as schemes and label either as Scheme 1, Scheme 2, etc or bold numbers 1, 2, etc. Structures will, in general, be printed up to 8.3 cm wide. Larger more complex drawings may be printed at up to 16.5 cm in width. All significant details, fonts, super- and subscripts should be clear at this size.

FIGURES

All figures must be uploaded separately from the text, with the figure number indicated.

Preferred formats are: EPS or PDF for line art or combination images, TIFF for photographic images. Office formats may be acceptable but the printed result cannot be guaranteed.

Acceptable resolutions: Line art or combination images should be saved at 600 dpi. The preferred width is 175 mm. Photographic images must have a resolution of 300 dpi at final size.

More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Color figures will be printed free of charge if determined scientifically necessary by the Editor. For printing of optional **color**, the Editorial Office will provide current costs. Color art should be in RGB mode.

Your online publication will contain all figures submitted in color even if not deemed scientifically necessary. If you want to take advantage of this feature, please make sure your figures are of acceptable quality if printed in color or black and white and that the legends are comprehensible in both cases.

Reproduction in the journal will be identical, except for size, to the figure supplied. Flaws cannot be corrected. Figures which in the Editor's opinion will not reproduce well will need to be replaced and could delay publication.

Keep the following points in mind when preparing figures:

Figure legends: Significant experimental details can be given, avoiding repetition of the text. Symbols and abbreviations in legends must agree with those in figures. Abbreviations must also agree with those in the text. Define error bars in figure legends.

Be consistent in the use of **font type and –size** within - and between figures. Arial, Times, Times New Roman and Helvetica are recommended fonts. **Lines** in graph axes and graphs should not be thinner than 0.5 pt.

The standard width for figures is 67–83 mm (one column). Letters, numbering and any symbols on a figure (including inserts) must be large enough to be clearly legible after the figure is reduced to 83 mm width. Authors are strongly encouraged to test the legibility of figures by photocopying them to this size. **A font size** of 10 is suitable for figures of up to 100 mm in width. An original figure size around 100 mm width is preferred. **Maximum length** for an illustration is 235 mm.

Fields filled with dots of varying density (as in many bar graphs) do not reproduce well; use black, white and grey scale colors and well-spaced dashed or solid lines at varying angles.

Do not box or frame graphs, data, schemes, or illustrations.

Use of a third dimension in figures that does not add information is discouraged.

Multi-panel figures: The labels a, b, c etc. must appear within each panel of the figure; use lower-case letters in a size that will be legible when the total figure is reduced in size for printing.

On photos, if black letters do not show up well, use white ones. Add symbols with press-on symbols and letters; handwritten or typed symbols are not acceptable.

Panels should be at same size, whenever possible. Font and font size must be consistent between panels. Arrange panels to minimize repetition of symbol legends and axes labels. Do not leave unnecessary space between panels.

FIGURE SETTINGS: SUMMARY

	File format	Resolution	
Line drawings/ graphs	EPS, PDF	= 600 dpi	Lines = 0.5 pts; Font = 10 pts
Black-and white photographs	TIFF	= 300 dpi	
Color photographs	TIFF	= 300 dpi	CMOS
Combination figures	EPS, PDF	= 600 dpi	Lines = 0.5 pts; Font = 10 pts

Before submitting your artwork, perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated.

THE REVIEW PROCESS

Upon submission, the Editor-in-Chief will assign the manuscript to an Associate Editor (AE). The AE requests reviews from experts in the research area and ensures timely review.

Following receipt of the reviewers' reports, the AE makes a decision concerning the publication of the manuscript. A decision letter with copies of the reviewers' reports will be sent to the author. Appeals of AE decisions can be made to the Editor.

Accepted Manuscripts

ACCEPTED ARTICLES

By the “Accepted Article” publication service now used by *Photochemistry and Photobiology* **papers are published online as and when they are ready**, before copyediting and before their ultimate inclusion in a print or online issue. They are immediately given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked. This service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers – they will now appear online within a few days after acceptance. Once the manuscript is proofread and corrected, the Early View article will be posted and the Accepted Article version removed.

PAGE PROOFS

Page proofs will be created by Wiley-Blackwell and available as PDF files to the corresponding authors about 3 weeks after the publication of the accepted article. Carefully check for errors and respond to all the points raised by the proofreader within the given time-limit.

EARLY VIEW

Early View articles are complete articles published online in advance of their publication in a printed issue. They have been proofread and edited for publication, and the authors’ final corrections have been incorporated. **The appearance on Early View is considered as the publication date and the article will be citable as “published” according to this date.** This is the final version of the article and thus no changes can be made after online publication in Early View.

REPRINTS

A Reprint order form is emailed with the proofs of the manuscript.

AUTHOR SERVICES

Once an accepted article has been received at Wiley-Blackwell, authors may register for Author Services (<http://authorservices.wiley.com>) to **access their article PDF offprint** and enjoy the many other benefits the service offers. For instance, authors may check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. In addition, corresponding authors may enter their co-author’s email addresses so that they, also, can receive alerts as the article travels through production and access the final PDF. **All authors may also each nominate up to 10 other people to receive free access to their article** (i.e., specialists in the field who may be interested in reading/citing the article). Authors are eligible to claim a discount of 25% on all Wiley books. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com> for more details, including information on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

COPYRIGHT

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.