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

FORMULAÇÕES DE FOTOSSENSIBILIZADOR FENOTIAZÍNICO CONTENDO ETANOL OU CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs. EFEITO ANTIMICROBIANO EM BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maritieli Righi Martins

Santa Maria, RS, Brasil

2014

FORMULAÇÕES DE FOTOSSENSIBILIZADOR FENOTIAZÍNICO CONTENDO ETANOL OU CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs. EFEITO ANTIMICROBIANO EM BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa*

Maritieli Righi Martins

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

Orientadora: Profa 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

FORMULAÇÕES DE FOTOSSENSIBILIZADOR FENOTIAZÍNICO CONTENDO ETANOL OU CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs. EFEITO ANTIMICROBIANO EM BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa*

elaborada por
Maritieli Righi Martins

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas com Ênfase em Periodontia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Karla Zanini Kantorski, Dra.
(Presidente/Orientadora – UFSM)

Cristiane Cademartori Danesi, Dra. (UFSM)

Rafael Guerra Lund, Dr. (UFPEL)

Fabricio Batistin Zanatta, Dr. (UFSM)
(Membro Suplente)

Santa Maria, 27 de agosto de 2014.

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Elizabeth e Nilton**, a quem devo tudo, por todo apoio e esforços dedicados à realização dos meus sonhos. Eu os amo incondicionalmente!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À **Deus**,*
por me dar de presente a vida e com ela tantas coisas maravilhosas, sempre iluminando e guiando meus passos pelo melhor caminho.

Aos meu pais,
***Elizabeth e Nilton**,*
pelos ensinamentos e por estarem sempre presentes, me apoiando e me amparando em todos os momentos. A eles que muitas vezes abriram mão dos seus sonhos em favor dos meus, não medindo esforços para realizá-los, não tenho palavras para expressar toda minha gratidão e admiração pelas pessoas incríveis que são. Sem vocês nada seria possível. Muito obrigada por tudo!

Ao meu irmão e à minha cunhada,
***Nilton e Aliene**,*
que apesar da distância, tenho certeza que estão sempre torcendo pela minha felicidade e pelo meu sucesso, assim como torço por eles. Obrigada pelas palavras de incentivo e por todos os momentos bons que já compartilhamos.
Vocês são muito especiais. Muito obrigada!

À minha irmã,
***Elizandra**,*
que apesar das diferenças, tenho certeza que desejamos sempre o melhor uma à outra. Agradeço por ter me dado a honra de ser madrinha do teu filho Henrique, uma bênção. Obrigada!

Ao meu sobrinho e afilhado,
***Henrique**,*
que veio a este mundo para iluminar minha família e trazer muito amor. Obrigada, meu príncipe, por me trazer tantas alegrias. A dinda te ama para sempre!

À minha avó,
Célia,
dona de um coração gigante e que está sempre disposta a ajudar a família em qualquer coisa.
Muito obrigada vó!

Ao meu namorado,
Bruno,
que está sempre ao meu lado, não me deixando desanimar em momento algum. Obrigada pela tranquilidade, compreensão, apoio, companheirismo, amor e carinho. Tenho certeza que teremos um futuro lindo, assim como foi a nossa história até agora. Obrigada por todos os momentos incríveis que já tivemos!
Eu te amo muito!

Aos meus sogros,
Olga e Geovani,
que sempre me receberam como filha. Vocês são a minha segunda família. Obrigada pelo carinho, apoio e amizade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora,
Karla Zanini Kantorski,
pelos ensinamentos, confiança e oportunidades, contribuindo para o meu crescimento pessoal e intelectual.
Obrigada pela compreensão e paciência em alguns momentos.
Muito obrigada!

Ao professor,
Marcos Antonio Villetti,
pela receptividade, disponibilidade e ensinamentos, tornando possível a execução deste trabalho.

Ao professor,
Roberto Christ Viana Santos,
pela contribuição, tornando possível a execução deste trabalho.
Obrigada pela receptividade no Centro Universitário Franciscano.

Aos professores,
Carlos Heitor Moreira e Fabrício Zanatta,
pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.

Aos membros da banca examinadora deste trabalho,
Cristiane Danesi e Rafael Lund,
por aceitarem participar deste momento importante da minha vida e pelas considerações que, certamente, enriquecerão este trabalho.

À aluna da Pós-Graduação em Nanociências da UNIFRA,
Márcia,
pela disponibilidade e ajuda . Obrigada também pelos momentos de descontração, tornando os dias de trabalho mais agradáveis.

Aos ***colegas de mestrado****,*
obrigada pela convivência, conversas e momentos de descontração. Desejo sucesso a todos!

*Aos colegas do **grupo da periodontia**,*
pelo convivência, conversas , momentos de estudo e de descontração. Desejo sucesso a todos!

Ao colega,
***Danilo**,*
pela ajuda e contribuição neste trabalho. Muito obrigada!

Às colegas de laboratório do LEPOL,
***Francieli e Thiane**,*
obrigada pela recepção de vocês e convivência maravilhosa que tivemos, fazendo com que os dias de trabalho fossem muito mais leves. Vou levá-las sempre comigo! Muito obrigada!

Às gurias do "grupo dos ratos",
***Luisa, Fernanda, Marcela e Cibele**,*
pela convivência, conversas e muitas risadas. Tive muita sorte em poder trabalhar com pessoas como vocês. Vou levá-las sempre comigo!
Muito obrigada!

À minha amiga,
***Emilia**,*
minha companheira em todos os momentos desta caminhada, fazendo toda a diferença. Obrigada pelas conversas, ajuda, carinho, confiança, amizade, risadas e também pelos cafés da tarde. Nós conseguimos chegar até aqui juntas! Com certeza vou te levar para sempre no meu coração. Conte comigo para o que precisar. Te desejo toda felicidade do mundo. Muito obrigada, amiga!

À minha amiga,
***Cibele**,*
uma grata surpresa do mestrado. Obrigada pela tua ajuda indispensável no momento em que eu mais precisei, espero um dia poder retribuir. Obrigada pelas nossas conversas, risadas e todos os momentos que compartilhamos.
Tu és uma pessoa muito especial e vai estar sempre no meu coração. Desejo muito sucesso e felicidade.
Muito obrigada, amiga!

Às minhas amigas,
Alessandra e Rita,
pela amizade verdadeira que começou na graduação e, certamente, será para toda vida. Obrigada pelo carinho, pelos nossos momentos de diversão e também de apoio. Onde estiverem, estarão sempre no meu coração, e eu estarei torcendo pela felicidade de vocês! Muito obrigada, margaridas!

À minha amiga,
Marcela,
pelas conversas e desabafos nos momentos difíceis, e também pelas risadas e todos os momentos que tivemos juntas. Vou te levar sempre comigo. Te desejo muita felicidade e sucesso. Muito obrigada!

À minha amiga-irmã,
Camila Trevisan,
que está presente na minha vida desde que éramos muito pequenas, compartilhando todos os momentos. Se fôssemos irmãs, talvez não seríamos tão amigas. Obrigada pela confiança, carinho, companheirismo e palavras de incentivo. Espero te ter sempre por perto. Muito obrigada, amiga!

À minha amiga de infância,
Yasmine,
que compartilhou comigo tantos momentos maravilhosos e que mesmo distante sempre se faz presente. Obrigada pelas conversas e pela tua amizade. Vou te levar sempre no meu coração. Muito obrigada, amiga!

À minha amiga,
Marta,
pela confiança e sábias palavras nos momentos certos. Obrigada por me tranquilizar tantas vezes. Eu te admiro muito!

À ***Universidade Federal de Santa Maria*** *e ao* ***Curso de Odontologia*** *,*
por me proporcionarem uma educação de qualidade, com profissionais capacitados. Obrigada pela minha formação!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas** e **professores**,
pela seriedade, comprometimento e aprendizado.

À secretária do PPGCO,
Jéssica Dalcin da Silva,
pela dedicação, disponibilidade e competência.

À **FAPERGS**,
pela bolsa de estudos.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui, meus sinceros agradecimentos!

"Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."

Cora Coralina

RESUMO

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

FORMULAÇÕES DE FOTOSSENSIBILIZADOR FENOTIAZÍNICO CONTENDO ETANOL OU CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs. EFEITO ANTIMICROBIANO EM BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa*

AUTORA: MARITIELI RIGHI MARTINS
ORIENTADORA: KARLA ZANINI KANTORSKI
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de agosto de 2014.

Nosso objetivo foi otimizar o efeito fotodinâmico antimicrobiano do azul de metileno (AM) por meio da inclusão de etanol ou carreador de oxigênio na formulação. Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 foram formados sobre discos de acrílico por 5 dias. Formulações fotoativadas continham AM (250 µM) em: água tamponada, etanol 10% (tampão:etanol, 90:10), etanol 20% (tampão:etanol, 80:20) e emulsão com carreador (perfluordecaleno:tampão:triton-X100, 60:35:5). O tampão utilizado foi o Tris-HCl para as soluções em pH 7,4; e acetato de sódio/ácido acético para as soluções em pH 5,6. Biofilmes sem tratamento e expostos ao tampão, etanol 10% e 20% sem fotoativação foram avaliados como controles. Produção de oxigênio singleto foi mensurada pela fotoxidação do 1,3-difenilisobenzofuran (75µM). 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 a mesma formulação com diferente pH. Maior produção de oxigênio singleto foi verificada com AM diluído em etanol 10% e 20% no pH 7,4. Contudo, estas formulações não apresentaram diferença estatística em relação ao pH 5,6; ou em comparação ao AM diluído no tampão. Dados médios de UFC log_{10} para formulações com pH 7,4 contendo AM/etanol 10%, AM/etanol 20%, e AM/carreador foram de 3,99 ± 1,74; 4,04 ± 1,82; 3,82 ± 1,63, respectivamente. A redução microbiana média dessas formulações foi de 2,47 (P=0,03); 2,42 (P=0,03); e 2,64 (P=0,02), respectivamente. As demais formulações não apresentaram efeito antimicrobiano estatisticamente significante.

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

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Program in Dental Science
Santa Maria Federal University

PHENOTHIAZINE PHOTOSENSITIZER FORMULATIONS CONTAINING ETHANOL OR OXYGEN CARRIER IN DIFFERENT pHs. ANTIMICROBIAL EFFECT IN *Pseudomonas aeruginosa* BIOFILMS

AUTHOR: MARITIELI RIGHI MARTNS
ADVISOR: KARLA ZANINI KANTORSKI
Place and Date of Defense: Santa Maria, 2014, August 27th.

Our goal was to optimize the antimicrobial photodynamic effect of methylene blue (MB) by adding ethanol or oxygen carrier in the formulation. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilms were formed on acrylic disks for 5 days. Photoactivated formulations contained MB (250 μM) in: buffered water, 10% ethanol (buffer:ethanol, 90:10), 20% ethanol (buffer:ethanol, 80:20) and emulsion carrier (perfluorodecalin:buffer:triton-X100, 60:35:5). The buffer used was a Tris-HCl solution to a pH of 7.4; and sodium acetate/acetic acid to solutions at pH 5.6. Untreated biofilms and exposed to the buffer, 10% ethanol and 20% without polymerization were evaluated as controls. Production of singlet oxygen was measured by photo-oxidation of 1.3-difenilisobenzofuran (75μM). 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 same formulation with different pH. Increased production of singlet oxygen was determined on MB diluted in 10% ethanol and 20% at pH 7.4. However, these formulations showed no statistical difference compared to pH 5.6; or in comparison to the MB diluted in buffer. Average data of CFU log_{10} for compositions of pH 7.4 containing MB/ethanol 10%, MB/ethanol 20% and MB/carrier were 3.99 ± 1.74; 4.04 ± 1.82; 3.82 ± 1.63, respectively. The average microbial reduction of these formulations were 2.47 (P=0.03); 2.42 (P=0.03); and 2.64 (P=0.02), respectively. The other formulations had no significant antimicrobial effect.

Key-words: Methylene blue. Biofilm. Laser. Periodontal disease. Antimicrobial photodynamic therapy.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM – Azul de metileno

A – Absorbância final

A_0 – Absorbância inicial

AT – Azul de toluidina

BHI – Infusão cérebro coração (do inglês "*Brain Heart Infusion")*

cm – Centímetros

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

DPBF – 1,3-difenilisobenzofuran

ERO's – Espécies reativas de oxigênio

Fs – Fotossensibilizador

J – Joule

k – Constante cinética

ln – Logaritmo neperiano

log – Logaritmo

LPS – Lipopolissacarídeos

m – Metro

mg – Miligramas

min – Minuto

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mW – Miliwatts

nm – Nanômetros

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações por minuto

s – Segundos

TFDa – Terapia fotodinâmica antimicrobiana

Tris-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano/ácido clorídrico

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – Ultravioleta

Vis – Visível

λ – Comprimento de onda

µg – Microgramas

µL – Microlitros

µM – Micromolar

µs – Microsegundos

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Normas do Periódico *Photochemistry and Photobiology*, utilizadas para preparação do artigo.

ANEXO B – Gráficos de decaimento da absorbância do DPBF (75 μM) com AM (2,5 μM) nos diferentes grupos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA 18

2 OBJETIVOS 24

2.1 Objetivo geral 24

2.2 Objetivos específicos.....24

3 ARTIGO 25

Resumo 26

Introdução.....27

Materiais e Métodos 29

Resultados.....33

Discussão 34

Referências.....37

Tabelas.....41

Figuras 42

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 44

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 45

ANEXOS 52

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Bactérias resistentes aos antibióticos vêm preocupando profissionais da saúde e da indústria farmacêutica resultando na busca por novos agentes ou alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem sido proposta como coadjuvante para o tratamento de infecções localizadas apresentando baixa probabilidade de desenvolver resistência bacteriana (WAINWRIGHT et al., 1997; HAMBLIN; HASAN, 2004; MAISCH, 2007; GOULART et al., 2010)

A TFDa consiste na aplicação de um corante, conhecido como fotossensibilizador (Fs), que quando ativado por luz de comprimento de onda apropriado, na presença de oxigênio, gera espécies de oxigênio citotóxicas às células-alvo, resultando em morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; MAISCH, 2007; GE et al., 2011; SOUKOS; GOODSON, 2011; ROLIM et al., 2012).

Após a fotoativação, a molécula do Fs absorve energia passando do seu estado fundamental para o estado singleto excitado. Nesta forma, o Fs pode perder energia como fluorescência ou calor, voltando ao seu estado fundamental; ou pode passar ao estado tripleto excitado, menos energético que o estado singleto, 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 do meio, produzindo radicais livres e superóxido. Na reação tipo II, o Fs reage especificamente com o 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). As reações tipo I e tipo II podem ocorrer simultaneamente, e a razão entre elas depende da concentração de substrato e de oxigênio, e do tipo de Fs utilizado (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Um Fs ideal deve possuir alto rendimento quântico de oxigênio singleto, alta afinidade de ligação aos microrganismos, amplo espectro de ação, baixa afinidade de ligação às células teciduais, baixa probabilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana, mínimo risco de promover processos mutagênicos, e baixa

toxidade (JORI et al., 2006). O comprimento de onda capaz de ativar o Fs deve estar situado na janela terapêutica (entre 600 e 800 nm). Bandas de absorção em comprimentos de onda mais curtos (< 600 nm) possuem menor penetração tecidual e o Fs pode atuar sobre pigmentos endógenos e macromoléculas, como a hemoglobina, por exemplo (pico de absorbância em 425, 544, e 577 nm). Em bandas de absorção em altos comprimentos de onda (> 800 nm), os fótons não apresentam 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), possuem estrutura química composta 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). Como o AM é hidrofílico, tem a passagem pelos canais proteína-porina da membrana externa bacteriana, os quais são preenchidos por água, facilitada (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001). Seu espectro de absorção é de aproximadamente 660 nm (ROLIM et al., 2012), estando dentro da janela terapêutica.

AM é considerado um agente fotodinâmico membrana-destrutivo. Ele se liga aos polifosfatos da membrana externa de bactérias e produz danos a lipídeos e proteínas. AM também pode danificar o DNA bacteriano intercalando-se com a estrutura do ácido nucléico, especialmente em regiões ricas em guanina-citosina, levando a uma quebra de cadeia e degradação oxidativa das bases via oxigênio singleto (WAINWRIGHT, 2000; WAINWRIGHT, 2002). Adicionalmente, entre os componentes celulares, o AM acumula-se preferencialmente na mitocôndria, visto que este Fs 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).

Bactérias Gram-positivas apresentam maior susceptibilidade a TFDa do que bactérias Gram-negativas (WAINWRIGHT, 1998; USACHEVA; TEICHERT; BIEL,

2001). 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, em forma de bastonete, muito disseminada na natureza. Este patógeno é oportunista e raramente causa doenças em pessoas saudáveis, mas pode multiplicar-se facilmente em pacientes imunocomprometidos (BALASUBRAMANIAN et al., 2013), sendo responsável por graves infecções nosocomiais (HIDRON et al., 2008). *P. aeruginosa* apresenta resistência aos antimicrobianos devido à baixa permeabilidade de sua membrana externa, à mutações nos genes cromossômicos responsáveis pela regulação de genes envolvidos na resistência e à capacidade de adquirir genes de resistência por meio de plasmídeos, bacteriófagos e transposons (LAMBERT, 2002).

Na Odontologia, a TFDa vem sendo estudada como coadjuvante na desinfecção dos canais radiculares durante tratamento endodôntico (SIDDIQUI; AWAN; JAVED, 2013) e também no tratamento das periodontites (SGOLASTRA et al., 2013). As periodontites são doenças infecto-inflamatórias que acometem os tecidos de sustentação dos dentes podendo levar a perda do elemento dental. A etiopatogênese das periodontites tem como fator etiológico a presença de biofilme bacteriano nas superfícies dentárias interagindo com um hospedeiro suscetível (PAGE; KORNMAN, 1997). As periodontites são altamente prevalentes tanto em países desenvolvidos (ALBANDAR; BRUNELLE; KINGMAN, 1999) quanto em países em desenvolvimento (SUSIN et al., 2004) tendo importante impacto na qualidade de vida das pessoas (AL-HARTHI et al., 2013).

O tratamento *gold standard* para as periodontites consiste na remoção mecânica do biofilme e depósitos mineralizados das superfícies dentárias (COBB, 2002). Em algumas situações, a efetividade desta terapia 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, a TFDa como coadjuvante ao tratamento mecânico das periodontites vem sendo proposta.

Estudos laboratoriais tem demonstrado que a TFDa utilizando AM é eficiente em eliminar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em suspensões, incluindo periodontopatógenos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (WAINWRIGHT et al., 1997; BHATTI et al., 1998; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; CHAN; LAI, 2003; ROLIM et al., 2012). Redução microbiana também tem sido observada quando os microrganismos bucais estão presentes em biofilmes mono- ou multi-espécies (GEORGE; KISHEN, 2007; FONTANA et al., 2009; DUTRA et al., 2013).

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 têm sido observados como menor perda óssea na região de furca (ALMEIDA et al., 2008; FERNANDES et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; GARCIA et al., 2013a, 2013b). Em ratos, quando a TFDa foi realizada utilizando azul de toluidina 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 (GE et al., 2011; ALWAELI; AL-KHATEEB; AL-SADI, 2013). Contudo, em recente metanálise, os autores verificaram que apesar de diferenças estatísticas significantes a favor da terapia combinada quanto a redução de profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, os benefícios clínicos foram considerados de pequena magnitude. Assim, a TFDa como coadjuvante ao tratamento periodontal ainda 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 diluído em água (GE et al., 2011; ALWAELI; AL-KHATEEB; AL-SADI, 2013). Há evidencias de que esta formulação resulta em limitada produção de oxigênio singleto associada com curta meia vida (4 µs) (MEISEL; KOCHER, 2005) e baixo potencial de difusão do mesmo (OCHSNER, 1997).

A produção e meia vida do oxigênio singleto pode ser influenciada pelo solvente no qual o Fs é diluído. 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 µs), e a menor agregação molecular do AM na presença de etanol. Os autores também observaram que a inclusão do etanol evitou a dimerização das moléculas de AM mesmo em altas concentrações deste. Severino et al. (2003) demonstraram que a quantidade de dímeros na formuluação pode influenciar nas características fotofísicas e fotoquímicas do AM. Dímeros apresentam menor efetividade na captação de energia (PATIL; TALAP, 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).

Outra estratégia possível para aumentar o efeito antimicrobiano da TFDa poderia ser a utilização de uma substância capaz de carrear oxigênio fornecendo substrato para a reação fotodinâmica do tipo II. Há evidências de que a adição de um carreador de oxigênio na formulação do Fs com o propósito de aumentar a disponibilidade de oxigênio e facilitar a propagação de luz durante a fase de irradiação, aumenta a foto-oxidação e a produção de oxigênio singleto (GEORGE; KISHEN, 2008). Perfluorcarbonos (PFCs), como o perfluordecaleno, podem ser utilizados com esta finalidade (AMARAL et al., 2006). Estes compostos são derivados do petróleo, sintetizados por substituição de átomos de hidrogênio por átomos de flúor em moléculas de hidrocarbonetos. A solubilidade de oxigênio em PFCs é de 10 a 20 vezes maior do que em água pura (RIESS; LE BLANC, 1982). As características dos PFCs aumentam significativamente a taxa de transferência de oxigênio da fase gasosa para microrganismos (ELIBOL; MAVITUNA, 1995).

Além disso, outro aspecto que parece influenciar no efeito fotodinâmico é o pH das formulações (LI et al., 2009; JIANG et al., 2010). Contudo, este tópico tem sido pouco avaliado e os resultados são inconclusivos.

Assim, nosso objetivo foi avaliar as propriedades fotoquímicas e antimicrobianas de formulações contendo AM diluído em etanol (10% e 20%) e as

propriedades antimicrobianas de emulsões contendo carreador de oxigênio, em diferentes pHs. Nossa hipótese conceitual é de que as formulações contendo carreador de oxigênio e o pH mais ácido apresentem maior efeito antimicrobiano.

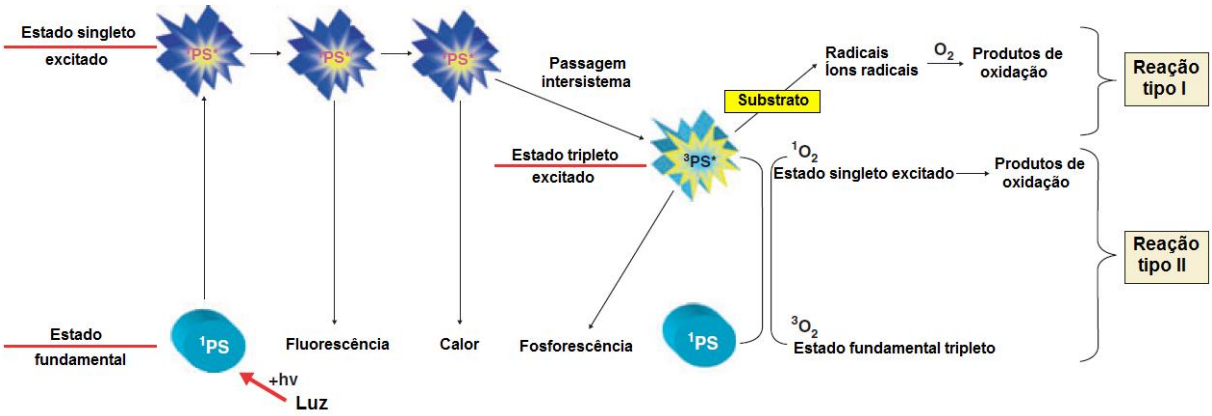


Figura 1. Reações tipo I e tipo II na TFDa (adaptado de SOUKOS; GOODSON, 2011). PS – fotossensibilizador.

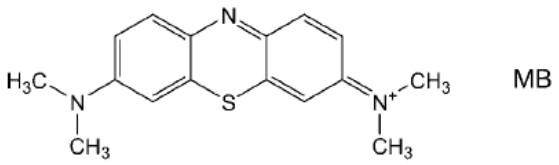


Figura 2. Estrutura química do AM (RAGÀS et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano do fotossensibilizador Azul de Metileno em formulações contendo etanol ou em emulsão contendo carreador de oxigênio em diferentes pHs.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a produção de oxigênio singleto pelo AM nas formulações contendo etanol por meio de reações fotoquímicas;

Avaliar o efeito do pH na ação fotodinâmica antimicrobiana de diferentes formulações de AM.

3 ARTIGO

Formulações de Fotossensibilizador Fenotiazínico Contendo Etanol ou Carreador de Oxigênio em Diferentes pHs. Efeito Antimicrobiano em Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*

Maritieli Righi Martins[1], Danilo Antonio Milbradt Dutra[1], Emilia Pithan Prochnow[1], Marcos Antonio Villetti[2], Roberto Christ Vianna Santos[3], 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

Nosso objetivo foi otimizar o efeito fotodinâmico antimicrobiano do azul de metileno (AM) por meio da inclusão de etanol ou carreador de oxigênio na formulação. Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 foram formados sobre discos de acrílico por 5 dias. Formulações fotoativadas continham AM (250 μM) em: água tamponada, etanol 10% (tampão:etanol, 90:10), etanol 20% (tampão:etanol, 80:20) e emulsão com carreador (perfluordecaleno:tampão:triton-X100, 60:35:5). O tampão utilizado foi o Tris-HCl para as soluções em pH 7,4; e acetato de sódio/ácido acético para as soluções em pH 5,6. Biofilmes sem tratamento e expostos ao tampão, etanol 10% e 20% sem fotoativação foram avaliados como controles. Produção de oxigênio singleto foi mensurada pela fotoxidação do 1,3-difenilisobenzofuran. 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 a mesma formulação com diferente pH. Maior produção de oxigênio singleto foi verificada com AM diluído em etanol 10% e 20% no pH 7,4. Contudo, estas formulações não apresentaram diferença estatística em relação ao pH 5,6; ou em comparação ao AM diluído no tampão. Dados médios de UFC log_{10} para formulações com pH 7,4 contendo AM/etanol 10%, AM/etanol 20%, e AM/carreador foram de 3,99 ± 1,74; 4,04 ± 1,82; 3,82 ± 1,63, respectivamente. A redução microbiana média dessas formulações foi de 2,47 (P=0,03); 2,42 (P=0,03); e 2,64 (P=0,02), respectivamente. As demais formulações não apresentaram efeito antimicrobiano estatisticamente significante.

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

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista causador de infecções hospitalares, sendo responsável por 9 a 10% das infecções nasocomiais (1). No Brasil, é o terceiro patógeno mais isolado em infecções hospitalares de acordo com programas de vigilância epidemiológica (2). *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram negativa com habilidade de expressar diferentes fenótipos devido ao seu alto grau de flexibilidade genômica (3). A tradicional resistência de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos pode ser explicada pela baixa permeabilidade da membrana externa, pela sua capacidade de sofrer mutações nos genes responsáveis pela regulação da sua resistência, e por adquirir genes de resistência por meio de plasmídeos, bacteriófagos e transposons (4). No biofilme, este microrganismo pode exibir uma resistência aos antimicrobianos 1000 vezes maior do que em cultura planctônica (5).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem sido proposta como alternativa para o tratamento de infecções localizadas apresentando baixa probabilidade de desenvolver resistência bacteriana (6-9). TFDa consiste na aplicação de um fotossensibilizador (Fs), que quando ativado por luz de comprimento de onda apropriado, pode realizar transferências eletrônicas com moléculas vizinhas (reação tipo I), gerando espécies reativas de oxigênio (EROs); e pode realizar transferências energéticas com o oxigênio molecular (reação tipo II) formando oxigênio singleto, que é altamente citotóxico (8, 10-13). Embora os produtos gerados pela reação tipo I e tipo II sejam citotóxicos, a efetividade antimicrobiana da TFDa está mais associada com a produção de oxigênio singleto (14).

Mais de quatrocentos compostos são conhecidos com propriedades fotossensibilizantes. O Fs deve possuir características específicas como: molécula cinética e termodinamicamente estável, rápida síntese, alto rendimento e baixo custo, não apresentar agregação em meio biológico; apresentar farmacocinética favorável, e baixa toxidade no escuro (10, 15). Fs pertencentes à família das fenotiazinas, com o azul de metileno (AM) apresentam intensa absorção na região de 664 nm (dentro da janela terapêutica), considerável rendimento quântico de oxigênio singleto (16, 17) e baixa toxidade.

Alguns estudos têm apontado que a formulação comumente utilizada em TFDa contendo AM diluído em água, podendo ter algum componente para aumentar a viscosidade da solução, resulta em limitada produção de oxigênio singleto (14), reduzida meia vida do mesmo (4µs) (15), e baixo potencial de difusão (18). O uso de um solvente menos polar do que a água, como etanol por exemplo, pode reduzir a agregação molecular do AM potencializando a produção do oxigênio singleto (19, 20), aumentando sua meia vida (20µs) (15), e favorecendo o efeito antimicrobiano (14).

Para formar oxigênio singleto, o pré-requisito é a disponibilidade de oxigênio molecular no meio. Nos biofilmes, áreas com diferentes gradientes de oxigênio e de anaerobiose estão presentes (21). Nesse contexto, a utilização de carreadores de oxigênio na formulação poderia potencializar o efeito antimicrobiano.

O pH das formulações é um fator que pode influenciar o efeito fotodinâmico (22, 23). Não existem estudos avaliando o efeito dessa variável em formulações contendo AM.

Assim, nosso objetivo foi avaliar o efeito antimicrobiano da TFDa utilizando AM em diferentes formulações sobre biofilmes de *P. aeruginosa*. Etanol a 10% e

20% foram testados como solventes. Uma emulsão com carreador de oxigênio foi utilizada para aumentar a disponibilidade de oxigênio na reação. Todas as formulações foram preparadas em pH 5,6 e 7,4 a fim de mensurar o papel do pH no efeito fotodinâmico.

Nossa hipótese conceitual é de que a formulação contendo carreador de oxigênio e o meio ácido resultem no maior efeito antimicrobiano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das formulações: O Fs utilizado foi o azul de metileno (Sigma Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil).

As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (milli Q) e etanol (Cromoline®, Diadema, SP, Brasil). Para o preparo das soluções tamponadas a 7,4 e 5,6 foram utilizados: tris(hidroximetil)aminometano (Sigma Aldrich®) e ácido clorídrico (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); e ácido acético (Vetec®) e acetato de sódio (Proquímios®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), respectivamente. Perfluordecaleno (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), e soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio (Vetec®) foram utilizadas para alcançar o pH desejado.

Formulações: As formulações foram denominadas conforme o solvente e o pH: **Tampão 7,4 -** tampão (Tris-HCl); **AM/água 7,4 -** AM diluído em tampão (Tris-HCl);

AM/etanol10% 7,4 - AM diluído em uma mistura de tampão (Tris-HCl) e etanol (90:10); **AM/etanol20% 7,4 -** AM diluído em uma mistura de tampão (Tris-HCl) e etanol (80:20); **AM/carreador 7,4 -** AM em uma emulsão de perfluordecaleno:tampão (Tris-HCl):triton-X100 (60:35:5); **Tampão 5,6 -** tampão (acetato de sódio/ácido acético); **AM/água 5,6 -** AM diluído em tampão (acetato de sódio/ácido acético); **AM/etanol10% 5,6 -** AM diluído em uma mistura de tampão (acetato de sódio/ácido acético) e etanol (90:10); **AM/etanol20% 5,6 -** AM diluído em uma mistura de tampão (acetato de sódio/ácido acético) e etanol (80:20); **AM/carreador 5,6 -** AM em uma emulsão de perfluordecaleno:tampão (acetato de sódio/ácido acético):triton-X100 (60:35:5).

Caracterização fotoquímica do AM

Mensuração da produção de oxigênio singleto por 1,3-difenilisobenzofuran (DPBF): A produção de oxigênio singleto pelo AM nas diferentes formulações foi mensurada por meio da foto-oxidação do 1,3-difenilisobenzofuran (DPBF) (Sigma Aldrich®) (24), sensível aos produtos resultantes da reação tipo II.

Soluções contendo DPBF (75 µM) e AM (2,5 µM) foram colocadas em uma cubeta de quartzo e os espectros de absorbância avaliados por espectrofotômetro UV/Vis (Varian Cary 50 Bio) a temperatura de 25ºC. 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 singleto produzido pelo AM foi avaliada pelo decréscimo na intensidade de absorbância em 415 nm em função do tempo de irradiação.

As avaliações foram realizadas em triplicata.

As formulações de AM contendo carreador de oxigênio não foram avaliadas para a produção de oxigênio singleto.

Efeito antimicrobiano do AM nas diferentes formulações em biofilme *in vitro*: Biofilmes de cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 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*: Discos de acrílico com 8 mm de diâmetro e 1 mm de espessura 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 imersos 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 37ºC 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 4 formulações com fotoativação (AM/tampão, AM/etanol 10%, AM/etanol 20%,

AM/carreador) e em 3 formulações controles sem fotoativação (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 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/cm^2, 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^{-1}), diluições decimais 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 37ºC por 48 horas. Após esse período, um examinador cego para os grupos experimentais e controles realizou a contagem das colônias formadas nas placas e o cálculo de unidade formadora de colônia (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 os ensaios fotoquímicos, e post hoc *Dunnett* para UFC (log_{10}). O teste *t-Student* foi utilizado para avaliar diferenças entre as mesmas formulações com diferenças de pH (7,4 versus 5,6). Nível de significância de 5% foi utilizado em todas as avaliações.

RESULTADOS

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

O decaimento da absorbância do DPBF (75 µM) com AM (2,5 µM) após irradiações consecutivas com laser de baixa potência está ilustrado na Figura 1, representado pelo grupo AM/etanol20% 7,4, exemplificando o comportamento de todos os grupos.

Os valores médios da constante cinética (s^{-1}) de decomposição do DPBF nos diferentes grupos estão apresentados na Tabela 1 e representados graficamente na Figura 2 (para os grupos com pH 7,4), e na Figura 3 (para os grupos com pH 5,6).

Quando todos os grupos foram comparados, AM/etanol 10% 7,4 apresentou a maior média da constante cinética (s^{-1}) de decomposição do DPBF, embora tenha sido diferente estatisticamente apenas do grupo AM/água 5,6 ($P \leq 0,05$). Quando comparada a mesma formulação variando o pH, maiores valores médios foram observados nas formulações com pH 7,4, mas as diferenças não foram estatisticamente significantes <Tabela 1>.

Inativação fotodinâmica dos biofilmes *in vitro*

Os resultados de UFC/mL (log_{10}) para as formulações sem fotoativação estão apresentados na Tabela 2. Nenhum efeito antimicrobiano foi observado com as

soluções tampão, ou com etanol 10%, independente do pH. Com etanol 20%, somente a formulação com pH 5,6 apresentou redução microbiana significante (aproximadamente 1 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 à fotoativação estão apresentados na Tabela 3. As formulações em pH 7,4 contendo AM/etanol 10%, AM/etanol 20%, e AM/carreador reduziram em média 2,47 (*P*=0,03); 2;42 (*P*=0,03); e 2,64 (*P*=0,02) log_{10} de *P. aeruginosa* em relação ao controle, respectivamente. Nas formulações com pH 5,6, nenhuma diferença estatística foi verificada em relação ao grupo controle.

Os valores médios de UFC foram sempre maiores com formulações em pH 5,6 em relação ao pH 7,4. Contudo, as diferenças não foram estatisticamente significantes <Tabela 3>.

As reduções médias de UFC (log_{10}) de *P. aeruginosa* para as formulações com fotoativação estão apresentadas na Figura 4. As formulações AM/etanol 10%, AM/etanol 20%, e AM/carreador, em pH 7,4, apresentaram as maiores reduções.

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que a inclusão de etanol ou carreador de oxigênio em formulações de AM em pH 7,4 utilizadas para TFDa, podem reduzir significativamente a viabilidade de *P. aeruginosa* em biofilme. Nossa hipótese inicial, de que a adição de carreador de oxigênio e o meio ácido resultaria no maior efeito antimicrobiano não foi confirmada.

Jiang *et al*., 2010 (23) demonstraram que uma série de ftalocianinas fotossensíveis modificadas apresentaram maior potencial para produzir ERO's e oxigênio singleto em meio ácido (pH 6,0 versus pH 7,4). Esses resultados despertaram nosso interesse de verificar o efeito dessa variável sobre formulações contendo AM. Na formulação contendo apenas AM e água, a produção de oxigênio singleto foi muito semelhante no pH 7,4 e 5,6. As formulações contendo etanol foram mais sensíveis as alterações de pH no meio. Nestas, maior produção de oxigênio foi verificada em pH 7,4, embora diferença estatística não tenha ocorrido em relação ao pH 5,6. Isso pode explicar, em parte, os resultados microbiológicos que indicaram maior efeito antimicrobiano nas formulações contendo AM e etanol 10% e 20% em pH 7,4. Quanto mais alto o pH da solução, mais radicais hidroxila (OH) estão presentes no meio. É possível que os radicais hidroxila tenham reagido com biomoléculas ou combinado-se resultando em peróxido de hidrogênio, que possui efeitos citotóxicos (25).

A exposição dos biofilmes aos tampões e ao etanol 10% e 20% em nosso estudo, demonstraram que essas soluções não apresentaram nenhum efeito antimicrobiano. Isso suporta o fato de que a redução microbiana obtida com TFDa utilizando AM/etanol 10%, AM/etanol 20%, AM/carreador em pH 7,4 ocorreu devido ao efeito fotodinâmico.

A redução microbiana significante verificada no presente estudo em formulações contendo etanol 10% e 20% corroboram a literatura prévia. George & Kishen, 2007 (14) verificaram que uma formulação contendo AM, etanol 20%, e glicerol reduziu significativamente a viabilidade bacteriana em biofilmes de *E. faecalis* e *A. actinomycetemcomitans*. Os autores atribuíram esse resultado ao fato do etanol prevenir a agregação molecular do AM. Quando o Fs está agregado (na

forma de dímeros), possui menor capacidade de capturar energia (26), resultando em menor produção de oxigênio singleto (19, 27). Esse efeito também foi demonstrado por Dutra *et al*., 2013 (20). Os autores demonstraram que uma formulação contendo AM, etanol 20%, e quitosana reduziu a dimerização, e resultou em maior produção de ERO's. Consequentemente, redução microbiana significativa foi verificada em biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli.*

Os resultados antimicrobianos obtidos no presente estudo com a formulação AM/carreador ratificaram estudo prévio. George & Kishen, 2008 (28) verificaram que a adição de carreador de oxigênio ao AM promoveu redução microbiana significativa de *E. faecalis* em biofilme. O princípio desse efeito parece estar associado com a possibilidade de aumentar o aporte de oxigênio no biofilme favorecendo a produção de oxigênio singleto. Contudo, testes confirmando essa hipótese não foram realizados.

A magnitude da redução microbiana verificada com AM em formulações contendo etanol e carreador de oxigênio em pH 7,4 foram semelhantes as observadas com antibióticos (29) sobre biofilme de *P. aeruginosa*. Isso significa que a TFDa com estas formulações pode ser uma alternativa viável sem riscos de reações adversas ou desenvolvimento de resistência microbiana (9).

Modelos pré-clínicos mais complexos devem ser utilizados para confirmar os resultados iniciais do presente estudo.

REFERÊNCIAS

1. Hancock, R. E. and D. P. Speert (2000) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist Updat. 3, 247-255.
2. Sader, H. S., R. N. Jones, A. C. Gales, J. B. Silva, and A. C. Pignatari (2004) SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis. 8, 25-79.
3. Wehmhöner, D., S. Häussler, B. Tümmler, L. Jänsch, F. Bredenbruch, J Wehland and I. Steinmetz (2003) Inter- and intraclonal diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* proteome manifests within the secretome. J Bacteriol 185, 5807-5814.
4. Lambert, P. A. (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med. 95, 22-26.
5. 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.
6. 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.
7. Hamblin, M. R. and T. Hasan (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 3, 436-450.
8. Maisch, T. (2007) Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? Lasers Med Sci. 22, 83-91.

9. 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.
10. Castano, A. P., T. N. Demidova and M. R. Hamblin (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiag Photodynam Ther. 1, 279-293.
11. 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.
12. Soukos, S. N. and J. M. Goodson (2011) Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. Periodontol 2000. 55, 143-166.
13. 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.
14. 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.
15. Meisel, P. and T. KOCHER (2005) Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. J Photochem Photobiol B. 79, 159-170.
16. Harris, F., Z. Sayed, S. Hussain and D. A. Phoenix (2004) An investigation into the potential of phenothiazinium-based photo-sensitizers to act as PDT agents. Photodiagnosis Photodyn Ther. 1, 231-239.

17. Wainwright, M. (2007) Phenothiazinium photosensitizers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenohiazinium salts. Dyes and Pigments. 73, 7-12.
18. Ochsner, M. J. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. Photochem Photobiol B. 39, p. 1-18.
19. 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.
20. 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 antimicrobial photodynamic therapy. Dissertation. Federal University of Santa Maria.
21. Stewart, P. S. and M. J. Franklin (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. Nat Rev Microbiol. 6, 199-210.
22. Li, W., N. Gandra, E. D. Ellis, S. Courtney, S. Li, E. Butler and R. Gao (2009) A pH-responsive, TiO2-attached porphyrin for singlet oxygen production in aqueous solution. Appl Mater Interfaces. 1, 1778–1784.
23. Jiang, X. J., P. C. Lo, Y. M. Tsang, S. L. Yeung, W. P. Fong and D. K. Ng (2010) Phthalocyanine–polyamine conjugates as pH-controlled photosensitizers for photodynamic therapy. Chem Eur J. 16, 4777-4783.
24. 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.

25. Wainwright, M. (2000) Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? Int J Antimicrob Agents. 16, 381-394.

26. 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.

27. 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.

28. 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.

29. Elkhatib W. and A. Noreddin (2014) Efficacy of ciprofloxacin-clarithromycin combination against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm sing in vitro experimental model. Microb Drug Resist. 0, 1-8.

Tabelas

Tabela 1. Coeficiente de atividade fotodinâmica nos diferentes grupos através da foto-oxidação do DPBF.

Grupos	**pH 7,4**	**pH 5,6**	***p***
AM/água	0,109 *	0,104 #	0,46
AM/etanol 10%	0,130 *	0,113 #	0,10
AM/etanol 20%	0,124 *	0,114 #	0,23

Linhas: teste *t-Student*.
Colunas: teste ANOVA e post hoc *Tukey* entre os grupos com mesmo pH. Símbolos diferentes representam diferença estatística ($p<0,05$). Símbolos iguais representam igualdade estatística ($p\geq0,05$).

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

Formulações	**pH 7,4**	**pH 5,6**
Controle	6,45 (± 0,51)	6,45 (± 0,51)
Tampão	5,98 (± 0,50)	6,22 (± 0,30)
Etanol 10%	5,95 (± 0,53)	6,00 (± 0,72)
Etanol 20%	6,38 (± 0,48)	5,33 (± 0,45)*

Colunas: Teste *One-Way* ANOVA e post hoc *Dunnett*. * representa diferença estatística ($p<0.05$) em relação ao grupo controle.

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

Formulações	**pH 7,4**	**pH 5,6**	***p***
Controle	6,46 (± 0,51)		
AM/água	4,79 (± 0,33)	5,47 (± 0,61)	0,06
AM/etanol 10%	3,99 (± 1,74)*	4,42 (± 1,97)	0,72
AM/etanol 20%	4,04 (± 1,82)*	4,42 (± 1,97)	0,74
AM/carreador	3,82 (± 1,63)*	4,86 (± 0,51)	0,21

Linhas: Teste *t-Student*.
Colunas: Teste *One-Way* ANOVA e post hoc *Dunnett*. * representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p<0.05$).

Figuras

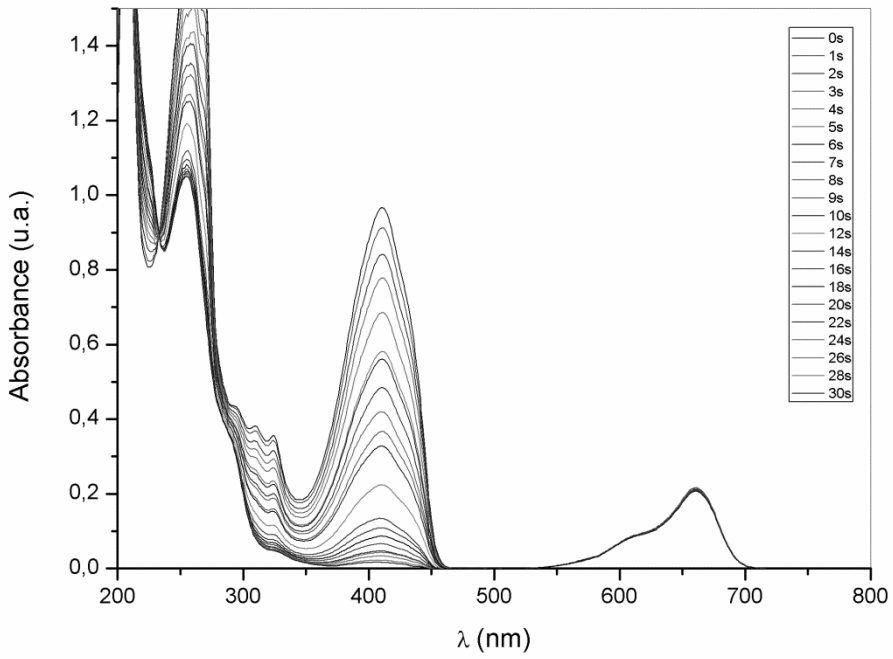


Figura 1. Decaimento de absorbância do DPBF (75 μM) com AM (2,5 μM) decorridas irradiações consecutivas utilizando laser.

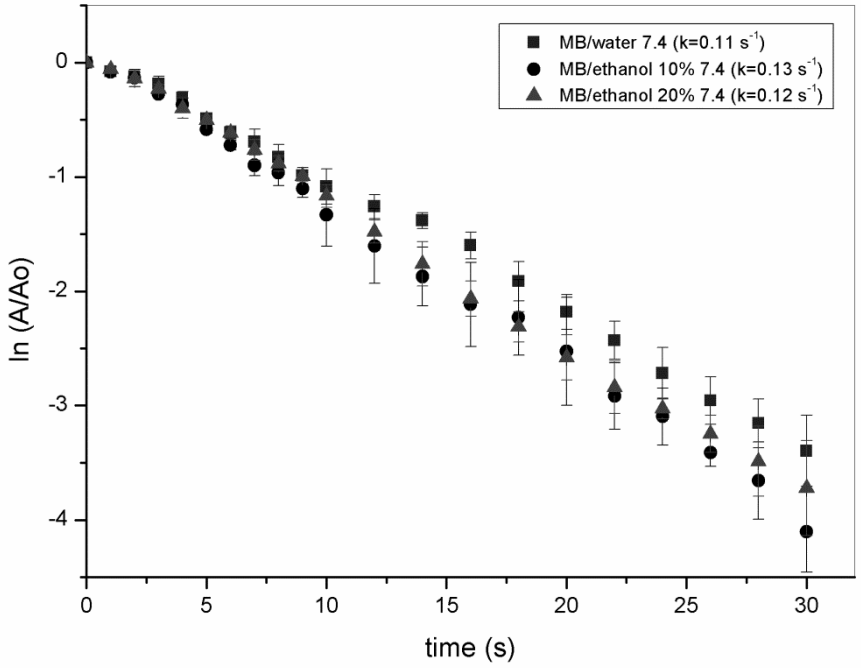


Figura 2. Cinética de decomposição fotolítica do DPBF ($k=s^{-1}$) em função do tempo (s), para os grupos com pH 7,4.

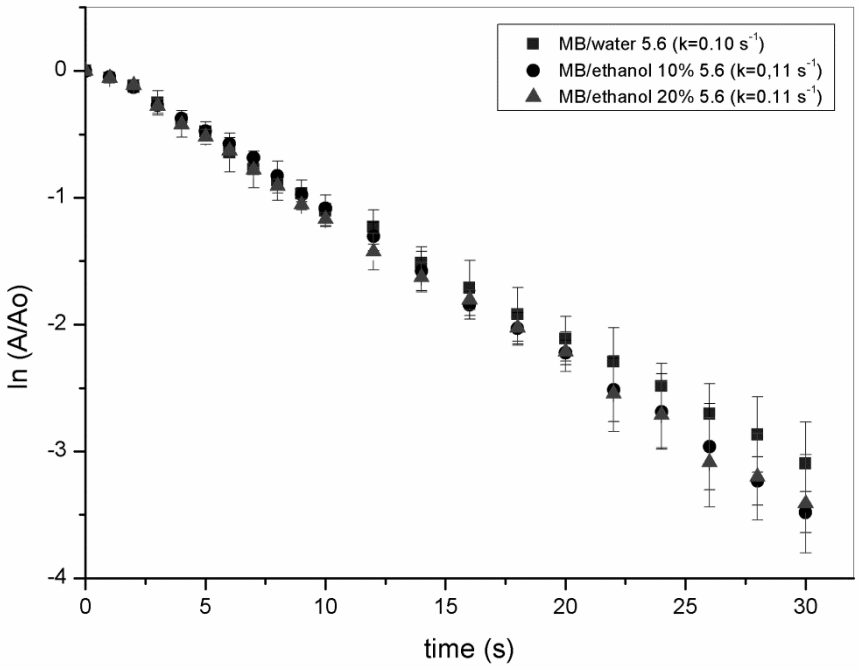


Figura 3. Cinética de decomposição fotolítica do DPBF ($k=s^{-1}$) em função do tempo (s), para os grupos com pH 5,6.

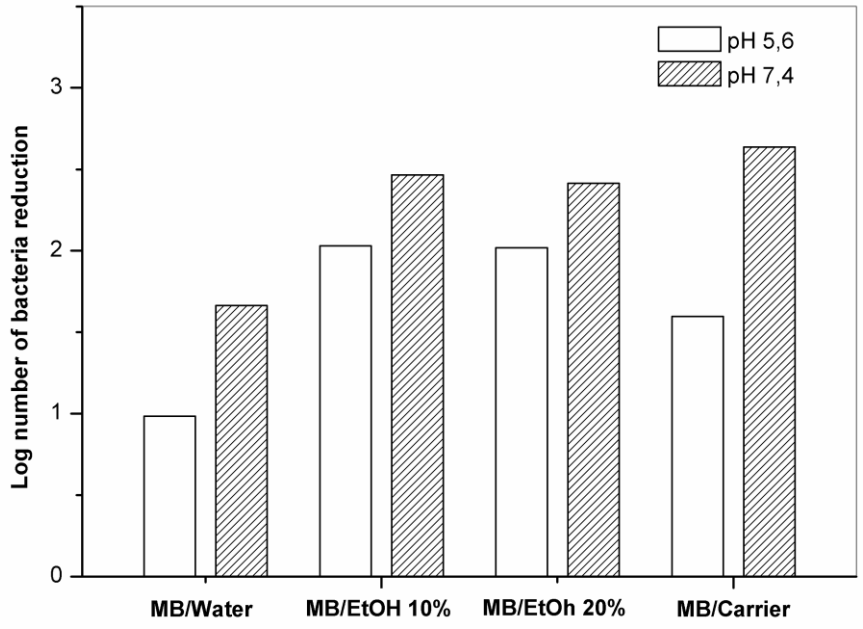


Figura 4. Redução média de UFC (log_{10}) de *P. aeruginosa* para as diferentes formulações com fotoativação.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo demonstrou que o pH teve influência no efeito fotodinâmico antimicrobiano das formulações de AM avaliadas. Além disso, a inclusão de etanol ou carreador de oxigênio em formulações de AM em pH 7,4 utilizadas para TFDa, reduziram significativamente a viabilidade de *P. aeruginosa* em biofilme. Assim, a TFDa parece promissora para atuar como coadjuvante no tratamento de infecções localizadas.

Entretanto, avaliações com modelos em biofilmes mais complexos, como em biofilmes multi-espécies, e com modelos animais devem ser executadas para suportar os resultados iniciais do presente estudo, para que ensaios clínicos possam ser realizados.

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.

AMARAL, P. F. et al. Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1368-1374, 2006.

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

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.

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.

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.

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

ELIBOL, M.; MAVITUNA, F. Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 206-210, 1995.

ELKHATIB, W.; NOREDDIN, A. Efficacy of ciprofloxacin-clarithromycin combination against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm sing in vitro experimental model. **Microbial Drug Resistance**, v. 0, p. 1-8, 2014.

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.

GABRIELLI, D. et al. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227-232, 2004.

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.

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.

HADJUR, C. et al. 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. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 45, p. 170-178, 1998.

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.

HANCOCK, R. E.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resistance Updates**, v. 3, p. 247-255, 2000.

HARRIS, F. et al. An investigation into the potential of phenothiazinium-based photo-sensitizers to act as PDT agents. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 231-239, 2004.

HIDRON, A. I. et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, p. 996-1011, 2008.

JIANG, X. J. et al. Phthalocyanine–polyamine conjugates as pH-controlled photosensitizers for photodynamic therapy. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, p. 4777-4783, 2010.

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.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Theroyal Society of Medicine**, v. 95, n. 41, p. 22-26, 2002.

LI, W. et al. A pH-responsive, TiO_2-attached porphyrin for singlet oxygen production in aqueous solution. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 8, p. 1778–1784, 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.

NICKEL, J. C. et al. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 619-624, 1985.

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

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.

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.

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

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.

RIESS, J. G.; LE BLANC, M. Solubility and transport phenomena in perfluorochemicals relevant to blood substitution and other biomedical applications. **Pure and Applied Chemistry**, v. 54, p. 2383-2406, 1982.

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.

SADER, H. S. et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

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. 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.

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.

SIDDIQUI, S. H.; AWAN, K. H.; JAVED, F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: A systematic literature review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 632-643, 2013.

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

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, Jul 2004.

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

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. 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.

WAINWRIGHT, M. Phenothiazinium photosensitizers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenohiazinium salts. **Dyes and Pigments**, v. 73, n. 1, p. 7-12, 2007.

WEHMHÖNER, D. S. et al. Inter- and intraclonal diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* proteome manifests within the secretome. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 19, p. 5807-5814, 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.

ANEXO A – Normas do Periódico *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 athttp://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 notuse 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:

Käß, H. P. S. (1995) Die Struktur des primären Donators P700 in Photosystem Untersuchungen mit Methoden der stationaren 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 athttp://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.

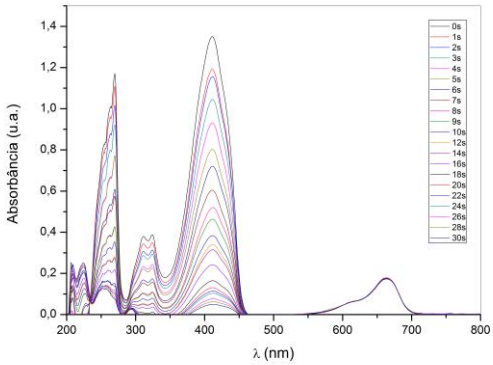
Use of a third dimension in figures that does not add information is discouraged.

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.

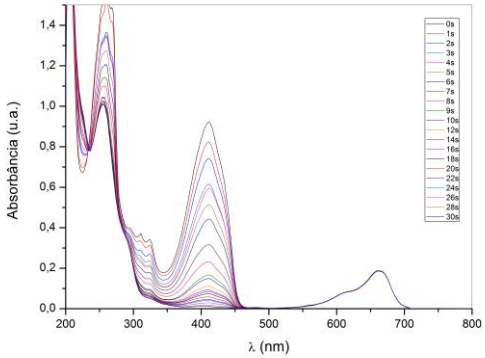
On photos, if black letters do not show up well, use white ones. Add symbols with press-on symbols and letters; handwritten or typed symbols are not acceptable.

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.

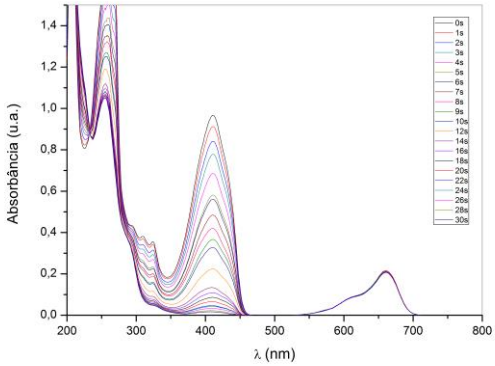
Anexo B – Gráficos de decaimento da absorbância do DPBF (75 μM) com AM (2,5 μM) nos diferentes grupos.



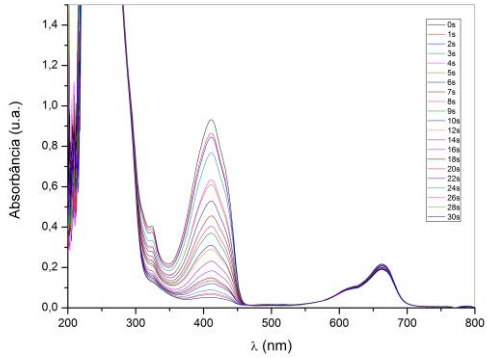
A.



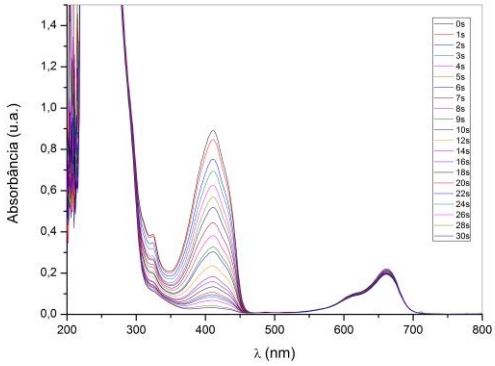
B.



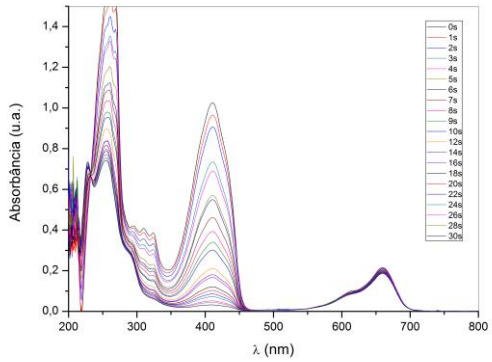
C.



D.



E.



F.

Decaimento de absorbância do DPBF (75 μM) com AM (2,5 μM) nos diferentes grupos: A. AM/água 7,4; B. AM/etanol10% 7,4; C. AM/etanol20% 7,4; D. AM/água 5,6; E. AM/etanol10% 5,6; F. AM/etanol20% 5,6.