

**POTENCIAL FOTODINÂMICO DA COMBINAÇÃO  
DE FOTOSSENSIBILIZADORES XANTENOS  
SOBRE *Streptococcus mutans***

Gabriela da Rocha Leódido

São Luís  
2016

Gabriela da Rocha Leódido

POTENCIAL FOTODINÂMICO DA COMBINAÇÃO DE  
FOTOSENSIBILIZADORES XANTENOS SOBRE *Streptococcus mutans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia Integrada

Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Marco Aurélio Benini Paschoal  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Leticia Machado  
Gonçalves

São Luís  
2016

L577p Leodido, Gabriela da Rocha.

Potencial fotodinâmico da combinação de fotossensibilizadores xantenos sobre streptococcus mutans. / Gabriela da Rocha Leodido. - São Luís: UNICEUMA, 2016.

34 p.:il.

Dissertação (Pós-Graduação) – Mestrado em Odontologia Integrada. Universidade CEUMA, 2016.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Fotossensibilizadores Xantenos. 3. Streptococcus Mutans. I. Paschoal, Marco Aurélio Benini (Orientador). II. Bandeca, Matheus Coelho (Coordenador). III. Título.

CDU: 616.314

Nome: Gabriela da Rocha Leódido

Título: Potencial fotodinâmico da combinação de fotossensibilizadores xantenos sobre *Streptococcus mutans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Benini Paschoal  
Universidade CEUMA - Orientador

---

Prof. Dr. Eduardo Buoizzi Moffa  
Universidade CEUMA

---

Prof. Dr. Pierre Moreno Neves  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

## **DEDICATÓRIA**

À Deus, à minha família e ao meu noivo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado força e sabedoria que auxiliaram durante toda minha trajetória e por ter colocado pessoas tão especiais que auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa, sem as quais nada disso seria possível.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pelos conselhos nos momentos de desistência, pelo carinho e atenção. Todo meu esforço foi para que hoje, eu pudesse retribuir tudo o que fizeram por mim, durante toda minha vida acadêmica. A felicidade de vocês nesse momento é meu melhor presente. Só tenho a agradecer a Deus, por tê-los em minha vida. Nada disto seria possível, sem vocês não estivessem ao meu lado. À vocês expresso o meu maior agradecimento.

A minha irmã pelo carinho e apoio, pelas palavras de conforto no momento da saudade, pelo amor e companheirismo.

À minha tia Emília, que se tornou uma segunda mãe, na ausência dos meus pais, sendo de fundamental importância para realização deste trabalho.

Ao meu noivo Wendell, pela paciência nos meus momentos de stress, pelo carinho, apoio, pela ajuda nos momentos de saudade da minha família e por compreender minha ausência em alguns momentos.

Aos funcionários da Universidade Ceuma, por todo seu empenho e auxílio prestado, principalmente durante os experimentos realizados nos feriados, finais de semana e até mesmo após expediente de trabalho.

Aos alunos de Odontologia, pelo carinho e atenção, nos Estágios de Integrada, pelos ensinamentos atribuídos. A Dhara, Glenda e Alberto pelo apoio, amizade e pelo comprometimento. Sem vocês não seria possível a finalização deste. Todo esforço foi fruto de muito companheirismo e amizade.

À todos os professores do mestrado e em especial a meu orientador Prof. Dr. Marco Aurélio, pelas exigências e por mostrar-me que sou capaz de muito mais do que eu supunha ser capaz de fazer. Conhecer um professor e profissional como você é raro, alguém que ama a profissão e tem comprometimento. Admiro sua forma de ensinar, a paciência, cuidado com seus orientandos e até mesmo a forma de advertir, de modo respeitoso e humilde. Muitos dos seus puxões de orelha, resultaram em choros, porém foram fundamentais, para minha construção como pessoa e profissional. Agradeço por transmitir seus conhecimentos e por fazer da minha dissertação uma

experiência positiva e construtiva. Nunca vou esquecer do dia em que conversamos sobre minha indecisão e você me disse: “Gabi, quando temos certeza do que queremos, é visível nos olhos o brilho pela paixão sobre nossa decisão, e quando você fala em pesquisa, eu vejo esse brilho em você”. Me faltam palavras pra agradecer. Muito obrigada por tudo.

E para finalizar, não poderia deixar de agradecer a FAPEMA, Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão, pela bolsa de estudo e pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa e participação em eventos científicos.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”.

*John Ruskin*



LEODIDO GR. Potencial fotodinâmico da combinação de fotossensibilizadores xantenos sobre *Streptococcus mutans* [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2016.

## RESUMO

**Introdução:** A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) é uma técnica coadjuvante ao tratamento e prevenção da cárie dentária. O mecanismo de ação baseia-se pela associação de fotossensibilizadores/corantes e fontes de luz para inativação de bacteriana. Relativo à terapia, são encontrados tempos de iluminação/irradiação e doses de energia divergentes, não havendo apenas um único protocolo ótimo de aplicação. E com o intuito de potencializar a ação desse método, a associação de baixas concentrações de corantes já utilizados com sucesso no campo fotodinâmico parece ser uma investigação viável. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da combinação dos corantes rosa de bengala (RB) e eritrosina (ER) sobre suspensão planctônica de *Streptococcus mutans*. **Material e métodos:** Para a avaliação da efetividade da TFDA foi testada uma dose de luz ( $96\text{J}/\text{cm}^2$ ) (L) num curto período (40 s) por um fotopolimerizador de alta potência associada a combinação dos corantes (RB =  $1,5\mu\text{M}$  e ER =  $3,5\mu\text{M}$ ) ao inóculo bacteriano previamente ajustado. Foram determinados grupos, dos quais o efeito isolado da associação dos corantes era determinado por (RB+ER+L-); efeito isolado da luz (RB-ER-L+); efeito fotodinâmico combinado (TFD = RB+ER+L+), efeito fotodinâmico isolado de RB (TFD RB = RB+ER-L-), efeito fotodinâmico isolado de ER (TFD ER = RB-ER+L-) e grupo controle (RB-ER-L-). Alíquotas de cada grupo foram submetidas a contagem bacteriana após 48 horas e os dados submetidos a teste ANOVA seguido de teste de Turkey com nível de significância a 5%. **Resultados:** Verificou-se que os grupos fotodinâmicos apresentaram redução bacteriana, entretanto apenas o grupo associado a dois corantes em baixas concentrações apresentou erradicação bacteriana e diferença estatística significativa em relação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ), confirmando maior potencial bactericida quando em associação. **Conclusão:** Pôde-se concluir que a associação de corantes xantenos halogenados é uma possibilidade viável para o controle do crescimento de microrganismos cariogênicos *in vitro*.

**Palavras-Chave:** Terapia Fotodinâmica; Fotossensibilizadores Xantenos; *Streptococcus mutans*;

LEODIDO GR. Photodynamic potential of xanthenes photosensitizers combination against *Streptococcus mutans* [dissertation]. São Luís. Universidade CEUMA; 2016.

### ABSTRACT

**Introduction:** Antimicrobial photodynamic therapy (ADT) is an adjunct to the treatment and prevention of dental caries. The mechanism of action is based on the association of photosensitizers / dyes and light sources for bacterial inactivation. Regarding the therapy, times of illumination / irradiation and divergent energy doses are found, not only having a single optimal protocol of application. And in order to potentiate the action of this method, the association of low concentrations of dyes already successfully used in the photodynamic field seems to be a viable investigation. **Purpose:** The objective of this study was to evaluate the potential of the combination of rose bengal (RB) and erythrosine (ER) dyes on the planktonic suspension of *Streptococcus mutans*. **Material and methods:** A light dose (96J / cm<sup>2</sup>) (L) was tested in a short period (40 s) by a high power photopolymerizer combined with the dyes combination (RB = 1.5 µM and ER = 3.5 µM) to the previously adjusted bacterial inoculum. Groups were determined, of which the isolated effect of the dye association was determined by (RB + ER + L-); Light isolated effect (RB-ER-L +); Photodynamic effect of RB (RB + ER-L-), isolated photodynamic effect of ER (TFD ER = RB-ER + L-) and control group (RB + ER + L +). RB-ER-L-). Aliquots of each group were submitted to bacterial count after 48 hours and data submitted to ANOVA test followed by Turkey test with significance level at 5%. **Results:** It was verified that the photodynamic groups presented bacterial reduction; however, only the group associated with two dyes at low concentrations presented bacterial eradication and a statistically significant difference in relation to the other groups (p <0.05), confirming a higher bactericidal potential when Association. **Conclusion:** It can be concluded that the association of halogenated xanthene dyes is a viable possibility for the control of the growth of cariogenic microorganisms in vitro.

**Keywords:** Photodynamic therapy; Photosensitizers Xanthene's; *Streptococcus mutans*;

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média dos valores em UFC/ml ( $\times 10^5$ ) após os tratamentos.....	23
--	----

## SUMÁRIO

1. RESUMO .....	16
2. INTRODUÇÃO .....	17
3. RESULTADOS .....	22
4. DISCUSSÃO .....	23
5. CONCLUSÃO .....	28
6. REFERÊNCIAS .....	32
7. ANEXOS.....	34
8. ANEXO I- METODOLOGIA DETALHADA .....	41
8. ANEXO II- NORMAS DA REVISTA .....	42

# *Capítulo 1*

# POTENCIAL FOTODINÂMICO DA COMBINAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES XANTENOS SOBRE *Streptococcus mutans*

## RESUMO

**Objetivo:** Investigar o potencial fotodinâmico da combinação dos corantes rosa de bengala (RB) e eritrosina (ER) em baixa concentração após irradiação com um fotopolimerizador de alta potência sobre suspensão planctônica de *S. mutans*. **Métodos:** Concentrações de RB = 1,5uM e ER = 3,5uM foram utilizadas, assim como a dose de 96J/cm<sup>2</sup> (40 s de irradiação; densidade de potência = 1200 mW/cm<sup>2</sup>; n = 440 – 480 nm) da fonte de luz estudada. Foram avaliados 6 grupos, tendo ação isolada e associadas dos fotossensibilizadores, sendo estes: efeito isolado dos corantes (RB+ER+L); efeito isolado da fonte de luz (RB-ER-L+); efeito fotodinâmico combinado (TFD = RB+ER+L+), efeito fotodinâmico isolado do RB (TFDRB = RB+ER-L), efeito fotodinâmico isolado de ER (TFDER = RB-ER+L-) e grupo controle (RB-ER-L-). Alíquotas de cada grupo foram transferidas para placas de BHI ágar para análise de unidades formadoras de colônia (UFC/ml). Os dados foram analisados por teste de ANOVA e Tukey a nível de significância a 5%. **Resultados:** Verificou-se redução de microrganismos no grupos TFD, com erradicação bacteriana para associação entre os fotossensibilizadores, ao comparar com os outros grupos ( $p < 0,05$ ). E em relação aos grupos corante e luz não houve redução bacteriana, sem diferença estatística com o grupo controle ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** A combinação de corantes xantenos halogenados irradiados com fonte de luz de alta potência é uma alternativa viável para o controle de microrganismos in vitro envolvidos no processo cariioso.

**Descritores:** Terapia Fotodinâmica; Fotossensibilizadores Xantenos; *Streptococcus mutans*; Fotoquimioterapia.

## INTRODUÇÃO

A cárie dentária ainda é uma das doenças mais prevalentes [1,2]. De caráter multifatorial, infecciosa crônica, possui capacidade de formação do biofilme, gerando um agregado de bactérias que destroem os tecidos dentais, podendo levar a perda total do elemento dentário [3,4].

Dentre as técnicas coadjuvantes para o controle desta moléstia, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), a qual age pela utilização de fotosensibilizadores e aplicação subsequente de comprimentos de luz adequados, vêm tendo destaque ímpar na Odontologia [4,5,6].

A susceptibilidade bacteriana à TFDA é extensamente comprovada por investigações em que se obtém a redução de microrganismos de um modo geral, em especial, cariogênicos [7,8,9].

Resultados promissores, tem sido verificado, de acordo com os componentes básicos da TFDA, com destaque aos corantes do grupo xantenos halogenados sobre microrganismos organizados na forma planctônica ou em biofilmes, como rosa de bengala e eritrosina [10-15]. Entretanto, as altas concentrações usadas e longos tempos de ativação necessários destes compostos, devido às baixas potências das fontes de luz para se atingir eficácia antimicrobiana, são considerados desafios nesse campo de atuação coadjuvante de abordagem à carie dentária [15].

A união entre substâncias vem sendo bastante estudada, principalmente quanto à utilização de antimicrobianos, com associação à substâncias naturais, principalmente para avaliação de potencial sinérgico entre elas [14-17]. Tal metodologia é desejável quando se tem por intuito a potencialização de efeitos terapêuticos, redução de doses (objetivando uma menor toxicidade no

organismo), efeitos colaterais e da resistência bacteriana, problema emergente no campo da saúde [18,19]. Em consonância com essa abordagem, a TFDA poderia ser beneficiada quando da combinação de substâncias fotossensibilizadoras.

Em vistas do aprimoramento desta abordagem coadjuvante, o presente trabalho teve por objetivo investigar o potencial fotodinâmico da combinação de fotossensibilizadores xantenos irradiados por um fotopolimerizador de alta potência sobre suspensão planctônica de *Streptococcus mutans*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Bactéria de Referência***

A cepa de referência de *Streptococcus mutans* UA 159 (ATCC 700610) foi utilizada neste estudo. O microrganismo foi reativado em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion - Merck, Darmstadt, Germany) numa concentração final de glicose (ISOFAR, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) a 1% em atmosfera de microaerofilia a 37°C por 18-24 horas. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada (Fanem, São Paulo, Brasil) a 3000 RPM por 5 minutos. Após retirado da centrifuga e observada formação do pellet, a suspensão foi lavada 2 vezes com solução salina de tampão fosfato, para descarte do sobrenadante (PBS) (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) estéril. Em seguida, o material resultante teve sua turbidez ajustada com auxílio do espectrofotômetro até atingir absorvância



similar a uma suspensão para solução estoque de  $2 \times 10^6$  UFC/ml no comprimento de onda similar a 540 nm [20,21].

### ***Fotossensibilizadores (FS)***

A eritrosina (ER) e rosa de bengala (RB) (Sigma Aldrich, St Louis, MI, EUA) foram dissolvidas em 100mL de PBS (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) e em seguida diluída para obtenção de concentrações finais testadas [21]. As concentrações utilizadas de rosa de bengala variaram de 0,25 - 2 $\mu$ M e 2,0 - 4 $\mu$ M para eritrosina. Após realização de testes complementares, foi selecionado os valores em que não ocorria morte bacteriana, sendo 3,5  $\mu$ M para eritrosina e 1  $\mu$ M para rosa de bengala. Durante todos experimentos para preparo e ajuste das concentrações, eram necessários proteção contra a luz, afim de evitar fotossensibilização prévia, com auxilio de papel alumínio envolto em todo béquer [21].

### ***Fonte de Luz***

A fonte de luz (L) utilizada foi um fotopolimerizador a base de LED (3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brasil) de alta potência de comprimento de onda azul de 440-480 nm, densidade de energia de 96 J/cm<sup>2</sup>, densidade de potência (radiância) de 1200 mW/cm<sup>2</sup>, potência de 600 mW de forma pulsada por 40 segundos. A distância de irradiação foi estabelecida a 5 milímetros, com auxilio do paquímetro (Digimess, São Paulo, Brasil) para que as amostras não sofressem alteração de temperatura e, como consequência, mortalidade por aquecimento [20].

### ***Determinação dos Parâmetros***

Para investigar o potencial da combinação fotodinâmica da associação dos fotossensibilizadores sobre suspensão de *S. mutans*, foram realizados testes prévios em diferentes concentrações dos fotossensibilizadores selecionados utilizados de forma isolada e submetidos à irradiação pelo protocolo anteriormente descrito para investigar a mínima concentração necessária que não fosse capaz de erradicação total do microrganismo testado. A determinação destes parâmetros de concentração iniciais foi extraída de investigações prévias, do qual obteve-se mortalidade bacteriana a 2 e 4 $\mu$ M para rosa de bengala e eritrosina, respectivamente [12, 21]. Desta forma, foram selecionadas as concentrações de 1,0  $\mu$ M para rosa de bengala e 3,5  $\mu$ M de eritrosina, as quais não apresentaram potencial de mortalidade bacteriana e se apresentaram mais próximo do valor de eficiência fotodinâmica, sendo utilizadas para o teste de combinação dos fotossensibilizadores.

### ***Aplicação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana***

Para a fotossensibilização das amostras foram utilizadas a combinação dos FS rosa bengala e eritrosina nas concentrações previamente determinadas e preparados previamente ao teste. Alíquotas com 50  $\mu$ L da concentração determinada de cada FS foram transferidas para tampas de tubos de microcentrifuga (diâmetro = 8mm; área = 50mm<sup>2</sup>) previamente esterilizadas e à estas foi adicionada 100  $\mu$ L de suspensão bacteriana de *S. mutans*, previamente ajustada, atingindo-se concentração desejada do

inóculo bacteriano ( $1 \times 10^6$  microrganismos/mL). Para a avaliação da efetividade da TFDA na inativação do microrganismo, foi testada uma densidade de energia ( $96 \text{ J/cm}^2$ , correspondente à irradiação por 40 segundos) de forma contínua combinada às concentrações dos FS seguindo um desenho experimental previamente validado, sendo fornecido o valor de energia de 48J para cada amostra [20]. Assim, foram testadas condições experimentais, obtidas a partir do cruzamento da dose de luz com as concentrações dos FS denominadas de ER+RB+L+ (grupo terapia fotodinâmica antimicrobiana - TFDA). Sendo as letras ER e RB, sigla para os FS e L para luz LED. Os símbolos + (positivo) e - (negativo), indicam presença ou ausência dos fatores estudados. Além disso, o efeito isolado da combinação dos FS (ER+RB+L-) e da fonte de luz (ER-RB-L+) foram testados. Adicionalmente, o efeito isolado de cada FS também foi investigado.

Para o grupo TFDA, amostras contendo 100  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano e 50  $\mu\text{L}$  de cada solução dos FS estudados permaneceram durante o período de 1 minuto no escuro (período de pré-irradiação) e então foram irradiadas por 40 segundos ( $96 \text{ J/cm}^2$ ) no modo de luz contínua pela fonte de luz. O mesmo desenho experimental foi realizado para os grupos de aplicação isolada da fonte de luz e FS, em que ao primeiro, em substituição ao corante, foi adicionado solução tampão (PBS) e, ao segundo, ausência de irradiação da fonte de luz. Adicionalmente, amostras não sensibilizadas com os FS nem submetidas à irradiação foram

utilizadas como controle negativo (ER-RB-L-) para efeito comparativo.

Após aplicação da TFDA, 100 µL de cada poço experimental foram transferidos para tubos de microcentrífuga com o intuito de se realizar diluições seriadas. Após isso, 25 µL de cada diluição foram plaqueadas em placas de BHI ágar e transferidas para incubadora a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Após 48 horas, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e correlacionada com o volume em mililitros, resultando na unidade UFC/mL. Os testes foram realizados em triplicata em dois momentos distintos (N = 6).

### ***Análise estatística***

Os dados obtidos das contagens de UFC/ml foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de *Tukey*, considerando-se nível de significância a 5%.

## **RESULTADOS**

Os grupos submetidos à TFDA apresentaram redução bacteriana significativa, entretanto, apenas o grupo em que os corantes foram combinados verificou-se erradicação total dos microrganismos testados, com diferença estatisticamente significativa em relação a todos os grupos testados ( $p < 0,05$ ). A aplicação isolada da fonte de luz e dos corantes sem a posterior irradiação (grupo corante) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Média dos valores em UFC/ml após os tratamentos

<b>Grupos</b>	<b>Situação Experimental</b>	<b>UFC/ml</b>
Controle	-	7,27(± 1,30) <sup>A</sup>
ER+L+	3,5 µM E / 96 J/cm <sup>2</sup>	0,53 (± 0,10) <sup>B</sup>
RB+L+	1,0 µM RB / 96 J/cm <sup>2</sup>	1,22 (± 0,41) <sup>B</sup>
ER+RB+L-	3,5 µM E 1,0 µM RB	5,38 (± 0,77) <sup>A</sup>
ER+RB+L+	3,5 µM E 1,0 µM RB / 96 J/cm <sup>2</sup>	0 <sup>C</sup>
ER-RB-L+	96 J/cm <sup>2</sup>	8,00 (± 2,21) <sup>A</sup>

ER = eritrosina; RB = rosa de bengala; L = luz; + = presença; - = ausência; Letras maiúsculas diferentes denotam diferença estatisticamente significativa.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, o efeito fotodinâmico apresentou resultado positivo após a combinação entre os fotossensibilizadores testados (rosa de bengala e eritrosina) sobre suspensão planctônica de *Streptococcus mutans*. Tal resultado representa uma evolução no campo fotodinâmico, determinado pelas baixas concentrações e tempo de irradiação extra-curto ocasionando erradicação bacteriana.

Neste campo específico, o uso de fontes de luz de alta potência associadas a fotossensibilizadores vêm sendo utilizado na diminuição e inativação das células bacterianas presentes em lesões de cárie [21,22]. Ainda, a TFDA encontra-se bem estabelecida na literatura por sua ação sobre diferentes microrganismos, ação antifúngica e principalmente em infecções, com aplicação cada vez mais frequente na cavidade oral [11,23].

A inativação de microrganismos na TFDA é atingida por meio da aplicação de diferentes protocolos e uso de diversos fotossensibilizadores, assim como fontes de luz [24,25]. A atividade bactericida fotodinâmica desses fotossensibilizadores vem sendo

largamente investigada [26-28]. Rosa de bengala, eritrosina e floxina foram o alvo do estudo de Ishiyama *et al.* (2016), em que verificou-se destaque para o corante rosa de bengala, com maior redução bacteriana em comparação aos outros fotossensibilizadores testados. Assim como também, outros estudos confirmam a eficácia do corante rosa de bengala em *S. mutans* [10, 21]. Embora no presente estudo o grupo TFD sem a combinação dos corantes tenha apresentado significativa diminuição bacteriana, não se atingiu erradicação bacteriana total.

Especificamente aos fotossensibilizadores, os mesmos são utilizados em diversos tratamentos em áreas distintas da Saúde [10,30]. Para que se tenha um resultado satisfatório, é necessário que apresentem boa estabilidade biológica, pouco efeito tóxico às células, eficiência fotoquímica e alta seletividade. Neste estudo, foram selecionados dois corantes do grupo xanteno halogenado, os quais apresentam uma ampla literatura atestando a eficácia de ação em microrganismos presentes na cavidade bucal e ação localizada sobre estruturas celulares, além de seu uso ter sido aprovado para uso clínico e principalmente no que se refere à evidenciação de placa para educação em saúde bucal [10,21,30].

O mecanismo de ação da TFDA ocorre por meio da combinação de seus componentes básicos: fonte de luz, fotossensibilizadores e oxigênio. A combinação destes fatores culmina na geração de espécies reativas de oxigênio, as quais são altamente tóxicas, tendo, por consequência, a destruição das células

alvo [12,31]. Entretanto, não somente a quantidade de oxigênio singlete (espécie mais produzida na aplicação da TFDA) está diretamente relacionada com a mortalidade bacteriana, uma vez que a capacidade de destruição não se altera/aumenta na presença de altas quantidades do mesmo [23]. Sendo assim, pode-se sugerir que o potencial antimicrobiano da associação se relacione aos diferentes tipos de espécies reativas produzida pelas duas substâncias associado ao aumento no potencial de absorção pela bactéria antes da irradiação devido aos dois corantes apresentarem sítios de ligação diferentes tanto intra (atuação em ácidos nucleicos) quanto extra-celular (membrana plasmática) no período de pré-irradiação.

Corroborando com resultados de outros estudos, a utilização do fotossensibilizador e a fonte de luz não possui ação bactericida quando utilizados separadamente [11, 22, 32]. Na presente investigação, observa-se que os grupos luz e corante apresentaram valores de UFC/ml similares ao grupo controle, não demonstrando diferença estatisticamente significativa entre si ( $8,00 \times 10^5$  e  $5,38 \times 10^5$  UFC/ml, respectivamente).

O potencial de inativação em suspensão planctônica de *S.mutans* verificado no presente estudo atesta o efeito fotodinâmico após combinação de corantes xantenos. Tal efeito pode ser explicado pelo tipo de fonte de luz (fotopolimerizador de alta potência) e utilização de fotossensibilizadores de alto rendimento de substâncias com alto poder oxidativo. Embora o tipo de estudo (abordagem *in vitro*) e utilização de uma única cepa laboratorial

(monocultura) representem limitações do presente estudo, os presentes dados servirão de base para investigação desse efeito em estruturas de biofilme e abordagens *in situ* e *in vivo* para o estabelecimento de uma abordagem alternativa e eficiente para o controle de microrganismos cariogênicos.

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se que a terapia fotodinâmica com combinação entre corantes xantenos irradiados com fonte de luz de alta potência apresenta alternativa viável para controle de microrganismos *in vitro*.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer à FAPEMA pelo financiamento (Bolsa de Mestrado à G.R.L. proc. 3424/14).



## REFERÊNCIAS

1. Gaçe E, Kelmendi M, Fusha E (2014). Oral health status of children with disability living in Albania. *Mater Sociomed* 26: 392-394. doi: 10.5455/msm.2014.26.392-394
2. Dantas Cabral de Melo MM, de Souza WV, Tavares MC, de Lima ML, Jamelli S, Couto GB (2015). Social conditions and high levels of dental caries in ve-year-old children in Brazil. *J Dent Child (Chic)* 82: 29-35.
3. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady J, Burne RA (2008). Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun.* 76: 4259–4268. doi: 10.1128/IAI.00422-08.
4. O’Riordan K, Akilov OE, Hasan T (2005) The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2: 247-262. doi:10.1016/S1572-1000(05)00099-2.
5. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C (2006) Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 57: 680-684. doi:10.1093/jac/dkl021.
6. Konopka K, Goslinski T (2007) Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 86: 694-707. doi: 10.1177/154405910708600803.
7. Diniz IMA et al (2015) Antimicrobial Photodynamic Therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 12:511-518. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.04.006.
8. Muller P, Guggenheim B, Schmidlin P (2007) Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci* 115:77-80. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00418.x
9. Giusti JS, Santos-Pinto L, Pizzolito AC et al (2008) Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg* 26:281-287. doi: 10.1089/pho.2007.2149.
10. Costa AC, Chibebe Junior J, Pereira CA, Machado AK, Beltrame Junior M, Junqueira JC et al (2010) Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a

light-emitting diode. *Braz Oral Res* 24: 413-418. doi: 10.1590/S1806-83242010000400007.

11.Rolim JP, De Melo MA, Guedes SF et al (2012) The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 106: 40-46. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001.

12.Pereira CA, Costa ACBP, Carreira CM et al (2013) Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. *Lasers Med Sci* 28:859-864. doi:10.1007/s10103-012-1175-3.

13.Habiboallah G, Mahdi Z, Mahbobeh NN et al (2014) Bactericidal effect of visible light in the presence of erythrosine on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* compared with diode laser, an in vitro study. *Laser Ther* 23:263-271. doi: 10.5978/islsm.14-OR-20.

14.Silva JR, Cardoso G, Maciel RRG et al (2015) Morphological alterations on *Citrobacter freundii* bacteria induced by erythrosine dye and laser light. *Lasers Med Sci* 30: 469–473. doi:10.1007/s10103-013-1421-3.

15.Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious disease. *Phytomedicine* 15: 639-652. doi: 10.1016/j.phymed.2008.06.008.

16.Chung PY, Navaratnam P, Chung LY (2011) Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Ann. Clin. Microbiol. Animicrob* 10: 25–30. doi: 10.1186/1476-0711-10-25.

17.Weerakkody NS et al (2011) Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galangal*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon iron bark (*Eucalyptus staigerana*) extracts. *J Sci Food Agric*. 91: 461–468. doi: 10.1002/jsfa.4206.

18.Mitchell G, Lafrance S, Séguin LD, Guay I, Gattuso M, Marsault E, Bouarab K, Malouin F (2012) Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression.. *J Antimicrob Chemother* 67: 559-568. doi: 10.1093/jac/dkr510.

19.Van VS, Viljoen A (2011) Plant-based antimicrobial studies-methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta med* 77: 1168-1182. doi: 10.1055/s-0030-1250736

20. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidorio DMP, Bagnato VS, Giusti, JSM, Santos PL (2013) Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagn Photodyn Ther* 10:313–319. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.02.002.
21. Leite HLA, Cavalcante SIA, Sousa EM, Gonçalves LM, Paschoal MA (2016) *Streptococcus mutans* photoinactivation using a combination of a high potency photopolymerizer and rose bengal. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 15:11-12. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.05.001
22. Paschoal MA, Moura CMZ, Jeremias F et al (2015) Longitudinal effect of curcumin-photodynamic antimicrobial chemotherapy in adolescents during fixed orthodontic treatment: a single-blind randomized clinical trial study. *Lasers Med Sci* 30:2059–2065. doi:10.1007/s10103-014-1700-7.
23. Soukos NS, Goodson JM (2011) Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology* 55:143-166. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00346.
24. Spath A, Leibl C, Cieplik K et al (2014) Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-Colored type-II photosensitizers. *J Med Chem* 57: 5157–5168. doi: 10.1021/jm4019492.
25. Araujo PV, Silva JFC, Gomez RS et al (2013) Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real-time PCR methods. *Photodiagn Photodyn Ther* 12:401-407. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.06.003.
26. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei JRG et al (2005) Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 50: 353-359. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.09.002.
27. Dai T, Huang Y, Hamblin MR (2009) Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*.6:170-188. doi:10.1016/ j.pdpdt.2009.10.008.
28. Nagata JY et al (2012) Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 9: 122-131. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.11.006.
29. Ishiyama K, Nakamura K, Kanno T, Niwano Y (2016) Bactericidal Action of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy(PACT)with Photosensitizers Used as Plaque-Disclosing Agents against

Experimental Biofilm. Biocontrol Science 21:187-191. doi: 10.4265/bio.21.187.

30.Bolean M, Paulino TP, Thedei G, Ciancaglini P (2010) Photodynamic Therapy with Rose Bengal Induces GroEL Expression in *Streptococcus mutans*. Photomed Laser Surg 28:79-84. doi: 10.1089/pho.2009.2635.

31.Celli JP, Spring BQ, Rizvi I et al (2010) Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring and optimization. Chem Rev 110: 2795–2838. doi: 10.1021/cr900300p.

32.Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J et al (2009) Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. Lasers Med Sci 24: 259-268. doi:10.1007/s10103-008-0539-1

*Anexos*

# 1 - Metodologia Detalhada

## 2 - Normas da Revista

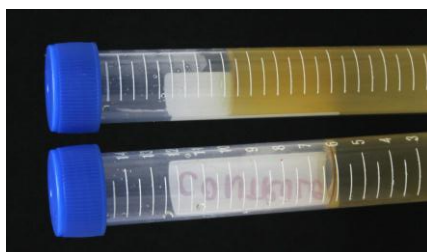
### ANEXO 1- Metodologia Detalhada

#### 1 Determinação dos parâmetros ótimos da TFDA

##### *Reativação e ajuste de densidade óptica*

Para o estudo, foi utilizado microrganismo *S.mutans* de uma cepa identificada UA159. A reativação foi realizada 16-18 horas antes do experimento, com auxílio de uma placa de repique e uma alça calibradora 1 $\mu$ L foram coletadas de 5-10 colônias, sendo após adicionadas em tubos falcons de 15 mL utilizando 9 mL de meio específico (BHI) (Merck, Damstady, Germany) contendo glicose com concentração final de 1%. Os três tubos falcons, sendo 2 contendo bactéria e um controle foram armazenados em estufa bacteriológica em situação de microaerofilia (37° C e 5% CO<sub>2</sub>). No dia do experimento, após confirmação do crescimento (FIGURA 1), o microrganismo foi centrifugado (Fanem, São Paulo, Brasil) a 3000rpm por 5 minutos e o pellet resuspenso em PBS (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil). Em seguida, uma alíquota foi utilizada para ajuste da densidade ótica num comprimento de onda a 540nm realizado por meio de um espectrofotômetro utilizando-se um número de microrganismos a 1x 10<sup>6</sup> células/ml.

**Figura 1.** Falcons de 15mL contendo BHI + 1% de glicose. Primeiro falcon controle (sem bactérias) e segundo turvados pela presença de microrganismos (sem bactérias).



## 2 Fotossensibilizador e fonte de luz

Nesta investigação, a eritrosina e rosa de bengala (FIGURA 2 e 3) (Sigma Aldrich, St Louis, MI, USA) foram dissolvidas em 100mL de PBS (FIGURAS 3 e 5) e em seguida diluída para obter concentrações finais de 1,5 $\mu$ M, 1,0 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M e 0,25  $\mu$ M para o corante rosa de bengala e 2,0  $\mu$ M, 3,0  $\mu$ M e 3,5  $\mu$ M para eritrosina. A solução foi mantida em escuro até seu uso, com auxílio de papel alumínio envolto em todo bequer e após ajuste das concentrações finais envolto nos tubos falcons ajustados. A luz utilizada no comprimento de onda azul foi usada para ativação. O dispositivo (FIGURA 6) (3M ESPE, Brasil, SP) fornece uma emissão no comprimento de onda central de 420-480nm e intensidade (densidade de potência) dessa luz é de 1200mW/cm<sup>2</sup>. A irradiação (fluência de energia) testada no estudo foi de 96 J/cm<sup>2</sup> (referentes a 40 segundos de irradiação), e a distância de trabalho utilizada foi de 5 mm com auxílio do paquímetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil) (distância entre a fonte e a tampa do tubo de microcentrifuga contendo corante e microorganismo) (FIGURA 7).

**Figura 2.** Corante eritrosina e rosa de bengala



**Figura 3.** Corante eritrosina e rosa de bengala



**Figura 4.** Materiais para dissolução = proveta com água destilada, béquer, colher dosadora e corante.



**Figura 5.** Após a junção dos elementos, o béquer foi colocado no agitador magnético para a completa dissolução do corante.

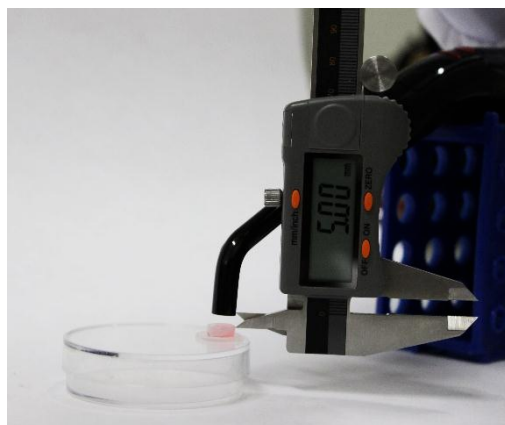


**Figura 6.** Dispositivo LED de alta potência.





**Figura 7.** Distância de trabalho utilizada a fim de evitar superaquecimento.



### **3- Determinação dos parâmetros**

Antes da união dos corantes, foram selecionadas concentrações que houve confirmação de erradicação bacteriana, afim de determinar concentrações que não ocorria morte bacteriana, para que a união fosse em molaridades que sozinhas, de ambos os corantes não eram efetivas e assim confirmar potencial sinérgico entre as substâncias. Os estudos Cavalcante et al., 2015 e Leite et al., 2016 foram utilizados como base para determinação. Então foram realizados testes prévios nas concentrações finais de 1,5 $\mu$ M, 1,0 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M e 0,25  $\mu$ M para o corante rosa de bengala e 2,0  $\mu$ M, 3,0  $\mu$ M e 3,5  $\mu$ M para eritrosina. Para realização do teste, foi preconizado o mesmo protocolo de aplicação da TFD que será exemplificado abaixo.

### **4- Aplicação da TFD**

Foram transferidos 100 $\mu$ L de corante (50  $\mu$ L de eritrosina e 50  $\mu$ L de rosa de bengala) e 100 $\mu$ L de microrganismo ajustado em uma tampa de tubo de microcentrifuga e mantido no escuro por 60 segundos (tempo de pré-irradiação). Após esse tempo, as suspensões foram irradiada por 40 segundos. Os grupos de TFD foram tratados com corante e luz (grupo RB+E+L+, onde RB=rosa de bengala, E = eritrosina, L = luz e + = presença). Para determinar se os fotossensibilizadores sozinhos induziram qualquer efeito tóxico sobre a viabilidade bacteriana, suspensões bacterianas foram expostas ao corante em condições idênticas às descritas, mas sem exposição à luz (grupo RB+E+L-). Da mesma forma, o microrganismo foi exposto à irradiação, determinando o efeito isolado da fonte de luz, sem exposição prévia ao corante (grupo RB-E-L+). E, suspensões de *S. mutans* não foram expostas nem ao corante ou luz (grupo RB-E-L-) para serem o grupo controle.

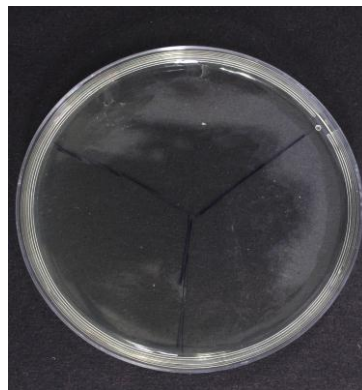
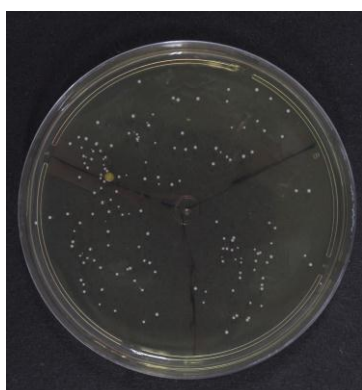
**Figura 7.** Esquema utilizado para a aplicação da TFD.



## 5- **Diluição seriada**

Após a aplicação dos tratamentos, alíquotas das suspensões foram usadas para executar diluições em série, e as amostras diluídas foram plaqueadas, em triplicata, em placas de Petri com BHI ágar e, em seguida, incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas para se investigar o número de microrganismos viáveis. Após a incubação, o número total de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) e o número de UFC por mL de suspensão (UFC/mL) foi obtido e transformado em logaritmo (log<sub>10</sub>).

**Figura 8 e 9.** Achados: grupo controle à esquerda e à direita grupo TFD 1,0 rosa de bengala + 3,5 eritrosina µM e 40 segundos de irradiação.



## ANEXO II- Normas da Revista

### **Lasers in Medical Science**

#### **1. TYPES OF PAPERS**

- Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures
- Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
- Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures
- Case Reports will not be accepted!
- Letter to the Editor – up to 600 words

#### **2. MANUSCRIPT SUBMISSION**

##### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

##### *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### *Online Submission*

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### **3. TITLE PAGE**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

#### *Abstract*

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- ✓ Purpose (stating the main purposes and research question)
- ✓ Methods
- ✓ Results
- ✓ Conclusions

#### *Keywords*

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### **4. TEXT**

#### *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

#### *Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

### *Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### *Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### *Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## **5. SCIENTIFIC STYLE**

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

### *Units and abbreviations*

Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].

Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

### *Drugs*

When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

## 6. REFERENCES

### *Citation*

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

### *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

### *Journal article*

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

### *Article by DOI*

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*.doi:10.1007/s001090000086

### *Book*

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

### *Book chapter*

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

### *Online document*

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

### *Dissertation Trent*

JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

*ISSN.org LTWA*

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

*EndNote style (zip, 2 kB)*

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

## **7. TABLES**

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

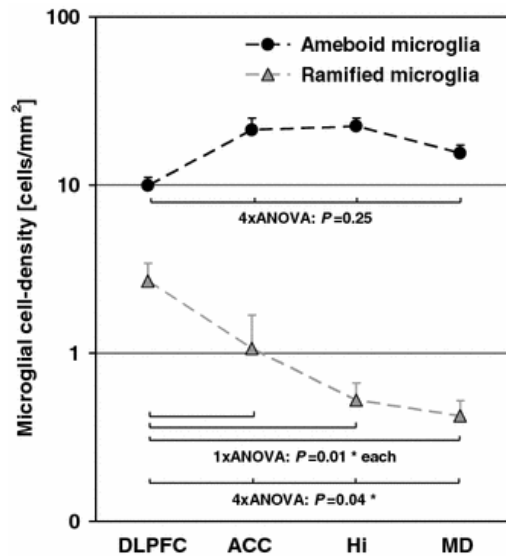
## **8. ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES**

*Electronic Figure Submission*



- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

*Line Art*



Definition: Black and white graphic with no shading.

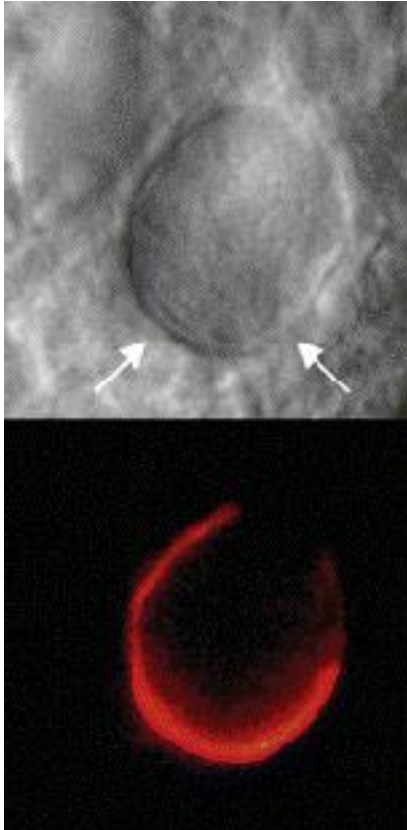
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

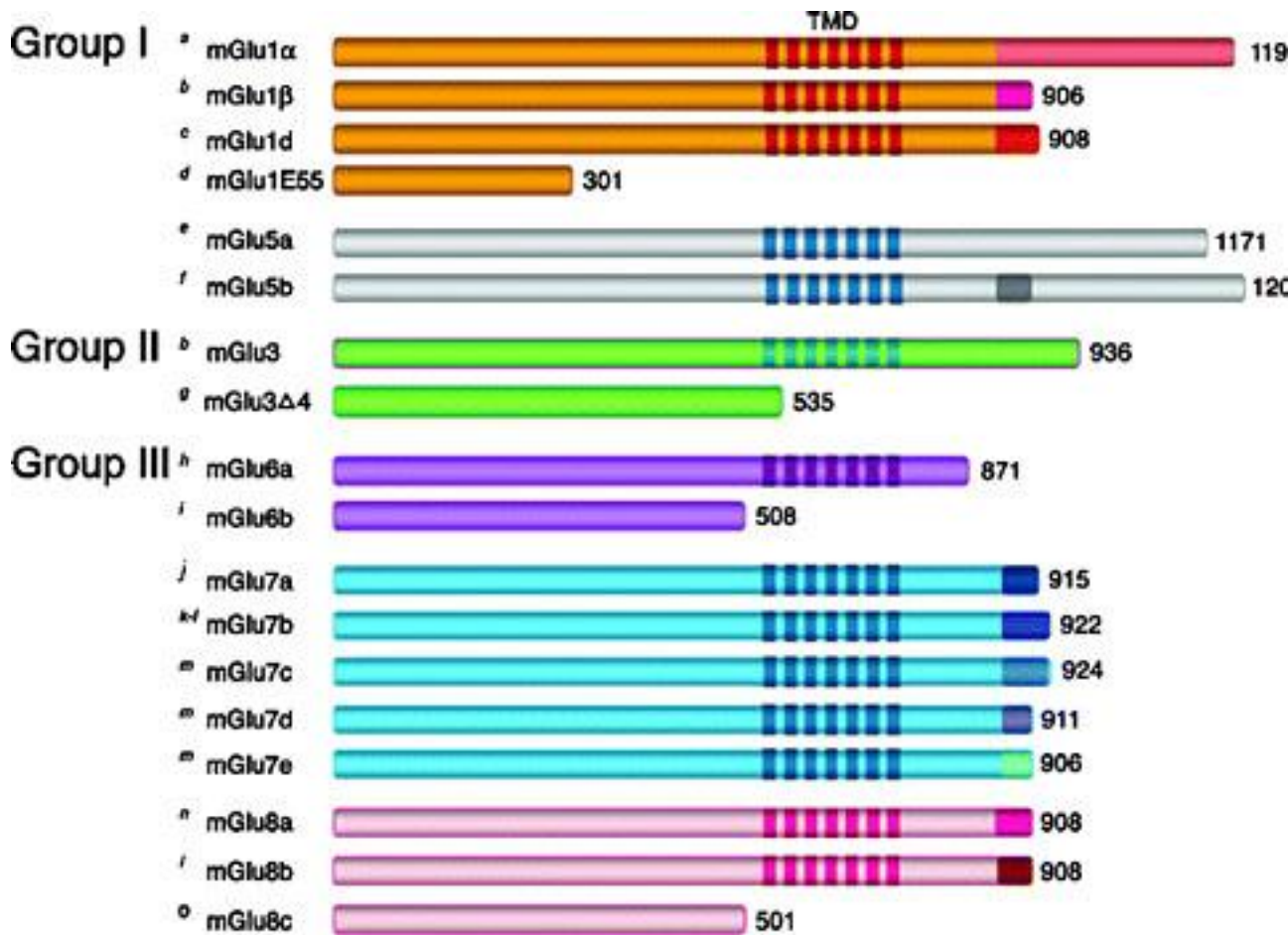
*Halftone Art*



Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

13. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

- Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

- ✓ Color art is free of charge for online publication.
- ✓ If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- ✓ If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- ✓ Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

- ✓ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif)

- fonts).
- ✓ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
  - ✓ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
  - ✓ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
  - ✓ Do not include titles or captions within your illustrations.

### *Figure Numbering*

- ✓ All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- ✓ Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ✓ Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- ✓ If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### *Figure Captions*

- ✓ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ✓ Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ✓ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ✓ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ✓ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### *Figure Placement and Size*

- ✓ Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- ✓ When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- ✓ For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- ✓ For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### *Permissions*

- ✓ If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### *Accessibility*

- ✓ In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- ✓ All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- ✓ Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- ✓ Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

## **9. ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL**

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

### *Submission*

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### *Audio, Video, and Animations*

Aspect ratio: 16:9 or 4:3  
Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

### *Text and Presentations*

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### *Spreadsheets*

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

### *Specialized Formats*

Specialized format such as .pdb (chemical), wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### *Collecting Multiple Files*

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### *Numbering*

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

### *Captions*

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### *Processing of supplementary files*

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

## *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

## **10. ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS**

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted. **Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective

responsibility and accountability for the results.

*In addition:*

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

## **11. COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS**

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial),



informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest  
Research involving Human Participants and/or Animals  
Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

## **12. DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST**

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type

of management relationships

- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

### **13. RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS**

#### 1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants,

authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

## 2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

#### **14. INFORMED CONSENT**

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

**Informed consent:** “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

#### **15. RESEARCH DATA POLICY**

The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public

repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

List of Repositories  
Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at **researchdata@springernature.com**.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk

## **16. AFTER ACCEPTANCE**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

### Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

## **16. OPEN CHOICE**

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

## **17. ENGLISH LANGUAGE SUPPORT**

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the

common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.