



**FACULDADE DE CIÊNCIAS HUMANAS, EXATAS E DA SAÚDE DO PIAUÍ
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO VALE DO PARNAÍBA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MEDICINA**

**ALICE DE MORAIS VERAS DA FONSECA
GUILHERME HERBET LEITE SAMPAIO
WLÁDIA PONTES ARAUJO**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM AGENTES INFECCIOSOS
UTILIZANDO A PRÓPOLIS COMO AGENTE
FOTOSENSIBILIZADOR**

**PARNAÍBA-PI
2019**

**ALICE DE MORAIS VERAS DA FONSECA
GUILHERME HERBET LEITE SAMPAIO
WLÁDIA PONTES ARAUJO**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM AGENTES INFECCIOSOS
UTILIZANDO A PRÓPOLIS COMO AGENTE
FOTOSSENSIBILIZADOR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Faculdade
FAHESP/IESVAP, como parte das
exigências para a obtenção de aprovação
na disciplina de Trabalho de Conclusão de
Curso III como requisito parcial para
obtenção do Grau de Bacharel em
Medicina.

Orientador: Profº Antonione Santos
Bezerra Pinto

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Lygia Conceição Leitão Teixeira CRB-3/619

Pontes	Fonseca, Alice de Moraes Veras da; Sampaio, Guilherme Herbet Leite; Araujo, Waldia
F676e	Efeito da terapia fotodinâmica em agentes infecciosos utilizando a própolis como agente fotossensibilizador / Alice de Moraes Veras da Fonseca; Guilherme Herbet Leite Sampaio;
Waldia	Pontes Araujo .- Parnaíba.- 2019. 50 f. : il.
IESVAP,	Monografia apresentada ao Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba –
Medicina,2019.	Parnaíba-PI, para graduação em
Santos	Orientador: Prof.º Mestre Antonione Bezerra Pinto.
	1.Terapia fotodinâmica. I. Título.
	CDU 615.85

**ALICE DE MORAIS VERAS DA FONSECA
GUILHERME HERBET LEITE SAMPAIO
WLÁDIA PONTES ARAUJO**

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM AGENTES
INFECCIOSOS UTILIZANDO A PRÓPOLIS COMO AGENTE
FOTOSENSIBILIZADOR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Faculdade
FAHESP/IESVAP, como parte das
exigências para a obtenção de aprovação
na disciplina de Trabalho de Conclusão de
Curso III como requisito parcial para
obtenção do Grau de Bacharel em
Medicina.

Local, ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ana Rachel Oliveira de Andrade
FAHESP/IESVAP

Prof. Raí Emanuel da Silva
UFPI

Prof. Luan Kelves Miranda de Souza
FAHESP/IESVAP

AGRADECIMENTOS

Ao nosso professor e orientador Antonione Santos Bezerra Pinto por aceitar em nos guiar nessa pesquisa, dando auxílio e orientação no nosso trabalho. Agradecemos a você pelo empenho, paciência e suporte.

À faculdade FAHESP/IESVAP pela oportunidade de desenvolver esse trabalho. Agradecemos por nos permitir o contato próximo com a pesquisa.

Aos nossos professores, em especial a professora Ana Rachel, por desde o princípio nos aconselhar. Obrigado por dicas e instruções.

Aos professores e acadêmicos da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em especial Alyne de Araújo, Raí Emanuel, Fábio Ribeiro e Manoel Brito por aceitar nossa proposta e fazê-la possível. Agradecemos a vocês pelo conhecimento compartilhado conosco e pelo entusiasmo em nos ensinar de perto.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-BIOTEC da UFPI por disponibilizar materiais e equipamentos fundamentais para a realização do nosso trabalho, pois sem eles não seria possível colocar a nossa ideia em prática.

A nossa amiga, Beatriz Melo, por nos transmitir ensinamentos fundamentais para o nosso trabalho. Obrigada por tanto!

À empresa Mel Milagres LTDA, por fornecer o extrato de própolis. Agradecemos pela atenção e parabenizamos pela competência e agilidade de serviço, além de qualidade do produto.

A nossa família, com ênfase nos nossos pais e irmãos, por mais uma vez nos estimular no meio acadêmico, dando-nos apoio para aprender cada vez mais. Obrigado Edileuza Lima, Júnior Matias, Gustavo Hermeson, Vinícius Herlon, Jhonse Pontes, Valderi Araújo, Walder Pontes, César Fonseca, Márcia Fonseca, César Filho, Mikahil Fonseca e André Ferreira.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da nossa formação, o nosso muito obrigado.

**“Filho, se você parar de aprender, logo
esquecerá o que sabe.”**

Provérbios 19:27

RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT) é um processo que utiliza como fonte de luz o laser, moléculas de oxigênio e um agente fotossensibilizador. A PDT visa ter ação contra patógenos, inclusive os resistentes a antimicrobianos. A associação da PDT com medicamentos naturais, como a própolis, ainda não é amplamente estudada. Portanto, este estudo objetivou avaliar, *in vitro*, o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica, usando a própolis como um agente fotossensibilizador na PDT. Para tanto foi utilizado o extrato de própolis seco como fotossensibilizador e o LASER de baixa potência modelo PhotonLase III, irradiando acima do poço da microplaca durante 90 segundos. Linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas foram utilizadas nos testes, em uma concentração de 5×10^5 UFC/mL. Inicialmente, determinou-se a atividade antibacteriana dos fotossensibilizadores sem ação do laser em diluições seriadas dos fotossensibilizadores e em seguida foi realizado o experimento com o laser. Após incubação das placas em estufa bacteriológica, adicionou-se azul de resazurina (0,1%) e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada. Alterações na morfologia da bactéria foram analisadas por Microscopia de Força Atômica (MFA). As bactérias se mostraram sensíveis à própolis com CIMs variando de 1,71 a 0,85 mg/mL, mas não foram susceptíveis ao azul de metileno sem adição do laser. Observou-se que ocorreu uma alteração no valor da CIM da própolis para *S. aureus* ATCC 29213 após a irradiação com o laser, alterando de 1,71 mg/mL para 0,85 mg/mL, porém isso não foi observado para a bactéria Gram-negativa utilizada, *E. coli* ATCC 25922. Pela AFM, observou-se alterações no tamanho de uma das bactérias utilizadas, *S. aureus*. Com base nos resultados relatados, conclui-se que a própolis associada ao LASER é mais ativa contra bactérias Gram-positivas.

Palavras chaves: Terapia Fotodinâmica, Própolis, Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a process that uses a light source - the laser -, oxygen molecules and a photosensitizing agent. PDT aims to act against pathogens, including those that are resistant to antimicrobials. The association of PDT with natural drugs, such as propolis, has not been widely studied. Therefore, this study aimed to evaluate, the *in vitro* antimicrobial effect of photodynamic therapy using propolis as a photosensitizing agent. For this purpose, dry propolis extract was used as photosensitizer and low power LASER - PhotonLase III model - was irradiated above the micro well for 90 seconds. Gram-positive and Gram-negative bacterial strains were used in the tests at a concentration of 5×10^5 CFU/mL. Initially, the antibacterial activity of photosensitizers without laser action was determined by a serial microdilution method, and, afterwards, the experiment with the laser was performed. After incubation of the plates in a bacteriological oven, resazurin (0.1%) was added and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined. Alterations in the morphology of the bacteria were analyzed by Atomic Force Microscopy (AFM). Bacteria were sensitive to propolis with MICs ranging from 1.71 to 0.85 mg/mL, but no susceptibility was observed for methylene blue without laser addition. A change was observed for the MIC values of propolis against *S. aureus* after irradiation, which decreased from 1.71 mg/mL to 0.85 mg/mL. This behaviour, however, was not observed for *E. coli* ATCC 25922, the Gram-negative strain used. In addition, AFM images revealed changes in the size of one of the bacteria tested, *S. aureus*. Based on the results reported, it was possible to conclude that propolis in association with LASER is more active against Gram-positive bacteria.

Keywords: Photodynamic Therapy, Propolis, Antimicrobial Activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Azul de Metileno
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DPM	Desvio Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAHESP	Faculdade de Ciências Humanas, Exatas e da Saúde do Piauí
FS	Fotossensibilizador
IESVAP	Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba
MFA	Microscopia de Força Atômica
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Meticilina
PDT	Photodynamic Therapy
Prop	Própolis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem 3D da análise por AFM da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	28
Figura 2 - Imagem 2D da análise por AFM da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/mL dos agentes fotossensibilizadores contra as bactérias utilizadas.....	27
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL dos agentes fotossensibilizadores contra as bactérias utilizadas após aplicação do laser.....	27

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVOS.....	13
2.1.OBJETIVO GERAL.....	13
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3.REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1.A PRÓPOLIS COMO ALTERNATIVA CONTRA AGENTES INFECCIOSOS.....	14
3.2.A TERAPIA FOTODINÂMICA COMO APLICAÇÃO MÉDICA.....	16
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1.Laser.....	21
4.2.Preparo da suspensão de micro-organismos e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	21
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO	39
ANEXO I – Normas para submissão da revista Lasers in Medical Science	39

1. INTRODUÇÃO

Pelo uso da luz, tem-se uma segmentação da medicina, a fotomedicina, a qual utiliza a onda eletromagnética no tratamento de doenças. São definidos três tipos de tratamentos com luz: fototerapia (somente uso de luz), fotoquimioterapia (uso de luz associada a compostos químicos com excitação no ultravioleta) e terapia fotodinâmica (uso de compostos fotossensibilizadores, com excitação em comprimentos de onda do espectro visível) (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (do, inglês, *Photodynamic Therapy* - PDT) caracteriza-se por ser uma técnica que utiliza os seguintes componentes: um agente fotossensibilizador, seguido de iluminação com um LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e moléculas de oxigênio (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

A primeira descrição da inativação de micro-organismos por luz e corantes foi há 100 anos por Oscar Raab, quando notou a morte de paramécios em contato com acridina e luz. Ele postulou que este efeito era causado pela transferência de energia da luz para a substância química. A utilização da luz ou corante isoladamente não apresentava qualquer efeito aparente sobre os paramécios, mas juntos eles eram altamente citotóxicos (IMPARATO et al., 2005).

A PDT é usada em diversas esferas como: tratamento de tumores malignos, de infecções fúngicas, reparo tecidual, cicatrização, tendo ainda ação antimicrobiana. A morte do micro-organismo se dá através de desordens na sua parede celular ou no seu DNA. A ação local e restrita faz da PDT um método diferenciado, sendo por isso usado como uma forma alternativa de tratamento (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

A PDT apresenta algumas vantagens em relação a terapia antimicrobiana, incluindo o fato de que a morte celular bacteriana pode ser mais rápida, não sendo necessário a utilização de um agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo (WILSON et al., 2004).

Alguns fotossensibilizadores (FS) já são bastante conhecidos por terem eficiência comprovada na literatura, como, o azul de metileno (AM), um corante muito estudado, tem seu espectro de absorção ressonante na região vermelha do espectro

eletromagnético entre 600nm e 670nm, e estudos de PDT mostraram sua eficácia na redução de *C. albicans* (SUZUKI, 2009).

A associação da PDT com medicamentos naturais ainda não foi amplamente estudada. Na literatura há relatos de que os medicamentos naturais podem ser eficazes no tratamento de doenças, por não ter sido observado efeitos adversos em diferentes tipos de células (AHN; BISWAS; CHUNG, 2013). Nessa circunstância, a própolis é um medicamento natural bastante conhecido na medicina popular. Ela é obtida da colmeia natural, onde é preparada por abelhas *Apis mellifera*, as quais misturam suas próprias ceras e secreções salivares com as resinas coletadas das rachaduras na casca das árvores e das folhas (WANG et al., 2017).

Diante disso, este estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica, usando dois agentes cromóforos: azul de metileno e própolis. Dessa maneira, com resultados positivos, isso irá refletir em tratamentos alternativos para doenças causadas por agentes infecciosos com uso de um produto natural.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Usar a terapia fotodinâmica, através de um estudo *in vitro*, para analisar o efeito antibacteriano do azul de metileno e da própolis no tratamento de doenças causadas por bactérias

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a ação dos agentes cromóforos associado ao laser de baixa potência em diferentes espécies de bactérias.
- Confirmar a eficácia da própolis como agente antibacteriano
- Verificar a influência antibacteriana da concentração da própolis com a incidência do laser sobre as cepas.
- Identificar quais espécies bacterianas são mais resistentes à PDT

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. A PRÓPOLIS COMO ALTERNATIVA CONTRA AGENTES INFECCIOSOS

Todos os organismos utilizam oxigênio em seu metabolismo e estão expostos a ele e aos seus vários subprodutos, devendo, portanto, desenvolver mecanismos capazes de protegê-los da toxicidade do oxigênio. É evidente que o oxigênio é tóxico para micro-organismos anaeróbicos, porém seus efeitos variam de morte celular a efeito bacteriostático. É menos óbvio, contudo, o efeito deletério do oxigênio para micro-organismos aeróbicos (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

Os micro-organismos são agentes patogênicos responsáveis por quadros infecciosos. A contribuição da antibioticoterapia para o tratamento dessas enfermidades é bem definida, e comercialmente observa-se a presença de diversos tipos de drogas capazes de eliminar os agentes causadores destas infecções (MOTA et al., 2005). A exemplo de bactérias causadoras destas infecções, tem-se bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., que representam um diversificado grupo de micro-organismos capazes de provocar enfermidades que variam desde infecções simples até quadros mais graves (SOUSA; RATTI, 2009).

Contudo, cabe ressaltar que tais micro-organismos evoluíram a ponto de desenvolverem a habilidade para escaparem da ação destes agentes antimicrobianos, por meio da resistência bacteriana. Esta representa um problema de saúde pública, provocando infecções em hospitais e na comunidade, e que conduz a altos índices de mortalidade e morbidade (SOUSA; RATTI, 2009).

Considerando a ascendente aquisição de resistência por estas bactérias, observa-se a necessidade urgente de novas opções antibacterianas que possam fornecer atividade eficaz contra os mecanismos desenvolvidos por estes patógenos. Nesse contexto, os produtos naturais podem servir como fontes promissoras na busca de novas opções para o tratamento de infecções provocadas por bactérias (GUIMARÃES et al., 2010).

Historicamente, a utilização de produtos naturais representa uma atividade presente no contexto médico-social, caracterizado pela conhecida medicina popular. O fato representa um marco importante no desenvolvimento de muitas nações, promovendo

melhorias e a cura de muitas enfermidades. Comum em regiões como Ásia, África e América Latina, a atividade é uma alternativa importante para solucionar diversos problemas de saúde, incluindo os provocados por micro-organismos (ROZATTO, 2012).

A utilização de tais produtos que apresentem propriedades medicinais é uma realidade em constante crescimento. Atualmente em regiões em desenvolvimento, bilhões de pessoas têm utilizado muitos deles como opções para o tratamento de uma ampla variedade de doenças infecciosas. No Brasil, um aumento significativo na investigação com produtos naturais que apresentam atividade antimicrobiana tem sido observado (DUTRA et al. 2016; VAN VUUREN, S., HOLL, D., 2017).

A pesquisa científica tem contribuído de maneira significativa para o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e seguros, no entanto considera-se que mais estudos devam ser realizados para comprovarem o uso seguro e eficaz das substâncias utilizadas na medicina popular. Muitos produtos naturais possuem uma diversidade de constituintes ativos e isso os permite serem alvos consideráveis na busca por novas opções terapêuticas. Estes apresentam diversas propriedades biológicas, em especial a atividade antimicrobiana, foco de muitos estudos em todo o mundo (SCHELZ; HOHMANN, 2006).

Como as doenças infecciosas representam um grave problema de saúde, muitos estudos têm sido realizados no intuito de se obter novas opções terapêuticas capazes de apresentar efeitos contra os micro-organismos causadores. Assim, a pesquisa com produtos naturais que possuam atividade eficaz frente aos micro-organismos patogênicos, é de grande importância (ROZATTO, 2012).

A própolis destaca-se por ser bastante estudada e exibir várias propriedades de interesse para a comunidade científica, suas ações têm sido descritas principalmente em relação à atividade antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade. Além disso, há um aumento de estudos que investigam a atividade antiparasitária dessa substância (SILVA et al., 2017).

A composição química da própolis pode variar de acordo com a sua origem geográfica e com as diferenças genéticas das abelhas responsáveis por sua produção. Estas variações acarretam mudanças em suas propriedades farmacológicas. Outro aspecto a ser considerado, é a época da coleta que pode interferir na determinação da

sua composição química. Em países como Brasil a coleta ocorre o ano todo, gerando possíveis variações sazonais (JÚNIOR et al., 2006).

No estudo de Castro e colaboradores (2007), os autores avaliaram a sazonalidade no período de coleta da própolis, considerando para isso os compostos presentes e a atividade antibacteriana do produto. Os autores constataram que o fator supracitado influencia diretamente na atividade antibacteriana observada e que isso pode ter uma relação com o período de coleta, bem como com alteração nos constituintes.

A própolis geralmente contém uma variedade de compostos químicos diferentes, incluindo ácidos fenólicos e ésteres, flavonoides como a vitamina P, terpenos, aldeídos aromáticos e álcoois, ácidos graxos, stilbenos e b-esteróides. Dentre as atividades biológicas já relatadas, exemplos como atividades antibacterianas, antimicrobianas e imunoestimuladoras, podem ser listadas (AHN; BISWAS; CHUNG, 2013).

Muitos estudos já evidenciaram seu potencial antimicrobiano, a exemplo disso, Sinhorini et al (2014) apresentou o efeito da mesma contra as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Além destas, a linhagem de *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 (CASTRO et al., 2007) também já se mostrou sensível à ação desse produto natural, bem como as de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, além das espécies fúngicas de *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida tropicalis* ATCC 28707 (PORTILHO et al., 2013).

3.2. A TERAPIA FOTODINÂMICA COMO APLICAÇÃO MÉDICA

Além da contribuição dos produtos naturais no tratamento de muitas doenças, atualmente o avanço tecnológico em diversas áreas, como a área da saúde, tem proporcionado o aperfeiçoamento no tratamento de muitos problemas médicos, garantindo assim a cura de diversas patologias. Tem-se como exemplo, o desenvolvimento de métodos que utilizam equipamentos com luz ultravioleta associado a produtos químicos, que representam uma opção no tratamento médico das doenças de pele (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Essa associação entre luz e produtos químicos caracteriza a conhecida fotoquimioterapia, e como exemplo disso a combinação de psoraleno e ultravioleta A,

pode ser citada (TAYLOR; BROWN, 2002). Desta maneira, um exemplo importante caracterizado pela fotoquimioterapia é terapia fotodinâmica ou *Photodynamic Therapy* (PDT), a qual representa uma alternativa nesse tipo de terapia, utilizando um agente fotossensibilizador, a luz e o oxigênio (FRITSCH; GOERZ; RUZICKA, 1998).

A fototerapia é um método terapêutico que afeta o metabolismo celular usando parâmetros precisos de luz. Alguns estudos mostram que a terapia com os lasers de baixa potência têm sido cada vez mais realizados, demonstrando ação direta no tecido celular e níveis sistêmicos (FRANGEŽ; NIZIČ-KOS; FRANGEŽ, 2018).

Historicamente, as ações da PDT foram relatadas primariamente no início do século XX por Oscar Raab e Herman von Tappeiner, que observaram os efeitos decorrentes da fotossensibilização. Nos achados, Oscar Raab verificou a morte do protozoário *Paramecium caudatum*, logo após exposição à luz na presença de agente químico, o corante acridina. A partir disso, constatou-se que a presença da luz em associação ao corante, modificando a ação deste, permitiu a identificação de um fotossensibilizante (TAUB, 2004; IMPARATO et al., 2005).

A PDT está relacionada com o uso e administração de um agente fotossensibilizante no local de ação, e em seguida tal agente é ativado por uma luz com comprimento de onda específico. No que diz respeito a utilização de agentes fotossensibilizantes, estes apresentam como características essenciais a pureza química, capacidade para atuar de maneira localizada e específica, eliminação rápida pelo sítio alvo, bem como meia-vida curta (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007).

Dentre os tipos de luz que podem ser aplicados na PDT, estão incluídos como fontes de luz as lâmpadas de amplo espectro, as lâmpadas de diodo e os lasers. Este último possui comprimento de onda específico, que satisfaz ao pico de absorção do agente sensibilizante empregado. A ação desempenhada por esta fonte de luz permite o tratamento de pequenas lesões, com o mínimo de danos aos tecidos adjacentes em um curto intervalo de tempo, o que configura uma vantagem para tal utilização (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Na terapia fotodinâmica, a utilização do laser de baixa potência com comprimento de onda e energia ajustados em suas configurações, garante a eficácia de sua aplicação.

Além disso, tanto o fotossensibilizador utilizado, quanto o comprimento de onda da fonte geradora de luz, devem ser observados na utilização da PDT, pois a reação fotoquímica só ocorre quando uma série de parâmetros é obedecida. Assim, o fotossensibilizador deve ser irradiado dentro da sua banda de absorção, gerando o efeito iniciador da terapia fotodinâmica (SUKUZI, 2009).

São inúmeros os agentes fotossensibilizadores que podem ser aplicados nesse tipo de fotoquimioterapia. Como exemplos, incluem-se o azul de toluidina, corante E6, BLC 1010 e cloreto de fenotiazina e azul de metileno, os quais estão entre os mais utilizados na PDT (SOUKOS; GOODSON, 2011). O azul de metileno tem uso recorrente na terapia fotodinâmica como fotossensibilizador. Além deste, outros fotossensibilizadores, como o azul de toluidina e o verde de malaquita em conjunto com um laser de baixa intensidade, tem demonstrado ação antimicrobiana contra bactérias e fungos (VILELA, 2010), demonstrando a eficácia do método.

Além da aplicação contra micro-organismos o método da terapia fotodinâmica também tem sido utilizado para outros fins, como na terapia do câncer. No tratamento desse tipo de patologia, a aplicação da PDT oferece como vantagem uma ação direcionada ao tecido lesado, preservando as células adjacentes (YOO; HA, 2012).

Como exemplo, diante de vários problemas médicos, o câncer de cólon destaca-se pela necessidade de novas alternativas para o tratamento, principalmente em casos de metástase. Neste sentido, a PDT tem sido apresentada como um método aplicável para este quadro, embora ainda apresente alguns efeitos adversos ao paciente. Contudo, o desenvolvimento de terapias fotossintéticas multifuncionais envolvendo duplas ou triplas terapias, tem sido considerado como opção para minimizar tais características (HODGKINSON; KRUGER; ABRAHAMSE, 2017).

A aplicação da terapia fotodinâmica tem sido proposta como uma alternativa no tratamento de quadros infecciosos, consistindo na utilização do agente fotossensibilizador, que mediante irradiação do laser, conduz a produção de subprodutos citotóxicos, causando uma destruição seletiva dos micro-organismos. Uma efetividade tem sido demonstrada tanto em modelos de estudos *in vitro* quanto *in vivo* contra bactérias, protozoários, vírus e fungos, incluindo cepas resistentes aos fármacos (SENNA, 2012).

Como vantagens para aplicação da PDT com finalidade antimicrobiana, ressalta-se por representar um procedimento não invasivo, com aplicação fácil, que não provoca sangramentos, além de apresentar uma taxa de cura considerável, bem como reduz a taxa de recorrência, de efeitos adversos e de morbidade. A possibilidade do uso com aplicações em áreas extensas, bem como de repetição da técnica também representam pontos positivos para o método (DONNELLY; MCCARRON, 2008; NUNEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2015).

Na ação antimicrobiana já relatada, a utilização de um fotossensibilizador que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante para produzir tal efeito. Os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem proporcionar danos ao hospedeiro (WILSON et al., 1992). Dentro da reação fotoquímica obtida através da PDT, são geradas algumas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), trazendo como resultado ação contra um grande número de patógenos, inclusive microrganismos resistentes a antimicrobianos (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

Acredita-se que o efeito contra bactérias por meio da aplicação do laser de baixa potência, esteja relacionado com ação na membrana bacteriana, em decorrência da absorção de fótons por cromóforos endógenos, bem como também produção de moléculas altamente reativas e citotóxicas já mencionadas. Diante das características da aplicação do método, não se observa recomendações claras quanto aos tipos de lasers, comprimentos de onda, potência e/ou doses da irradiação, necessárias para esta finalidade (BENVINDO et al., 2008).

O efeito terapêutico da PDT é alcançado pela formação de oxigênio singlete e radicais livres após a irradiação com laser. As vantagens do PDT estão associadas ao fato de que ele é um tratamento não invasivo e as EROs geradas têm um tempo de vida curto, sendo que o tratamento em locais restritos é possível (NOH et al., 2018).

A PDT tem sido costumeiramente associada com outras substâncias, incluindo as de origem natural, a fim de se obter um efeito sinérgico. Dessa maneira, a combinação dessa terapia tem relevância no interesse da pesquisa nas comunidades científicas e aplicabilidade na área médica (AHN; BISWAS; CHUNG, 2013). Historicamente, a fotomedicina ficou estagnada por várias décadas devido a uma série de fatores, como o

desenvolvimento de terapias antimicrobianas inovadoras. No entanto, devido ao surgimento de cepas resistentes aos antibióticos, que representa um problema de saúde pública, a terapia fotodinâmica torna-se uma ferramenta promissora no tratamento de doenças infecciosas (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

A PDT envolve a administração de componentes não-tóxicos, como os agentes fotossensibilizadores, os quais podem ser de origem inovadora (WANG et al., 2017). Cabe ressaltar que a terapia fotodinâmica pode ser associada com outras substâncias, tendo relevância assim no interesse da pesquisa nas comunidades científicas (AHN; BISWAS; CHUNG, 2013).

Tendo em vista o problema das infecções causadas por agente patogênicos, outros mecanismos que colaborem com a terapêutica de indivíduos infectados, se faz necessária. Dentre esses meios estão as terapias complementares, envolvendo a laserterapia e a terapia fotodinâmica. Os lasers estão sendo utilizados isolados ou associados a substâncias fotossensibilizadoras para serem auxiliares na inativação de micro-organismos. Diante das evidências da ação antimicrobiana da própolis, conforme apresentado na literatura, e da aplicabilidade da PDT na área médica, a utilização desta associação serviu como modelo de investigação para o presente estudo, podendo servir assim como alternativa útil no desafio da terapia das doenças infecciosas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Em um estudo *in vitro*, foi utilizado o extrato alcoólico de própolis seco a 22% como fotossensibilizador para realização da terapia fotodinâmica. O extrato foi obtido em propriedades rurais no estado de Minas Gerais e fornecido gentilmente pela empresa Mel Milagres LTDA (CNPJ 00870513000153).

4.1. Laser

Na terapia fotodinâmica, usa-se o LASER de baixa potência com comprimento de onda e energia ajustados em suas configurações, para eficácia de sua aplicação. Para realização do procedimento de fotossensibilização do corante e da própolis foi utilizado um laser modelo PhotonLase III (DMC Equipamentos Ltda., São Carlos - SP). Este equipamento possui meio ativo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) e tem comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível). Esse comprimento de onda é correspondente à faixa de comprimento de alta absorção por esses fotossensibilizadores.

A potência do laser utilizada foi de 100 mW, esta foi aferida antes de cada procedimento experimental. A área de irradiação na placa foi determinada e o laser foi irradiado de modo contínuo e com a abertura da ponteira do laser acima do poço durante 90 segundos. A irradiação ocorreu no escuro e em câmara de fluxo laminar, com uso adequado de equipamentos de proteção individual e coletiva.

4.2. Preparo da suspensão de micro-organismos e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram previamente cultivadas em ágar Mueller-Hinton (Difco, Detroit, EUA) e permaneceram por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica, em condições aeróbicas. A linhagem de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 foi cultivada no mesmo meio de cultura, sendo mantida em estufa bacteriológica por 48 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, em condições de microaerofilia. A partir de colônias isoladas de cada cepa, foram preparadas suspensões padronizadas em solução salina esterilizada (NaCl a 0,85% p/v), obtendo-se um padrão de absorbância entre 0,08 – 0,13 sob comprimento

de onda de 625 nm, correspondendo a escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL), conforme recomendações do CLSI (2015).

A seguir, para o preparo do inóculo bacteriano, a suspensão dos micro-organismos foi diluída em caldo Mueller-Hinton e caldo TSB (para espécie de *S. mutans*) de maneira que a concentração final de bactérias correspondesse a 5×10^5 UFC/mL e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fotossensibilizador teste (própolis), fotossensibilizador controle (azul de metileno), do laser (90s) e do fotossensibilizadores + laser (90 s) foi determinada de acordo com protocolo estabelecido pelo CLSI (2015).

Para o estudo de fotossensibilização, inicialmente determinou-se a atividade antibacteriana dos fotossensibilizadores sem ação adjuvante do laser. Para tanto, foram utilizadas diluições seriadas dos fotossensibilizadores nos poços. A concentração de própolis variou de 110 a 0,05 mg/mL e a concentração de azul de metileno variou de 0,01 a 0,000004%. Realizou-se o controle de crescimento para evidenciar a viabilidade dos micro-organismos e controle de esterilidade do meio de cultura utilizado, bem como da substância fotossensibilizadora.

O experimento foi realizado em triplicata e as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas para posterior observação do resultado com adição de azul de resazurina (0,1%) e incubação a 37 °C por mais 20 minutos. Mediante a viabilidade do micro-organismo, o corante modifica-se da cor azul para cor de rosa. Dessa forma, a CIM foi definida como a menor concentração da própolis em mg/mL, capaz de impedir o crescimento microbiano visível (cor azul).

4.3. Análise do efeito antibacteriano por Microscopia de Força Atômica

As concentrações sub-CIM do tratamento com própolis e própolis + laser, além do controle de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foram utilizadas para a verificação de possíveis alterações provocadas pelo tratamento, no que se refere a morfologia da célula bacteriana. Para tanto, o mesmo procedimento do MIC foi reproduzido, com inóculo bacteriano de 5×10^5 UFC/mL. Após o procedimento citado anteriormente, tratamentos semelhantes aos de Araújo et al. (2015) foram utilizados nas amostras para realização da análise.

O microscópio utilizado foi o TT-AFM (AFM Workshop - EUA), no modo de contato intermitente, usando as pontas TAP300-G10 (TED PELLA, INC.) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 248 kHz. As imagens obtidas foram tratadas utilizando o programa Gwyddion 2.45. Múltiplas áreas de cada amostra foram examinadas com o propósito de verificar a média de altura de bactérias tratadas e não tratadas, utilizando o programa Gwyddion 2.45.

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.01, para obter a média de altura das cepas foi aplicado o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, com um “n” de 22 amostras. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e os resultados foram expressos como média $\pm$ DPM.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY AGAINST INFECTIOUS AGENTS USING PROPOLIS AS PHOTOSENSITIZER

Alice de Moraes Veras Da Fonseca¹, Guilherme Herbet Leite Sampaio¹, Wlândia Pontes Araujo¹, Raí Emanuel da Silva², Fábio de Oliveira Silva Ribeiro², Manoel da Paixão Brito², Alyne Rodrigues de Araújo², Antonione Santos Bezerra Pinto³

¹Acadêmico(a) do curso de Medicina da Faculdade de Ciências Humanas, Exatas e da Saúde do Piauí/Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba (FAHESP/IESVAP), Parnaíba, Piauí, Brasil

²Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Parnaíba, Brasil

³Docente do curso de Medicina da Faculdade de Ciências Humanas, Exatas e da Saúde do Piauí/Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba (FAHESP/IESVAP), Parnaíba, Piauí, Brasil

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) is a process that uses a light source - the laser -, oxygen molecules and a photosensitizing agent. PDT aims to act against pathogens, including those that are resistant to antimicrobials. The association of PDT with natural drugs, such as propolis, has not been widely studied. Therefore, this study aimed to evaluate, the *in vitro* antimicrobial effect of photodynamic therapy using propolis as a photosensitizing agent. For this purpose, dry propolis extract was used as photosensitizer and low power LASER - PhotonLase III model - was irradiated above the micro well for 90 seconds. Gram-positive and Gram-negative bacterial strains were used in the tests at a concentration of 5×10^5 CFU/mL. Initially, the antibacterial activity of photosensitizers without laser action was determined by a serial microdilution method, and, afterwards, the experiment with the laser was performed. After incubation of the plates in a bacteriological oven, resazurin (0.1%) was added and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. Alterations in the morphology of the bacteria were analyzed by atomic force microscopy (AFM). Bacteria were sensitive to propolis with MICs ranging from 13.75 to 0.85 mg/mL, but no susceptibility was observed for methylene blue without laser addition. A change was observed for the MIC values of propolis against *S. aureus* after irradiation, which decreased from 1.71 mg/mL to 0.85 mg/mL. This behaviour, however, was not observed for *E. coli*, the Gram-negative strain used. In addition, AFM images revealed changes in the size of one of the bacteria tested. Based on the results reported, it was possible to conclude that propolis in association with LASER is more active against Gram-positive bacteria.

Keywords: Photodynamic Therapy, Propolis, Antimicrobial activity.

1. INTRODUCTION

By the use of light, a new field of medicine emerged: the photomedicine, which uses electromagnetic wave in the treatment of diseases. In this regard, the light treatments are classified in three types: phototherapy (use of light, only), photochemotherapy (use of light associated to chemical compounds with UV excitation) and photodynamic therapy (use of photosensitizing agents, with excitation in visible spectrum wavelengths) [1].

Thus, photodynamic therapy (PDT) is characterized by using the following components: a photosensitizing agent, followed by LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) and oxygen molecules [2]. More specifically, the therapeutic effect of PDT is achieved by the formation of singlet oxygen and free radicals after laser irradiation, which results in its activity against a great number of pathogens, including antimicrobial resistant microorganisms [3].

PDT can be used for a vast number of applications, such as the treatment of malignant tumours, fungal infections, tissue repair, healing and, yet, as an antimicrobial agent. In cancer treatment, for example, the use of PDT offers as an advantage a targeted action to the damaged tissue, preserving the adjacent cells [4].

Colon cancer stands out by the necessity of new treatment alternatives, particularly in cases of metastasis. In this regard, PDT has been considered an applicable method. Thus, the development of multifunctional photosynthetic therapies, involving double or triple therapies, could be an option to minimize such characteristics [5]. In relation to the use of PDT for antimicrobial applications, some advantages can be mentioned, including the fact that bacteria cell death can occur faster and, consequently, the use of chemical agents, in high concentrations, for a long period, is no longer required [6].

In this context, natural products have already shown proven efficacy for the treatment of some diseases, once the adverse effects on normal cells are slighter than those observed for the other drugs [7]. In light of this, propolis has been extensively studied and exhibits several properties of interest for the scientific community. Propolis most important properties include antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, cytotoxic [8] and immunostimulating activities [7].

Several studies have highlighted the antimicrobial potential of propolis. Literature reports its effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 and *Escherichia coli* ATCC 25922 [9]. In addition to these strains, *Streptococcus mutans*, as well as *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 have also shown susceptibility to this product [10, 11].

Given extensive evidences of the antimicrobial activity of propolis, along with the applicability of PDT in the medical area, this association was used as an investigation model for the present study. Thus, this research aimed to evaluate the *in vitro* antimicrobial effect of the photodynamic therapy, using propolis as a photosensitizing agent.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Photosensitizer

Dry alcoholic extract of propolis (22%) was used as the photosensitizer. The extract was obtained in rural properties, located in the state of Minas Gerais and kindly supplied by Mel Milagres LTDA (CNPJ 00870513000153).

2.2. Laser

In photodynamic therapy, a low power LASER, with adjusted wavelength and energy, is required. For the propolis and dyes photosensitising procedure, a PhotonLase III was used. This equipment has an active laser medium of gallium arsenide and aluminium (GaAlAs) and 660 nm wavelength. This wavelength corresponds to the high absorption length range for these photosensitizers.

The laser potency used was 100 mW, which was measured before each experiment. The irradiation area in the plate was determined and the laser was irradiated continuously, with the laser fingertip aperture above the microwell, for 90 seconds. The irradiation was carried out in the dark and in a laminar airflow cabinet.

2.3. Preparation of the microorganisms and determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Bacterial strains (*S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 and *S. mutans* ATCC 25175) were previously cultivated in a bacteriological incubator, according to the protocol suggested by CLSI (2015). From the grown colonies, standardized suspensions were prepared in sterile saline solution (NaCl 0.85% w/v), in order to obtain absorbance between 0.08 and 0.13, on 625 nm, corresponding to the McFarland scale ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL), according to the CLSI (2015) recommendations.

Subsequently, to prepare the bacterial inoculum, the microorganisms suspension was diluted in Mueller-Hinton broth or TSB (*Streptococcus mutans* ATCC 25175), to obtain a bacterial concentration of 5×10^5 CFU/mL. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for the photosensitizer (propolis), the LASER (90 s) and the photosensitizer associated to the LASER (90 s) was determined according to CLSI (2015).

Initially, the antibacterial activity of the photosensitizers without the LASER action was determined. For this purpose, these substances were submitted to two-fold serial dilutions, where the propolis concentrations varied from 110 to 0.05 mg/mL, while the concentrations of methylene blue varied from 0.01 to 0.000004%. The experiment was performed in triplicate and the microplates were placed in a bacteriological incubator, at 37 °C, for 24 hours. After that period, the results were observed with the addition of resazurin blue (0.1%), followed by incubation at 37 °C for 20 minutes. By means of the microorganism viability, the dye colour turns from blue to pink. The MIC was defined as the lowest concentration able to visibly suppress the microbial growth.

2.4. Analysis of the antibacterial effect by Atomic Force Microscopy

For AFM imaging, the sub MIC concentrations of the treatments with propolis, propolis + LASER and the bacteria growth control were used in order to observe the possible alterations caused by the treatment towards the bacterial cell morphology. To this end, the same procedure carried out before for the MIC determination was reproduced, with an inoculum of 1×10^5 CFU/mL. For this analysis, the samples were treated as previously described [12].

Images were produced with the aid of a TT-AFM (AFM Workshop - EUA), using the intermittent contact mode, TAP300-G10 (TED PELLA, INC.) probes and a resonance frequency of, approximately, 248 kHz. The software Gwyddion 2.45 was used to treat the images obtained. Multiple areas of each sample were examined in order to analyse the mean height of the treated and untreated bacteria, using the software Gwyddion 2.45. The statistical analysis of the results was performed with the software GraphPad prism 7.01. The mean height of the strains was determined by one-way ANOVA, with Tukey post-test ($n = 22$ samples). Statistical significance was considered for $p < 0.05$ and the results were expressed as mean $\pm$ MSD.

3. RESULTS

3.1. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

The *in vitro* sensibility of the bacterial strains *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 and *S. mutans* ATCC 25175 was assessed by the MIC determination in different groups. The MIC was considered as the lowest photosensitizer concentration able to inhibit bacterial growth. The results were interpreted by the visual reading of the wells. It was observed that the MICs varied from 13.75 to 1.71 mg/mL, as reported in Table 1.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration of the photosensitizer towards the tested bacteria. Results are expressed in mg/mL.

Bacterial Strains	Methylene Blue	Propolis
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	1.71
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	13.75
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	-	1.71

- No inhibitory activity detected.

Without LASER addition, methylene blue had no activity against the selected bacteria in the concentrations tested. On the other hand, in this study propolis showed antibacterial activity against all the strains used.

After the determination of the MIC for the agents without LASER irradiation, the same assay was performed in order to determine the effect of the LASER in this activity. It was verified that the MIC value for propolis against *S. aureus* ATCC 29213 suffered an alteration after LASER irradiation for 90 seconds. This behaviour was not observed for the other strains: *E. coli* ATCC 25922 and *S. mutans* ATCC 25175. These results are represented in Table 2.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of the photosensitizing agents against the tested bacteria after LASER irradiation. Results are expressed in mg/mL.

Bacterial Strains	Methylene Blue and LASER	Propolis and LASER
<i>S. aureus</i>	0.005	0.85
<i>E. coli</i>	-	13.75
<i>S. mutans</i>	-	1.71

- No inhibitory activity detected

According to Table 2, it is possible to observe that the MIC found for methylene blue against *S. aureus* after LASER irradiation for 90 seconds was 0.005%. For *E. coli*, in turn, no activity alteration was observed after LASER irradiation, that is, the LASER did not interfere in the bacterium development. The same was observed for *S. mutans*. The action of LASER irradiation alone was also investigated and the results found showed that it has no antibacterial activity against the strains used in this study.

3.2. Atomic Force Microscopy Analysis

Once the association between propolis and LASER irradiation was able to inhibit *S. aureus* ATCC 29213 growth, this strain was selected for AFM imaging. For that purpose, the contents of the microwells corresponding to the sub MIC concentrations of propolis and the MIC of propolis + LASER were submitted to this analysis, as well as the growth control group.

As represented in Figure 1, *S. aureus* ATCC 29213 growth control group (Figure 1-A) presented a behaviour that characterizes this strain as Gram-positive bacteria. On the other hand, the bacteria treated with propolis showed similar morphology, but, it is possible to observe in Figure 1 (B) that this group had increased height (1.5 μm) when compared to the control (1.13 μm). The bacteria treated with propolis + LASER (Figure 1-C), presented similar behaviour, although the height found for this group was 1.4 μm . In face of these information, it is possible to conclude that both treatments – propolis and propolis + LASER- were able to interfere in the bacteria morphology so that it is possible to observe alterations on its size according to the reported in Figure 1-D.

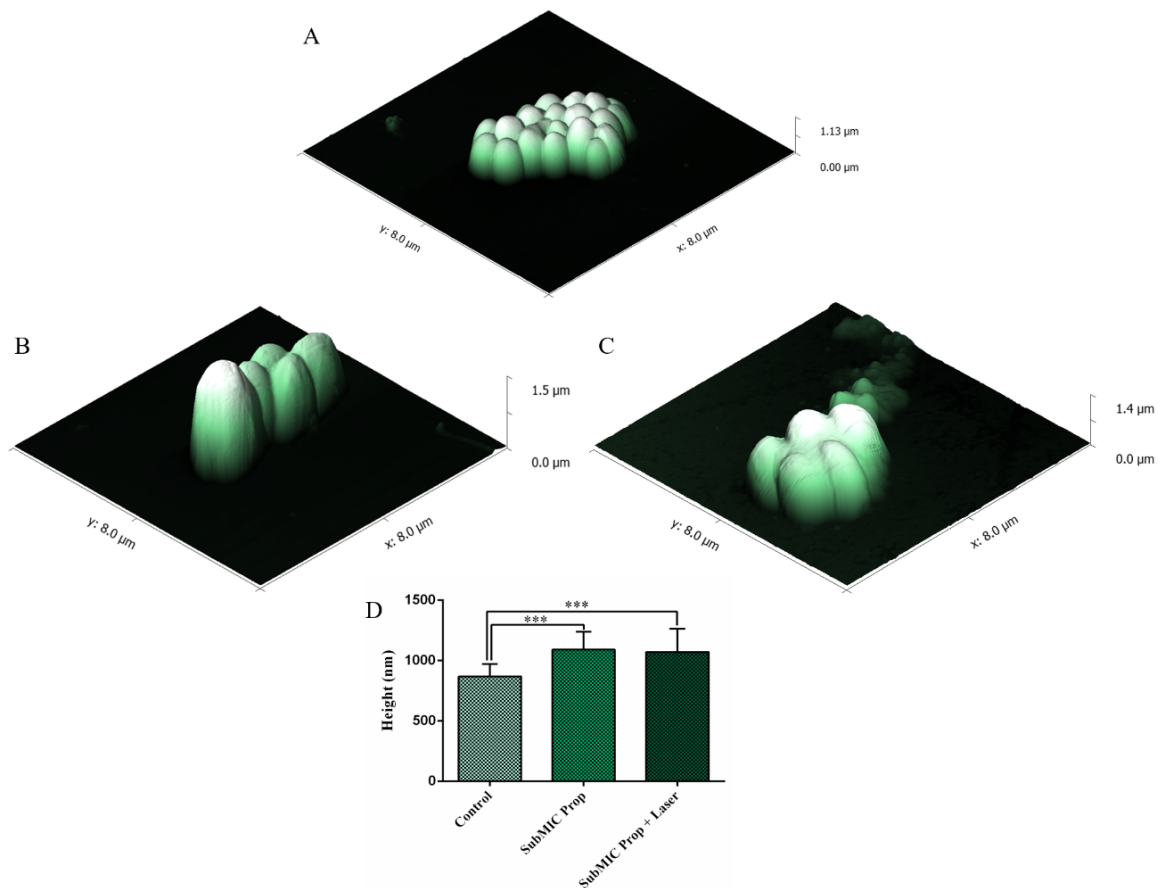


Fig. 1 3D AFM images of *S. aureus* ATCC 29213. Control (A), bacteria treated with propolis (prop) in sub MIC concentration (B) and bacteria treated with propolis + LASER in MIC concentration (C). All the images present the scale bars (X and Y) of 8 μm , with a resolution of 512 pixels. The mean height graph is represented on (D), with results expressed as mean $\pm$ MSD and $p < 0.0001$ (***), which was considered statistically significant.

These observations can also be evidenced by the topographic images of the treatment groups, which demonstrate the alterations.

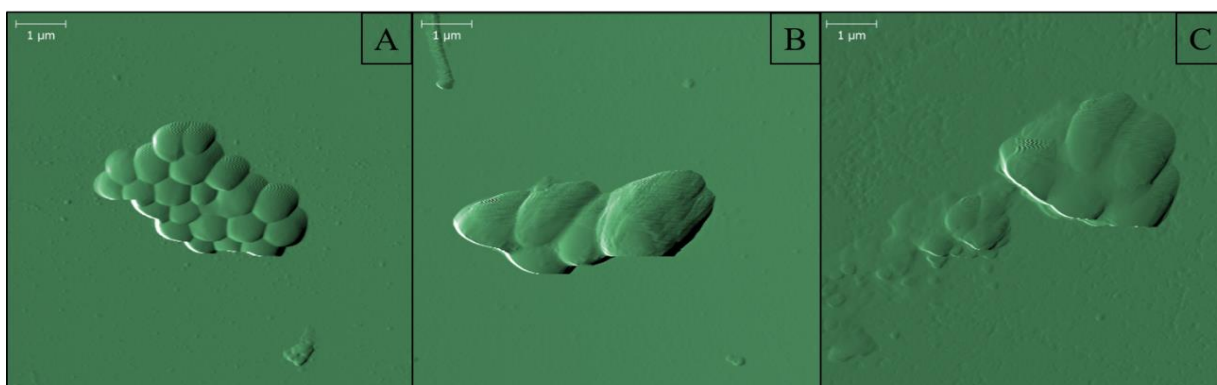


Fig.2 2D AFM images of *S. aureus* ATCC 29213. Control (A), bacteria treated with propolis, in sub MIC concentration (B) and bacteria treated with propolis + LASER, in MIC concentration (C). All the images present the scale bars (X and Y) of 8 μm , with a resolution of 512 pixels.

4. DISCUSSION

Propolis has been extensively investigated, once it exhibits several properties of interest for the scientific community. Its potential has been primarily described in relation to its antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities [13]. In this study, the antibacterial activity of propolis was reiterated, with effect against the three bacterial strains used. From the MIC determination assay, it was possible to observe that propolis inhibited the bacterial growth in concentrations varying from 13.75 to 1.71 mg/mL.

In addition, *S. aureus* also showed sensibility to propolis in this study. These results corroborate with literature, which claims that propolis has a good antibacterial activity towards this species [13, 14]. Similarly, the use of three methicillin resistant species and one sensible species allowed demonstrating that green propolis was able to inhibit the growth of these bacteria [15]. In addition to these, the propolis used in this study was also able to inhibit *S. mutans* growth. These findings are in agreement with the effects previously observed, which showed that this product is also able to inhibit *S. mutans* growth [10].

These results might be associated to the presence of flavonoids and other aromatic compounds in the extract, which act on the Gram-positive bacteria cell wall [13]. Methylene blue, in turn, did not inhibit the growth of the abovementioned strains, even in the highest concentration used. This observation is also in agreement with literature reports, which only found antibacterial activity for methylene blue after LASER addition [16, 17].

Based on the results obtained, the LASER influence on the antibacterial activity of propolis was investigated. It was observed that the LASER addition only improved propolis activity against *S. aureus* ATCC 29213, as well as granted antibacterial activity for methylene blue against the same strain. Hence, it was possible to conclude that the light source was able to influence the activity of the photosensitizing agent against *S. aureus* ATCC 29213.

S. aureus is frequently associated to several human infections, such as cutaneous infections – simple folliculitis, for example -, impetigo, boils and carbuncles, as well as surgical wounds infections [18]. So, the effect obtained by the association of propolis and LASER demonstrates that this method is efficient on the growth inhibition of this important bacterial species, involved in several infectious processes.

No changes on MIC were observed for the activity of propolis after LASER addition against *S. mutans* ATCC 25175, which maintained the values previously found. The same behaviour was observed for *E. coli* ATCC 25922, which demonstrated more resistance to propolis action, not only when the product was used alone, but also when propolis was associated to the LASER.

The antibacterial activity of propolis against *E. coli* has already been reported [11], although the methods used were different from those applied in this study. However, literature reports the effect of this product against this species. Due to its cell wall structure, which is more complex than the one found for Gram-positive bacteria, Gram-negative species are, usually, more resistant to the action of antibiotics. Often, these antibiotics may not be able to go beyond the lipid bilayer, what can explain the lower susceptibility of this species to the propolis used [19]. Furthermore, this bacteria can acquire genes that are located in the plasmids, which confer them resistance to different classes of antibiotics [20].

This resistance presented by Gram-negative bacteria towards the action of propolis has been attributed to the high lipid content and complexity of the cell wall formed by the presence of differentiated lipopolysaccharidic substances, which grant the bacteria antigenicity and pathogenicity [9]. In this context, *E. coli* drug-resistant can be transmitted to human beings with the use of antibiotics in animal food, propagating this resistance to slaughtered animals, the food derived, and the environment [21]. In the WHO urgency list in the new antibiotics the *E. coli* is in critical priority because this bacteria is among the three most multiresistant [22].

As propolis effect against *S. aureus* was improved after LASER application for 90 seconds, that species was selected for atomic force microscopy analysis, in order to assess the morphological alterations that could have occurred after the exposition to the treatments. For this purpose, the treatment with propolis alone and propolis with LASER were considered.

Figures 1 and 2 allow the observation of size alterations on the bacteria, when compared to the control group. The group treated only with propolis was considerably higher than the control group. Similarly, the treatment with propolis + LASER also provided statistically significant alterations when compared to the control group, with 1.4 μm height. These results show that the antibacterial effect of propolis against *S. aureus* was induced by altering the bacteria morphology, changing their sizes.

Morphological alterations, as a function of time, promoted by the ethanolic extract of propolis against the same species used in this study, have also been reported by atomic force microscopy analysis [23]. These analysis revealed that in a time of 4 hours of exposition to the product, the bacteria presented slight differences on the size. After 12 hours in contact with the extract, the microorganisms presented increased volume, what, according to the authors, may have occurred due to the loss of morphological characteristics, as well as the presence of lysis [23].

After the treatment with propolis extract, *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis were analysed by the same method [24]. In the analysis, the occurrence of morphological and size modifications was evidenced. It is worth to mention that, facing these information, the alterations promoted by both treatments performed in the present study indicate that the effect of propolis is involved in the size of the bacteria. It is also important to highlight that the analysis were carried out after 24 hours of contact with propolis and propolis with LASER application. The propolis used in this study is a commercial product, thus, its composition is different from the extracts used in the abovementioned studies.

The results obtained allowed to observe that propolis may be used as a photosensitizing agent in the application of photodynamic therapy for the treatment of infectious agents, including *S. aureus* ATCC 29213, which presented sensibility to the applied method. According to the atomic force microscopy results, it was also possible to infer that the antibacterial effect of this product is associated with alterations in the bacteria size.

These observations point to the necessity of performing more studies, in order to demonstrate the mechanism that leads to such alterations. Besides, the investigation of the method tested in the present research against other bacterial strains needs to be performed, purposing to demonstrate its effect against other infectious agents.

5. CONCLUSION

Based on the results reported, it was possible to conclude that propolis is more active against Gram-positive bacteria and the photodynamic therapy improved its activity against one of the strains tested. It was also possible to observe that *S. aureus* ATCC 29213 strain was sensible to the applied method, while the most resistant strain was *E. coli* 25922. This resistance was observed for both treatments: propolis alone and propolis associated to the application of light source.

REFERENCES

1. Núñez SC, Ribeiro MS, Garcez AS. (2013) PDT Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na Odontologia. Rio de Janeiro, Brasil
2. Issa MCA, Manela-Azulay, M. (2010) Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. An Bras Dermatol 85: 501-511
3. Noh I, Lee D, Kim H, et al (2017) Enhanced Photodynamic Cancer Treatment by Mitochondria-Targeting and Brominated Near-Infrared Fluorophores. Adv Sci (Weinh) 5:481-491
4. Yoo JO, Ha KS (2012) New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. Int Rev Cell Mol Biol 295: 139-174.
5. Hodgkinson N, Kruger CA, Abrahamse H (2017) Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. Tumour Biol 39: 1-17
6. Wilson M (2004) Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. Photochem Photobiol Sciv. 3: 412-418
7. Ahn JC, Biswas R.; Chung PS. (2013) Synergistic effect of radachlorin mediated photodynamic therapy on propolis induced apoptosis in AMC-HN-4 cell lines via caspase dependent pathway. Photodiagnosis Photodyn Ther 10: 236-243.

8. Silva RPD, Machado BA, Barreto GA, et al (2017) Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. Plosone, 12: e0172585
9. Sinhorini WA, Bordin JT, Vignoto VKC et al (2015) Atividade antibacteriana in vitro da própolis testadas em cepas bacterianas padrão. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública 1: 107-111
10. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL et al. (2007) Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. Quím. Nova 30: 1512-1516
11. Portilho DR, Melo IA, Guerra RC et al. (2013) Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. Revta Cient. ITPAC 6: 1-8
12. Araújo AR, Quelemes PV, Perfeito MLG et al (2015) Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. Extract and fractions. Ann Clin Microbiol Antimicrob 14: 25
13. Silva FRG, Matias TMS, Souza LIO et al (2018) Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. Braz J Biol 79: 452-459
14. Júnior FA, Lopes MMR, Colombari V et al (2006) Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. Ciência Rural 36: 294-297
15. Aguiar CG, Lima LG, Athayde LA (2015) Efeito antimicrobiano da própolis verde frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA). Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde 1: 14-18
16. Gueorgieva T, Dimitrov S, Dogandhiyska V et al. (2010) Susceptibility of *S. aureus* to methylene blue haematoporphyrin, phthalocyanines photodynamic effects. J IMAB-Anno Preceed 16: 51-53
17. Oliveira BP, Lins CCSA, Diniz FA et al. (2014) *In Vitro* antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms. Braz J Oral Sci 13: 53-57
18. Sousa CP, Ratti RP (2009) *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. Rev Ciênc Farm Básica Apl, 30: 137-143
19. Normark BH, Normark S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. J Intern Med 252: 91-106
20. Nang SC, Li J, Velkov T (2019) The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. Crit Rev Microbiol 23: 1-31

21. Pormohammad A, Nasiri MJ, Azimi T (2019) Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infect Drug Resist* 12: 1181-1197
22. WHO (2017) WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Accessed 19 June 2019
23. Campos JV, De Assis OBG, Bernardes Filho, R. (2017) Análise por AFM da ação dos extratos de própolis verde sobre as morfologias de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1081301/analise-por-afm-da-acao-do-estratos-de-propolis-verde-sobre-as-morfologias-de-bacterias-staphylococcus-aureus-e-escherichia-coli>. Accessed 20 June 2019
24. Santana HF, Barbosa AA, Ferreira SO, Mantovani HC (2012) Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World J Microbiol Biotechnol*, 28: 485-491

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos conclui-se que a própolis é mais eficaz contra bactérias Gram-positivas e que a terapia fotodinâmica pode ajudar na inibição do crescimento desse micro-organismo, melhorando a sua atividade. Conclui-se ainda que a bactéria *S. aureus* ATCC 29213 foi a espécie sensível ao método aqui empregado e a mais resistente foi a espécie *E. coli* ATCC 25922, e que essa resistência foi tanto quando tratada com a própolis sozinha, como também no tratamento com aplicação da fonte de luz.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, C.G.; Lima, L.G.; Athayde, L.A. Efeito antimicrobiano da própolis verde frente a cepas de *staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 14-18, 2015.
- Ahn, J.C.; Bilwas, R.; Chung, P.S. Synergistic effect of radachlorin mediated photodynamic therapy on propolis induced apoptosis in AMC-HN-4 cell lines via caspase dependent pathway. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p.236-243, 2013.
- Benvindo, R.G. *et al.* Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias in vitro. **Fisioterapia e pesquisa**, v. 15, n. 1, p. 53-57, 2008.
- Cabral, I.S.R. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, 2009.
- Calzavara-pinton, P.G.; Venturini, M.; Sala, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. 2007; 21:293-302.
- Campos, J.V.; Assis, O.B.G.; Filho, R.B. Análise por AFM da ação do extratos de própolis verde sobre as morfologias de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. In: Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio. 2017, São Carlos. **Anais: Embrapa Instrumentação - Artigo em anais de congresso**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017. p. 327-330.
- Castro, M.L. *et al.* Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, 2007.
- Donnelly, R.F.; McCarron, P.A.; Tunney, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.
- Dutra, R.C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- Frangež, I.; Nizič-kos, T.; Frangež, H.B. Phototherapy with LED shows promising results in healing chronic wounds in Diabetes Mellitus patients: A Prospective Randomized Double-Blind Study. **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 20, n. 20, 2018.
- Fritsch, C.; Goerz, G.; Ruzicka, T. Photodynamic therapy in dermatology. **Arch Dermatol**.134:207-14,1998.
- Gueorgieva, T. *et al.* Susceptibility of *S. aureus* to methylene blue haemato porphyrin, phtalocyanines photodynamic effects. **J. IMAB-AnnoPreceed**, v. 16, n. 4, 2010.

Guimarães, D.O. *et al.* Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

Haghdoust, N.S. *et al.* Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 4, p.298-305, 2016.

Hodgkinson, N.; Kruger, C.A.; Abrahamse, H. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. **Tumor Biology**, v. 39, n. 10, p. 1010428317734691, 2017.

Imparato, J.C.P. *et al.* Tratamento Restaurador Atraumático (ART): Técnicas de Mínima Intervenção para o Tratamento de Doença Cárie Dentária. **Editora Maio, Curitiba, Brasil**, 2005.

Issa, M.C.A.; Manela-azulay, M. Terapia fotodinâmica: Revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.

Júnior, F.A. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellífera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n. 1, p.294-297, 2006.

Noh, I. *et al.* Enhanced Photodynamic cancer treatment by mitochondria-targeting and brominated near-infrared fluorophores. **Advanced Science**, v. 5, n. 3, p.1700481-1700491, 2017.

Normark, B.H.; Normark, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of internal medicine**, v. 252, n. 2, p. 91-106, 2002.

Núñez, S.C.; Ribeiro, M.S.; Garcez, A.S. **PDT: Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na Odontologia**. 1º. ed. Rio de Janeiro-RJ: ELSEVIER, 2013.

Oliveira, B.P. *et al.* In Vitro antimicrobial photo activation with methylene blue in different microorganisms. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 13, n. 1, p. 53-57, 2014.

Portilho, D.R. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revta Cient. ITPAC**, v. 6, p. 1-8, 2013.

Rozatto, M.R. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. 2012.

Santana, H.F. *et al.* Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 485-491, 2012.

Senna, A.M. **Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da estomatite protética**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Silva, F.R.G. *et al.* Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of there propolis Alagoas. **Brazilian Journal of Biology**, n. AHEAD, 2018.

Silva, R.P.D. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plosone**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

Sinhorini, W.A. *et al.* Atividade antibacteriana in vitro da própolis testadas em cepas bacterianas padrão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 107-111, 2015.

Schelz, Z.; Molnar, J.; Hohmann, J. Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 279-285, 2006.

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

Sousa, C.P.; Ratti, R.P. *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2009.

Suzuki, L.C. **Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo do efeito fotodinâmico**. 2009. 35 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Tecnologia Nuclear - Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Taub, A. F. Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons. **J Drugs Dermatol**; 3 (1 Suppl) : S8-25, 2004.

Taylor, E.L.; Brown, S.B. The advantages of amino levulinic acid Photodynamic Therapy in dermatology. **J Dermatolog Treat.**, 13 Suppl 1:S3-11, 2002.

Van V.S.; H, D. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009–2016. **Journal of Ethnopharmacology** v. 218, p. 236-252, 2017.

Vilela, S.F.G. **Ação de Diferentes Fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana**. 2017. 19-28 p. Dissertação (Odontologia)- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2010.

Wang, C.; *et al.* Brazilian green propolis extract synergizes with protoporphyrin ix-mediated Photodynamic Therapy via Enhancement of Intracellular Accumulation of

Protoporphyrin IX and Attenuation of NF- κ B and COX-2. **Molecules**, v. 22, n. 5, p.732-732, 2017.

Wilson, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p.412-418, 2004.

Yoo, J.O.; Kwon-Soo H.A. New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. In: **International review of cell and molecular biology**. Academic Press, p. 139-174, 2012.

ANEXO

ANEXO I – NORMAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA LASERS IN MEDICAL SCIENCE

1. Types OF PAPERS

Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures

2. 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, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

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.

3. 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 \(zip, 183 kB\)](#)

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.

4. 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.

5. 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. <https://doi.org/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* 341:325–329

- Article by DOI

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

6. 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.

7. ARTWORK AND ILLUSTRATION 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.

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.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 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 large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 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

8. 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.

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 submitted as .csv or .xlsx 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)

9. 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 is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially 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 concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- 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 (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

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

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript 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:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is maintained on the platform, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

10.COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARD

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.

11. 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

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.