

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA
DISCIPLINA DE PERIODONTIA**

**Gabriela Scarton Barriquello
Jessica Klöckner Knorst**

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO COM
CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs**

**Santa Maria, RS
2016**

**Gabriela Scarton Barriquello
Jessica Klöckner Knorst**

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO COM
CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Cirurgião-Dentista**.

Orientadora: Prof. Dra. Karla Zanini Kantorski

Santa Maria, RS

**Gabriela Scarton Barriquello
Jessica Klöckner Knorst**

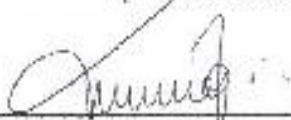
**EFEITO ANTIMICROBIANO DE FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO COM
CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Odontologia
da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do grau de
Cirurgião-Dentista.

Aprovado em 1 de julho de 2016:



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



Thiago Machado Ardenghi, Dr. (UFSM)
(Avaliador)



Fabrício Batistin Zanatta, Dr. (UFSM)
(Avaliador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecemos a Deus, por renovar a cada momento a nossa força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa caminhada.

Aos nossos pais, que abraçaram os nossos sonhos como se fossem seus e dedicaram grande parte das suas vidas à nossa formação pessoal e profissional. Obrigada por acreditarem e investirem em nós.

Àqueles que Deus nos trouxe de presente na forma de irmãos, por todas as risadas, amizade, amor e companheirismo.

Aos nossos namorados, obrigado pelo carinho, paciência e pela capacidade de nos trazer paz na correria do dia a dia.

A Professora Karla pela confiança e expectativa que depositou em nós, os ensinamentos que para sempre serão levados na nossa vida profissional e pessoal e o exemplo da dedicação àqueles que dependem tanto de nós.

À Patrícia pela paciência, empenho, relação de amizade construída, o incentivo pela busca da perfeição e as horas dedicadas para a realização do nosso trabalho.

Aos professores Fabrício, Thiago e Kátia pela contribuição no nosso desenvolvimento e por dedicar suas vivências para aperfeiçoar esse trabalho.

Enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, todos os funcionários e professores do curso de Odontologia pelos cinco anos de construção, aos colegas de turma pelos laços criados e os momentos compartilhados e as pessoas que confiaram sua saúde aos nossos cuidados.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para que conseguíssemos chegar até aqui, nossos sinceros agradecimentos.

*"Ninguém caminha sem aprender a caminhar,
sem aprender a fazer o caminho caminhando,
refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a
caminhar."*

(Paulo Freire)

RESUMO

EFEITO ANTIMICROBIANO DE FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO COM CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs

AUTORAS: Gabriela Scarton Barriquello e Jessica Klöckner Knorst
ORIENTADORA: Karla Zanini Kantorski

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano fotodinâmico de formulações de azul de metileno (AM) contendo carreador de oxigênio em diferentes pHs em terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 formados sobre espécimes acrílicos durante 5 dias foram tratados com TFDa nas diferentes formulações: AM 7,4; AM 5,6; AM/carreador 7,4; AM/carreador 5,6. Biofilme não exposto ao tratamento foi utilizado como controle. Um examinador cego para os grupos experimentais realizou a contagem das colônias formadas nas placas e o cálculo de unidade formadora de colônia (UFC) por mL de suspensão (UFC/mL). Anova dois fatores, foi utilizado para determinar o efeito dos fatores solvente (água *versus* carreador) e pH (7,4 *versus* 5,6). Anova um fator e post hoc Tukey foram usados para avaliar as diferenças entre os cinco grupos de comparação (controle; AM/carreador 7,4; AM 7,4; AM/carreador 5,6; AM 5,6). O programa *Statistics* 8.0 foi utilizado para todas as análises. Nível de significância de 5% foi utilizado para todas as avaliações. O fator solvente não foi significativo ($P=0,18$), enquanto o fator pH (apresentou significância estatística ($P=0,01$)). Todos os grupos apresentaram redução estatística de *P. aeruginosa* em comparação ao grupo controle. Quando o carreador foi usado, a formulação de AM com pH 7,4 apresentou redução estatisticamente maior de *P. aeruginosa* do que a formulação com pH 5,6.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica antimicrobiana; *Pseudomonas aeruginosa*, biofilme; laser.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL EFFECT OF METHYLENE BLUE FORMULATIONS WITH OXYGEN CARRIER AT DIFFERENT pHs

AUTHORS: Gabriela Scarton Barriquello and Jessica Klöckner Knorst
ADVISOR: Karla Zanini Kantorski

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial photodynamic effect of methylene blue (MB) formulations containing oxygen carrier at different pHs in antimicrobial photodynamic therapy (PDT). Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 formed about acrylics specimens during five days were treated PDT with the different formulations: AM 7.4; AM 5.6; AM/carrier 7.4; AM/carrier 5.6. Biofilms not exposed to treatment was used as control. A blind examiner for the experimental groups performed the counting of colonies formed on the plates and calculating of colony forming unit (CFU) per ml suspension (CFU/mL). Two-factor ANOVA was used to determine the effect of factors solvent (carrier *versus* water) and pH (7.4 *versus* 5.6). One factor ANOVA and post hoc Tukey test was used to evaluate differences among the five comparator groups (control, AM/carrier 7.4, AM 7.4; AM/carrier 5.6, AM 5.6). The *Statistica* 8.0 software was used for all analyzes. Significance level of 5 % was used to all such assessments. All of photodynamic therapy groups showed a statistically significant reduction in *P. aeruginosa* compared to the control group. When the carrier has been used, AM formulation at pH 7.4 presented a statistically greater reduction of *P. aeruginosa* than the formulation with pH 5.6.

Keywords: Antimicrobial photodynamic therapy; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; laser.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – Azul de metileno

AT – Azul de toluidina

BHI – Infusão cérebro coração (do inglês “Brain Heart Infusion”)

cm – Centímetros

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Fs – Fotossensibilizador

J – Joule

log – Logaritmo

LPS – Lipopolissacarídeos

ml – Mililitros

mm – Milímetros

mW – Miliwatts

nm – Nanômetro

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PFCs – Perfluorcarbonos

pH – Potencial Hidrogênico

RAR – Raspagem e alisamento radicular

rpm – Rotações por minuto

TFDa – Terapia fotodinâmica antimicrobiana

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

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – Ultravioleta

W – Watts

µL – Microlitros

µM – Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	9
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 HIPÓTESE	15
4 ARTIGO	16
Resumo	17
Introdução	18
Materiais e Métodos	20
Resultados	23
Tabelas	24
Discussão	24
Conclusão	26
Referências	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	40

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Periodontite é uma doença infecciosa causada por patógenos periodontais em um hospedeiro suscetível, tendo como fator etiológico primário o biofilme bacteriano (PAGE & KORNMAN, 1997). Periodontite resulta em destruição dos tecidos periodontais de suporte tendo como desfecho final a perda do elemento dentário, caso não tratada (ALBANDAR, 1999). O tratamento padrão-ouro consiste na desorganização mecânica do biofilme subgengival por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR) (COOB, 2002). Entretanto, a terapia mecânica pode ser inefetiva em algumas condições clínicas. Diabetes mellitus (KNIGHT et al. 2016), fumo (BERGSTRÖM, ELIASSON, DOCK 2000), periodontite agressiva (ARWEILER et al. 2014), características anatômicas do sítio, como concavidades radiculares e lesões de furca (TOMASI; LEYLAND; WENNSTRÖM, 2007; SALVI et al. 2014) podem ser associados com respostas deficientes ao tratamento periodontal.

O uso adjuvante de antibióticos sistêmicos vem sendo preconizado para sobrepor as limitações do tratamento mecânico em situações específicas. Duas revisões sistemáticas com metanálise, SGOLASTRA et al. (2012a, 2012b) verificaram diferenças estatisticamente significantes a favor da raspagem e alisamento radicular associada ao uso de antibióticos sistêmicos em comparação ao tratamento mecânico somente. O ganho de inserção clínica foi de 0,21mm (IC 95%, 0,02-0,4) e de 0,42mm (IC 95%, 0,23-0,61) maior com a terapia combinada nas periodontites crônicas e agressivas, respectivamente. De maneira geral, as evidências apontam que o uso adjuvante de antibióticos sistêmicos no tratamento das periodontites parece trazer duvidosos benefícios no que se refere a relevância clínica, mesmo em pacientes diabéticos (GRELLMANN, 2016). Além disso, antibióticos administrados sistemicamente podem causar efeitos colaterais com repercussões sistêmicas, como infecções oportunistas e reações de hipersensibilidade. Ainda, a necessidade de sobrepor os antimicrobianos convencionais devido a microrganismos patogênicos resistente a várias drogas tem impulsionado a exploração de novos enfoques para controlar infecções microbianas (KOURTESI et al. 2013).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) vem sendo proposta com alternativa aos antibióticos sistêmicos para o tratamento das periodontites. Dentre suas vantagens estão a eliminação bacteriana rápida, segurança aos tecidos do

hospedeiro, e baixa probabilidade de resistência microbiana (HAMBLIN; HASAN, 2004; MAISCH, 2007; RAGHAVENDRA, 2009). TFDa envolve a aplicação local de um fotossensibilizador (Fs) não tóxico, que quando ativado por luz de comprimento de onda adequado absorve energia. No seu estado tripleto excitado, o Fs pode perder energia retornando ao seu estado fundamental; ou pode transferir sua energia excitacional para outras moléculas do meio através de dois mecanismos Reação tipo I - o Fs reage com o substrato do meio ocorrendo abstração de hidrogênio ou transferência de elétrons entre o Fs e biomoléculas gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), os quais podem iniciar reações redox resultando em dano microbiano; ou Reação tipo II - o Fs reage com o oxigênio molecular em decorrência de uma transferência de energia via colisão entre o Fs no estado tripleto excitado com o oxigênio molecular que resulta na formação de oxigênio singleto, altamente citotóxico aos microrganismos devido a sua forte atividade oxidativa (HARRIS et al., 2005). Os produtos gerados a partir das reações tipo I e II são antimicrobianos, mas o oxigênio singleto tem sido considerado o principal responsável pelo efeito antimicrobiano da TFDa (GEORGE; KISHEN, 2007). As reações tipo I e tipo II podem ocorrer simultaneamente, e a razão entre elas depende da concentração de substrato e de oxigênio, e do tipo de Fs utilizado (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Ensaio clínico randomizado que compararam o tratamento mecânico versus o uso adjunto da TFDa para o tratamento das periodontites, parecem convergir para efeitos adicionais com a utilização da terapia combinada (ALWAEELI; AL-KHATEEB; AL-SADI, 2013; GE et al., 2011). Alguns estudos utilizaram como Fs o azul de metileno (AM) (BALATA et al., 2013; CAMPOS et al., 2013; GE et al., 2011), enquanto outros utilizaram o azul de toluidina (AT) (BASSIR et al., 2013; POURABBAS et al., 2014; THEODORO et al., 2012). Alguns autores apontaram vantagens para a terapia combinada em termos de redução de profundidade de sondagem, ganho de inserção clínica e redução de sangramento a sondagem (CAMPOS et al., 2013; GE et al., 2011; THEODORO et al., 2012). Em recente metanálise, diferenças estatísticas significantes a favor da terapia combinada quanto a redução de profundidade de sondagem (média de 0,19 mm, IC 95% 0,07-0,31) e ganho de inserção clínica (média 0,37 mm, IC 95% 0,26-0,47), foram verificadas, mas os benefícios clínicos foram considerados de pequena magnitude

(SGOLASTRA et al., 2013). Em pacientes diabéticos, associação de RAR com TFDa resultou em maior redução de profundidade de sondagem para bolsas inicialmente moderadas em dentes monorradiculares quando comparada com RAR e doxiciclina (RAMOS et al. 2016) e ainda parece reduzir os níveis de hemoglobina glicada (MACEDO et al. 2014). Os benefícios da RAR com TFDa foram limitados em relação aos demais parâmetros periodontais, mas indica que a TFDa pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos sistêmicos (RAMOS et al. 2016).

Neste contexto, tentativas para otimizar o efeito da TFDa tem sido realizadas. Novos Fs (LU et al. 2010, DERYABIN et al. 2015), mudanças no solvente das formulações (GEORGE & KISHEN 2007, PROCHNOW et al. 2015), adição de carreadores de oxigênio (GEORGE & KISHEN 2007), uso de nanoplateformas para aplicação dos Fs (KEPLAC-CERAJ et al. 2011, SHERESTHA et al. 2012), inibidores de *efflux pump* (TEGOS et al. 2009, KISHEN et al. 2010), anticorpos conjugados aos Fs (EMBLETON et al. 2004) tem sido investigados.

Um Fs ideal não deve apresentar toxicidade, além de possuir alto rendimento quântico de oxigênio singleto, alta afinidade de ligação aos microrganismos, amplo espectro de ação, baixa afinidade de ligação as células teciduais, baixa probabilidade de resistência bacteriana e mínimo risco de promover processos mutagênicos (JORI, 2006). Azul de metileno (AM), um Fs derivado da fenotiazina, é seguramente reconhecido para o uso em seres humanos (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1990). Estudos relatam que o AM consegue penetrar a membrana externa de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SOUKOS, 2000) além de o seu uso na TFDa apresentar evidências na redução da viabilidade da *P. aeruginosa* em biofilmes (BIEL, 2011). O AM é composto por um anel aromático tricíclico planar. Devido a suas moléculas possuírem carga positiva há um favorecimento na interação com as paredes celulares bacterianas, as quais são carregadas negativamente, o que induz assim um dano localizado e possibilita a penetração intracelular (WAINWRIGHT, 2000). Além disso, o AM possui características hidrofílicas as quais facilitam a passagem pelos canais proteína-porina da membrana externa bacteriana, que são preenchidos por água (USACHEVA, 2001). O AM se liga aos polifosfatos da membrana externa da bactéria e produz danos aos lipídeos e proteínas. Intracelularmente interage nas estruturas do ácido nucléico, principalmente em regiões ricas em guanina-citosina, levando a uma quebra de cadeia além da degradação oxidativa das bases via oxigênio singleto

(USACHEVA 2001; WAINWRIGHT 2000). Também pode ser atraído pelo ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial causando danos oxidativos (SEVERINO et al., 2003).

Sabe-se que o oxigênio molecular é um pré-requisito para a formação de oxigênio singleto. No biofilme dental existem áreas com diferentes gradientes de oxigênio, inclusive de anaerobiose, portanto, uma combinação apenas de Fs e luz pode não ser o suficiente para a erradicação eficaz do biofilme (SAJI, 2008). A utilização de um carreador de oxigênio na formulação do Fs pode otimizar a disponibilidade de oxigênio e facilitar a propagação de luz durante a fase de irradiação. Conseqüentemente, há um aumento significativo na produção de oxigênio singleto, aumentando assim o potencial de oxidação fotoquímica, facilitando o rompimento da matriz do biofilme e a erradicação das bactérias (SAJI, 2008). Perfluorcarbonos (PFCs), como o perfluordeceno, podem ser utilizados para essa finalidade (AMARAL, 2006). Sua composição é derivada do petróleo e é sintetizada pela substituição de átomos de hidrogênio por átomos de flúor em moléculas de hidrocarbonetos. A solubilidade do oxigênio em PFCs é de 10 a 20 vezes maior do que em água pura, e as suas características aumentam de forma significativa a taxa de transferência de oxigênio da fase gasosa para microrganismos (RIESS 1982; ELIBOL, 1995).

Outro aspecto que tende a influenciar no efeito fotodinâmico é o pH das formulações de Fs (JIANG, 2010). Quanto mais alto o pH da solução, maior a quantidade de radicais hidroxila (OH) presentes no meio. Esses radicais reagem com biomoléculas ou se combinam entre si e formam o peróxido de hidrogênio, o qual possui efeitos citotóxicos (WAINWRIGHT, 2003). No entanto, há evidências de que uma série ftalocianinas fotossensíveis modificadas apresentam maior potencial para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singleto em meio ácido (JIANG, 2010). Não existem evidências demonstrando o efeito do pH sobre o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica quando o AM é usado como Fs.

Bactérias Gram-positivas apresentam maior susceptibilidade a TFDa do que as Gram-negativas (SOUKOS, 2011), visto que estas possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) e canais de porina que atuam como barreira para a penetração do fotossensibilizador. Dentre essas bactérias temos a *Pseudomona aeruginosa*, um patógeno oportunista que se multiplica facilmente em pacientes imunocomprometidos, e está comumente associado às infecções

hospitalares, como a pneumonia associada a ventilação mecânica, septicemia e infecções no trato urinário (FUGITANI, 2011). Devido ao seu elevado grau de flexibilidade genômica, a *P. aeruginosa* tem a capacidade de expressar diversos fenótipos, sendo assim reconhecida pela sua resistência intrínseca a antibióticos (HANCOCK, 2000; SHARMA, 2014), que pode ser de 10 a 1000 vezes maior do que na cultura planctônica (MEISEL, 2005). Para a morte da *P. aeruginosa*, se faz necessária uma concentração mais elevada de luz e Fs. Portanto, a *P. aeruginosa* consiste em um modelo importante para avaliar o efeito da TFDa (USACHEVA, 2001).

Os objetivos do presente estudo foram: (1) comparar o efeito antimicrobiano da TFDa entre formulações comumente empregadas, contendo AM em solução aquosa, com uma formulação experimental contendo AM e uma substância carreadora de oxigênio; e (2) avaliar o efeito do pH das formulações de AM sobre efeito antimicrobiano em biofilmes de *P. aeruginosa*. Nossa hipótese considerou que a formulação contendo o carreador de oxigênio resultaria no maior efeito antimicrobiano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antimicrobiano fotodinâmico de formulações de AM contendo carreador de oxigênio em diferentes pHs sobre biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Comparar o efeito antimicrobiano da TFDa entre formulação contendo AM em solução aquosa com uma formulação experimental contendo AM e uma substância carreadora de oxigênio em biofilmes de *P. aeruginosa*;
- b) Avaliar o efeito do pH das formulações de AM sobre efeito antimicrobiano em biofilmes de *P. aeruginosa*.

3 HIPÓTESE

A hipótese conceitual foi que formulações contendo AM e carreador de oxigênio apresentariam maior efeito antimicrobiano do que formulações de AM sem carreador.

4 ARTIGO

EFEITO ANTIMICROBIANO DE FORMULAÇÕES DE AZUL DE METILENO COM CARREADOR DE OXIGÊNIO EM DIFERENTES pHs: ESTUDO PILOTO

Jessica Klöckner Knorst¹, Gabriela Scarton Barriquello¹, Karla Zanini Kantorski²

¹ Curso de Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

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

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

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

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

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito antimicrobiano fotodinâmico de formulações de azul de metileno (AM) contendo carreador de oxigênio em diferentes pHs em terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Material e Métodos: Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 formados sobre espécimes acrílicos durante 5 dias foram tratados com TFDa nas diferentes formulações: AM 7,4; AM 5,6; AM/carreador 7,4; AM/carreador 5,6. Biofilme não exposto ao tratamento foi utilizado como controle. Um examinador cego para os grupos experimentais realizou a contagem das colônias formadas nas placas e o cálculo de unidade formadora de colônia (UFC) por mL de suspensão (UFC/mL). Anova dois fatores, foi utilizado para determinar o efeito dos fatores solvente (água *versus* carreador) e pH (7,4 *versus* 5,6). Anova um fator e post hoc Tukey foram usados para avaliar as diferenças entre os cinco grupos de comparação (controle; AM/carreador 7,4; AM 7,4; AM/carreador 5,6; AM 5,6). O programa *Statistics* 8.0 foi utilizado para todas as análises. Nível de significância de 5% foi utilizado para todas as avaliações. Resultados: O fator solvente não foi significativo ($P=0,18$), enquanto o fator pH (apresentou significância estatística ($P=0,01$)). Quando o carreador foi usado, a formulação de AM com pH 7,4 apresentou redução estatisticamente maior de *P. aeruginosa* do que a formulação com pH 5,6. Conclusão: Todos os grupos da TFDa apresentaram redução estatisticamente significativa de *P. aeruginosa* em comparação ao grupo controle, assim, a TFDa parece promissora para atuar como coadjuvante no tratamento de infecções localizadas.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica antimicrobiana; *Pseudomonas aeruginosa*, biofilme; laser.

INTRODUÇÃO

Infecções causadas por microrganismos antibióticos-resistentes vem sendo associadas com significativa morbidade e mortalidade [1]. A necessidade de sobrepor os antimicrobianos convencionais devido a microrganismos patogênicos resistentes a várias drogas tem impulsionado a exploração de novos enfoques para controlar infecções microbianas [2].

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) vem sendo proposta com alternativa aos antibióticos sistêmicos [3] com baixa probabilidade de causar resistência bacteriana [4], sendo efetiva contra cepas resistentes à antibióticos [5]. TFDa envolve a aplicação de um fotossensibilizador (Fs) que quando ativado por luz de comprimento de onda adequado reage com moléculas do meio gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (reação Tipo I) e oxigênio singleto (reação Tipo II), que promovem ações deletérias oxidativas sobre microrganismos [6].

Tentativas para otimizar o efeito da TFDa tem sido realizadas, e novos Fs, mudanças no solvente das formulações [7,8], adição de carreadores de oxigênio [7], uso de nanoplataformas para aplicação dos Fs [9,10], inibidores de *efflux pump* [11,12], anticorpos conjugados aos Fs [13] tem sido investigados.

O oxigênio singleto, devido a sua forte atividade oxidativa [6], tem sido considerado o principal responsável pelo efeito antimicrobiano da TFDa [7]. Para que ocorra sua formação, a presença de oxigênio molecular faz-se necessária. Em biofilmes bucais, especialmente naqueles localizados em ambientes subgingivais, existem áreas com diferentes gradientes de oxigênio e de anaerobiose. Então, a combinação de Fs e luz pode não ser suficiente para a erradicação efetiva do biofilme [14]. Estratégias para melhorar a oxigenação em sistemas sujeitos a terapia fotodinâmica vem sendo estudadas [15]. A utilização de carreadores de oxigênio

poderia otimizar a disponibilidade de oxigênio e facilitar a propagação de luz durante a fase de irradiação, aumentando o potencial de oxidação fotoquímica, facilitando o rompimento da matriz do biofilme e a erradicação das bactérias [16,14]. Perfluorcarbonos (PFCs), como o perfluordeceno, é um derivado do petróleo sintetizado pela substituição de átomos de hidrogênio por átomos de flúor em moléculas de hidrocarbonetos. A solubilidade do oxigênio em PFCs é de 10 a 20 vezes maior do que em água, e as suas características aumentam de forma significativa a taxa de transferência de oxigênio da fase gasosa para microrganismos [17,18]. Estudo verificou que a adição de perfluordeceno resultou em maior eficiência da terapia fotodinâmica com hipericina induzindo maior apoptose das células tumorais de carcinoma [19].

O comportamento pH dependente de alguns Fs tem sido investigado [20,21]. Quanto mais alto o pH da solução, maior a quantidade de radicais hidroxila (OH) presentes no meio. Esses radicais reagem com biomoléculas ou se combinam entre si e formam o peróxido de hidrogênio, o qual possui efeitos citotóxicos [22]. Estudos demonstraram que o pH pode alterar o espectro de fluorescência e absorbância de clorinas, e ainda pode alterar características moleculares e a forma de interação do Fs com células tumorais durante a terapia fotodinâmica [23,24,25]. Existem evidências de que a produção do oxigênio singleto pode ser potencializada conforme o pH [26]. Ftalocianinas fotossensíveis apresentam maior potencial para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singleto em meio ácido [21].

Não existem evidências demonstrando o efeito do pH ou da adição de carreador de oxigênio sobre o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica quando o azul de metileno (AM) é usado como Fs. AM vem sendo utilizado para TFDa no tratamento de periodontites devido a segurança do seu uso em humanos [27].

Os objetivos do presente estudo piloto foram: (1) comparar o efeito antimicrobiano da TFDa entre formulações comumente empregadas, contendo AM em solução aquosa, com uma formulação experimental contendo AM e uma substância carreadora de oxigênio; e (2) avaliar o efeito do pH das formulações de AM sobre efeito antimicrobiano em biofilmes de *P. aeruginosa*. Nossa hipótese considerou que a formulação contendo o carreador de oxigênio resultaria no maior efeito antimicrobiano.

MATERIAIS E MÉTODOS

O Fs utilizado foi o azul de metileno (Sigma Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil). As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (milli Q). Para o preparo das soluções tamponadas foram utilizados: tris (hidroximetil) aminometano (Sigma Aldrich®) e ácido clorídrico (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para pH 7,4; e ácido acético (Vetec®) e acetato de sódio (Proquímios®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para o pH 5,6. Perfluordecileno (Acros Organics®, Nova Jersey, EUA) foi utilizado como carreador de oxigênio, e triton-X100 (Sigma Aldrich®) foi utilizado como surfactante no preparo das emulsões.

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

A fonte de luz utilizada foi um laser de Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP, Thera Lase - DMC, São Carlos, SP, Brazil) com comprimento de onda de 660 nm, diâmetro da ponta da fibra de 0.02827 cm², e modo de emissão contínua.

Formulações

As formulações testadas foram:

- AM 7,4: AM (0,01%) diluído em tampão (Tris-HCl);
- AM/carreador 7,4: AM (0,01%) diluído em uma emulsão de perfluorodecaleno: tampão (Tris-HCl): triton-X100 na proporção de 60:35:5, respectivamente;
- AM 5,6: AM (0,01%) diluído em tampão (acetato de sódio/ácido acético);
- AM/carreador 5,6: AM (0,01%) diluído em uma emulsão de perfluorodecaleno: tampão (acetato de sódio/ácido acético): triton-X100 na proporção de 60:35:5, respectivamente.

Efeito antimicrobiano do AM nas diferentes formulações em biofilme *in vitro*

Biofilmes de cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* PA01, bactéria Gram-negativa, foram reativados. Uma suspensão padronizada contendo 10^7 células/mL de microrganismo foi obtida com espectrofotômetro (Instrutherm, UV-1000A, São Paulo, SP, Brasil). Parâmetro de densidade óptica de 1 (DO600) foi utilizado.

Discos de acrílico com 8 mm de diâmetro e 1 mm de espessura foram colocados em placas de 24 poços (TPP, Suíça). Dois mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI, Himedia Laboratories PVT. Ltda., Mumbai, Índia) acrescido de 5% de sacarose foi pipetado em cada poço. Os espécimes imersos em BHI foram inoculados com 100 µL de suspensão microbiana padronizada (10^7 células/mL) e incubados em agitador orbital (Novatecnica, Modelo NT712, Piracicaba, SP, Brasil) com 75 rpm a 37°C por 5 dias. O caldo foi substituído a cada 24 horas. Decorrido o período de incubação, os espécimes foram lavados com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), com objetivo de remover as células não aderidas.

Inativação Fotodinâmica dos Biofilmes

Após a lavagem com solução salina, os espécimes foram transferidos para novas placas de 24 poços e imersos em 1 mL de Fs (250 μ M) nas diferentes formulações. A solução do Fs foi mantida em contato com o biofilme durante 5 minutos sem aplicação de luz (período de incubação) e após, os biofilmes foram irradiados com laser de baixa potência com comprimento de onda de 660 nm, modo de emissão contínua, potência útil de 30 mW, energia de 20 J e densidade de energia de 40 J/cm², durante 10 minutos.

Após, cada espécime contendo o biofilme foi colocado em tubo falcon contendo 10 mL de solução salina e colocado sob agitação em um vórtex (VELP Scientifica, 12dc) com potência de 15 W durante 30 segundos. Da solução homogeneizada (10⁻¹), diluições decimais foram realizadas. Alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (Himedia Laboratories PVT. Ltda., Mumbai, Índia).

As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, um examinador cego para os grupos experimentais realizou a contagem das colônias formadas nas placas e o cálculo de unidade formadora de colônia (UFC) por mL de suspensão (UFC/mL).

Cinco espécimes por formulação foram utilizados. O experimento foi realizado em triplicata. Como controle, o biofilme formado sobre os espécimes e não exposto a tratamento foi utilizado.

Análise Estatística

Os dados de UFC/ml (Log) foram apresentados em média, desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. Anova dois fatores foi usado para avaliar o efeito do fator pH (7,4 versus 5,6) e do fator solvente (solução aquosa versus carreador).

Anova um fator e post hoc Tukey foram usados para avaliar as diferenças entre os cinco grupos de comparação (controle; AM/carreador 7,4; AM 7,4; AM/carreador 5,6; AM 5,6). Nível de significância de 5% foi utilizado para todas as avaliações. O programa *Statistics 8.0* foi utilizado para todas as análises.

A porcentagem de redução de UFC/ml para *P. aeruginosa* foi calculada considerando os grupos de tratamento (AM 7,4; AM/carreador 7,4; AM 5,6; AM/carreador 5,6) em relação ao grupo controle.

RESULTADOS

Os dados de UFC/ml (Log) nos grupos experimentais são apresentados na Tabela 1.

Os resultados do Anova dois fatores demonstraram que o fator solvente (água versus carreador) não foi estatisticamente significativo ($P=0,18$), enquanto o fator pH (7,4 versus 5,6) apresentou significância estatística ($P=0,01$). A interação dos fatores não foi significativa ($P=0,62$).

Todos os grupos de TFDa apresentaram redução estatisticamente significativa de *P. aeruginosa* em comparação a ausência de tratamento. Nenhuma diferença foi verificada entre grupos com mesmo pH. Quando a água foi utilizada como solvente, nenhuma diferença foi observada entre pH 5,6 e 7,4. Quando o carreador foi usado, a formulação de AM com pH 7,4 apresentou redução estatisticamente maior de *P. aeruginosa* do que a formulação com pH 5,6.

Tabela

Tabela 1. Média \pm desvio padrão (intervalo de confiança de 95%) e UFC/ml (Log) de *Pseudomonas aeruginosa* no grupo controle (ausência de tratamento) e nos demais grupos de terapia fotodinâmica antimicrobiana

	Grupos experimentais	
	pH 7.4	pH 5.6
Controle/ausência de tratamento	6.88 \pm 0.14 (6.71-7.06) a	
AM/carreador	3.54 \pm 0.78 (2.56-4.52) b	4.86 \pm 0.50 (4.22-5.49) c
AM/água	4.12 \pm 0.70 (3.24-5.00) bc	5.13 \pm 0.68 (4.28-5.97) c

Anova one-way, post hoc Tukey.

Letras diferentes: representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Letras iguais: representam igualdade estatística ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a inclusão do carreador de oxigênio na formulação de AM não aumentou o efeito antimicrobiano em relação a formulação comumente empregada contendo AM em solução aquosa, o que refutou nossa hipótese inicial. Nós observamos que o pH teve efeito estatisticamente significativo sobre o efeito fotodinâmico antimicrobiano. Formulações com pH 7,4 apresentaram menores valores médios de UFC/ml do que aquelas com pH 5,6. Ainda, a formulação contendo AM/carreador com pH 7,4 apresentou efeito antimicrobiano estatisticamente maior do que as formulações com pH 5,6.

O pH mais básico (7,4) favoreceu o efeito antimicrobiano. O (s) mecanismo (s) que explicam esse efeito precisam ser elucidados. A literatura prévia aponta que o efeito do pH parece variar de acordo com as características do Fs que está sendo empregado [21,22]. Contudo, há evidências que para alguns Fs o pH básico parece fornecer maior quantidade de radicais hidroxila (OH) ao meio. Esses radicais reagem com biomoléculas ou se combinam entre si e formam o peróxido de hidrogênio, o qual possui efeitos citotóxicos [21,22].

A base teórica para a utilização de um carreador de oxigênio seria a possibilidade de aumentar o aporte de oxigênio no biofilme favorecendo a produção de oxigênio singleto via ativação fotodinâmica e por consequência, aumentar o efeito antimicrobiano [14,29]. Entretanto, nossos experimentos não observaram esse efeito. O fato de usar o carreador pode não necessariamente ter conduzido mais oxigênio ao biofilme. Assim, posteriores experimentos adicionando substâncias portadoras de oxigênio em conjunto com o carreador podem ser realizados.

As TFDa empregadas no presente estudo, independente da formulação ou pH utilizado, foram efetivas, uma vez que em todos os grupos apresentaram redução estatisticamente significativa na viabilidade *P. aeruginosa* em comparação ao grupo controle (sem tratamento). Esses resultados confirmam estudos prévios que demonstraram que a TFDa é efetiva em reduzir várias espécies de microrganismos [30,31].

A concentração de AM empregada no presente estudo foi baseada em estudo prévio que demonstrou que formulações de AM a 0,01% resultaram produção significativamente maior de oxigênio singleto quando comparada a concentrações de 0,001%, 0,0001% e 0,1% [32]. A escolha de biofilmes de *P. aeruginosa* foi norteadada pelos seguintes fatores: (I) por ser uma bactéria Gram-negativa as quais são naturalmente mais resistentes a TFDa quando comparadas as Gram-positivas [33, 34], devido a membrana externa apresentar lipopolissacarídeos (LPS) e canais de porina que atuam como barreira para a penetração do fotossensibilizador; (II) devido ao seu elevado grau de flexibilidade genômica, expressando diversos fenótipos, sendo assim reconhecida pela sua resistência intrínseca a antibióticos [35,36] que pode ser de 10 a 1000 vezes maior do que na cultura planctônica [37]; (III) por evidências prévias demonstrarem a necessidade de maior dose de energia e maior

concentração de Fs para alterar a viabilidade de *P. aeruginosa* quando comparada a outros microrganismos [33].

Nós utilizamos somente o biofilme sem tratamento como grupo controle. A literatura tem apontado que AM sem fotoativação, ou o laser sem AM, tem pouco ou nenhum efeito antimicrobiano [38] justificando a ausência desses grupos de comparação. Entretanto, como limitações desse estudo, apontamos que a exposição do biofilme as soluções tampões e ao carreador de oxigênio poderia ter sido realizada para verificar se estas substâncias apresentam algum efeito antimicrobiano. Outro aspecto é o reduzido número de amostras utilizadas (n=5) o que compromete o poder do estudo para identificar significância estatística nas análises. Contudo, trata-se de um estudo preliminar. Ainda, mais do que significância estatística, poderíamos considerar que uma diferença de aproximadamente 2 log de UFC/mL entre os tratamentos poderia ser considerada importante microbiologicamente na redução da viabilidade de *P. aeruginosa* em biofilmes [39].

A magnitude da redução microbiana verificada na formulação contendo AM/carreador de oxigênio em pH 7,4 foram semelhantes as observadas com antibióticos sobre biofilmes de *P. aeruginosa* [40]. Isso demonstra que a TFDa com estas formulações pode ser uma alternativa viável e sem riscos de reações adversas ou desenvolvimento de resistência microbiana.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a adição do carreador de oxigênio não influenciou o efeito antimicrobiano. Nosso estudo demonstrou que para formulações contendo AM e carreador de oxigênio para TFDa sobre biofilmes de *P. aeruginosa*, o pH 7,4 resultou

em maior efeito antimicrobiano quando comparado ao pH 5,6. Assim, a TFDa com esta formulação parece ser promissora para atuar como coadjuvante no tratamento de infecções localizadas. Nossos resultados preliminares devem ser confirmados em modelos envolvendo biofilmes multi-espécies.

REFERÊNCIAS

1. Kraus C. Low hanging fruit in infectious disease drug development. *Current Opinion in Microbiology*. 2008 Oct;11:434-438.
2. Kourtesi C, Ball AR, Huang YY, Jachak SM, Vera DM, Khondkar P, Gibbons S, Hamblin MR, Tegos GP. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. *Open Microbiol J*. 2013 Mar;22(7):34-52.
3. Yin R, Hamblin MR. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *Curr Med Chem*. 2015;22(18):2159-2185.
4. Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/ Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54:637–642.
5. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem*. 2009 Jul;9(8):974-83.

6. Harris F, Chatfield LK, Phoenix DA. Phenothiazinium Based Photosensitisers – Photodynamic Agents with a Multiplicity of Cellular Targets and Clinical Applications. *Current Drug Targets*. 2005 Aug;6:615-627.
7. George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *Journal of Biomedical Optics*. 2007 May-Jun;12(3):29-34, 2007.
8. Prochnow EP, Martins MR, Campagnolo CB, Vianna RC, Villetti MA, Kantorski KZ. Antimicrobial photodynamic photosensitizers in formulations with ethanol on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2015 Mar;13:291-296.
9. Klepac-Ceraj V, Patel N, Song X, et al. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers Surg Med*. 2011 Sep;43:600-606.
10. Sherestha A, Kishen A. The Effect of Tissue Inhibitors on the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles and Photodynamic Therapy. *J Endod*. 2012 Sep;38:1275-1278.
11. Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52:3202-3209.
12. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochem Photobiol*. 2010 Nov-Dec;86(6):1343-9.

13. Embleton ML, Nair SP, Cookson BD, Wilson M. Antibody-directed photodynamic therapy of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist.* 2004 Summer;10(2):92-7.
14. Saji G, Kishel A. Augmenting the Antibiofilm Efficacy of Advanced Noninvasive Light Activated Disinfection with Emulsified Oxidizer and Oxygen Carrier. *Journal of Endodontics.* 2008 Feb;1119-1123.
15. Huygens A et al. Enhancing the photodynamic effect of hypericin in tumour spheroids by fractionated light delivery in combination with hyperoxygenation. *Int J Oncol.* 2005 Jun;26(6):1691-7.
16. Amaral PF et. al. Improving lipase production using a perfluorcarbon as oxygen carrier. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2006 81;1368-1374.
17. Riess JG, Le Blanc M. Solubility and transport phenomena in perfluorchemicals relevant to blood substitution and other biomedical applications. *Pure and Applied Chemistry.* 1982 54(12):2383-2406.
18. Elibol M, Mavituna F. Effect of perfluordecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1995 Jun;43(2):206-210.

19. Kamuhabwa AR, Huygens A, Roskams T, De Witte PA. Enhancing the photodynamic effect of hypericin in human bladder transitional cell carcinoma spheroids by the use of the oxygen carrier, perfluorodecalin. *Int J Oncol.* 2006 Mar;28(3):775-80.
20. Li WN, Gandra ED, Ellis S, Courtney S, Li E. A pH-responsive, TiO₂-attached porphyrin for singlet oxygen production in aqueous solution. *Appl Mater Interfaces.* 2009 Aug;1(8):1778–1784.
21. Jiang XJ. et al. Phthalocyanine-polyamine conjugates as pH-controlled photosensitizers for photodynamic therapy. *Chemistry – A European Journal.* 2010 Apr;16(16):4777-4783.
22. Wainwright M, Giddens RM. Phenothiazinum photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes and Pigments.* 2003 57:245-257.
23. Cunderlíková B, Gangeskar L, Moan J. Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake. *J Photochem Photobiol B.* 1999 Nov-Dec;53(1-3):81-90.
24. Cunderlíková B, Bjørklund EG, Pettersen EO, Moan J. pH-dependent spectral properties of HpIX, TPPS2a, mTHPP and mTHPC. *Photochem Photobiol.* 2001 Aug;74(2):246-52.
25. Friberg EG, Cunderlíková B, Pettersen EO, Moan J. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett.* 2003 May;195(1):73-80.
26. McDonnell SO, O'Shea DF. Near-infrared sensing properties of dimethylamino-substituted BF₂-azadipyrromethenes. *Org Lett.* 2006 Aug 3;8(16):3493-6.

27. National Toxicology Program. Executive summary of safety and toxicity information for methylene blue trihydrate. U.S. Department of Health and Human Services 1990;7220-79-3.
28. Sherestha A, Kishen A. The Effect of Tissue Inhibitors on the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles and Photodynamic Therapy. *J Endod.* 2012 Sep;38(9):1275-1278.
29. George S, Kishen A. Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. *J Endod.* 2008 Sep;34(9):1119-1123.
30. Peloi LS et al. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci.* 2008 Jun;33(2):231-7.
31. Vilela SF et al. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2012 Jun;57(6):704-10.
32. Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy indices the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2013;39:411-414.
33. Usacheva MN, Teichert MC Biel, MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;29:165-173.
34. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011 Feb;55(1):143-66.

35. Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*. 2000 Aug;3(4):247-255.
36. Sharma G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*. 2014 Jan;42(1):1-7.
37. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005 May;79(2):159-170.
38. Rovaldi CR, Pievsky NA, Sole PM. Photoactive Porphyrin Derivative with Broad-Spectrum Activity against Oral Pathogens In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Dec;44(12):3364.
39. Yu Q et al. In vitro evaluation of tobramycin and aztreonam versus *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived human airway epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Nov;67(11):2673-81.
40. Elkhatib W, Noreddin A. Efficacy of ciprofloxacin-clarithromycin combination against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm using in vitro experimental model. *Microbial Drug Resistance*, 2014 20(6):1-8.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os primeiros estudos sobre TFDa foram realizados no século XX por Oscar Raab e seu professor Herman von Tappeiner. No entanto, nos últimos anos um maior interesse tem se dado à terapia devido ao desenvolvimento da resistência microbiana e o aparecimento de “superbactérias”.

Em Odontologia, a periodontia tem estudado clinicamente o efeito da TFDa como tratamento adjuvante a raspagem e alisamento radicular, principalmente em condições clínicas em que a terapia mecânica pode obter respostas ineficientes, como: Diabetes mellitus, fumo, periodontite agressiva e características anatômicas do sítio.

No entanto, não há evidências clínicas que justifiquem seu uso, mesmo que os resultados de estudos *in vitro* sejam promissores. Ainda não existe na literatura um protocolo bem estabelecido em relação à utilização da TFDa. Assim, o tipo de fotossensibilizador utilizado, a concentração do mesmo, o solvente em que é diluído, o tempo de exposição, os microorganismos em seu arranjo estrutural e o tipo de laser, podem influenciar nos resultados.

Alternativas para otimizar o efeito da TFDa sobre biofilmes podem incluir modificações nos solventes favorecendo a produção de espécies citotóxicas; inclusão de carreadores de oxigênio para fornecer este substrato para as reações fotodinâmicas; nano encapsulamento dos fotossensibilizadores otimizando sua penetração no biofilme; uso de inibidores de “efflux-pump” durante a TFDa, entre outros.

O contexto da TFDa nos parece promissor podendo ser vastamente estudado cientificamente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBANDAR, J. M.; BRUNELLE, J. A.; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. **J Periodontol**, v. 70, n. 1, p. 3-29, 1999.

ALWAEELI, H. A.; AL-KHATEEB, S. N.; AL-SADI, A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 801-807, 2013.

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

ARWEILER, N. B. et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. **Clin Oral Investig**, v. 9, n. 9, p. 2129-2135, 2004.

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

BASSIR, S. H. et al. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**. 2013 v. 40, n.1, p. 65-72, 2013.

BERGSTRÖM, J.; ELIASSON, S.; DOCK J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 1, p. 61-68, 2000.

BIEL M. A. et al. Reduction of Endotracheal Tube Biofilms using Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Lasers Surg Med**, v. 43, n. 7, p. 586-590, 2011.

CAMPOS, G. N. et al. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 317-324, 2013.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiag Photodynam Ther**, v. 1, n.4, p. 79-293, 2004.

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

CUNDERLÍKOVÁ, B. et al. pH-dependent spectral properties of HpIX, TPPS2a, mTHPP and mTHPC. **Photochem Photobiol**, v. 74, n.2, p. 246-52, 2001.

CUNDERLÍKOVÁ, B.; GANGESKAR, L.; MOAN J. Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake. **J Photochem Photobiol B**, v. 53, p. 81-90, 1999.

DERYABIN, D. G. et al. A zeta potential value determines the aggregate's size of penta-substituted fullerene derivatives in aqueous suspension whereas positive

charge is required for toxicity against bacterial cells. **J Nanobiotechnology**, v. 8, p. 13-50, 2015.

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

ELKHATIB, W.; NOREDDIN, A. Efficacy of ciprofloxacin-clarithromycin combination against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm sing in vitro experimental model. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 6, p. 1-8, 2014.

EMBLETON, M. L. et al. Antibody-directed photodynamic therapy of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microb Drug Resist**, v. 10, n.2, p. 92-97, 2004.

FRIBERG E. G. et al. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. **Cancer Lett**, v. 195, n. 1, p. 73-80, 2003.

FUGITANI, S. et al. Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa*. Part I: Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Source. **Rec Adv in Ch Med**, v. 139, p. 909-919, 2011.

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

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

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

GIULIANI, F. et al. In vitro resistance selection studies of RLP068/ Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 2, p. 637-642, 2010.

GRELLMANN, A. P. et al. Systemic antimicrobials adjuvant to periodontal therapy in diabetic subjects: a meta-analysis. **J Clin Periodontol**, v. 43, n. 3, p. 250-260, 2016.

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

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

HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium Based Photosensitisers – Photodynamic Agents with a Multiplicity of Cellular Targets and Clinical Applications. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 5, p. 615-627, 2005.

HUYGENS, A.; et al. Enhancing the photodynamic effect of hypericin in tumour spheroids by fractionated light delivery in combination with hyperoxygenation. **Int J Oncol**, v. 26, n. 6, p. 1691-1697, 2005.

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

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

KAMUHABWA, A. R. et al. Enhancing the photodynamic effect of hypericin in human bladder transitional cell carcinoma spheroids by the use of the oxygen carrier, perfluorodecalin. **Int J Oncol**, v. 28, n. 3, p. 75-80, 2006.

KISHEN, A. et al. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. **Photochem Photobiol** v. 86, n. 6, p. 1343-1349, 2010.

KLEPAC-CERAJ, V. et al. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. **Lasers Surg Med**, v. 43, n. 7, p. 600-606, 2011.

KNIGHT, E. T. et al. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 71, n. 1, p. 22-51, 2006.

KOMINE, C.; TSUJIMOTO, Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 39, p. 411-414, 2013.

KOURTESI, C. et al. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. **Open Microbiol J**, v. 7, p. 34-52, 2013.

KRAUS, C. Low hanging fruit in infectious disease drug development. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 434-438, 2008.

LI, W. et al. A pH-responsive, TiO₂-attached porphyrin for singlet oxygen production in aqueous solution. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.1, n.8, p. 1778-1784, 2009.

LU, Z.; DAI, T.; HUANG, L. et al. Photodynamic therapy with a cationic functionalized fullerene rescues mice from fatal wound infections. **Nanomedicine (Lond)**, v. 5, p.1525-1533, 2010.

MACEDO, G. O. et al. Additional effects of aPDT on nonsurgical periodontal treatment with doxycycline in type II diabetes: a randomized, controlled clinical trial, **Lasers Med Sci**. v. 29, p. 881-886, 2014.

MAISH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, n. 8, p. 974-983, 2009.

MAISH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med Sci**, v. 22, p. 83-91, 2007.

MCDONNELL, S, O. et al. Near-infrared sensing properties of dimethylamino-substituted BF₂-azadipyrromethenes. **Org Lett**, v.8, n. 16, p. 3493-3296, 2006.

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

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Executive summary of safety and toxicity information for methylene blue trihydrate. U.S. **Department of Health and Human Services**, p. 7220-7279, 1990

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

PELOI, L.S. et al. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J Biosci**, v. 33, n. 2, p. 231-7, 2008.

POURABBAS, R. et al. Effects of photodynamic therapy on clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. **J Periodontol**, v. 85, n. 9, p.1222-1229, 2014.

PROCHNOW, E. P. et al. Antimicrobial photodynamic effect of phenothiazinic photosensitizers in formulations with ethanol on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 291-296, 2016.

RAGHAVENDRA, M.; KOREGOL, A.; BHOLA, S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. **Australian Dental Journal**, v. 54, p. 102-109, 2009.

RAMOS, U. D. et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. **J Clin Periodontol**, v. 43, n. 2, p. 147-155, 2016.

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

ROVALDI, C.R. et al. Photoactive Porphyrin Derivative with Broad-Spectrum Activity against Oral Pathogens In Vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 12, p. 3364, 2000.

SAJI, G.; KISHEL, A. Augmenting the Antibiofilm Efficacy of Advanced Noninvasive Light Activated Disinfection with Emulsified Oxidizer and Oxygen Carrier. **Journal of Endodontics**, v. 34, p. 1119-1123, 2008.

SALVI G. E. et al. Risk factors associated with the longevity of multi-rooted teeth. Long-term outcomes after active and supportive periodontal therapy. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 7, p. 701-707, 2014.

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

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

SGOLASTRA, F. et al. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**, v. 83, n. 10, p. 1257-1269, 2012.

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

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

SHERESTHA, A.; KISHEN, A. The Effect of Tissue Inhibitors on the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles and Photodynamic Therapy. **J Endod**, v. 38, p. 1275-1278, 2012.

SOUKOS, N. S.; GOODSON J. M.; Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontol 2000**, v. 55, p. 143-66, 2011.

TEGOS, G. P. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 3202-3209, 2008.

THEODORO, L.H. et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 4, p. 687-693, 2012.

TOMASI, C.; LEYLAND, A. H.; WENNSTRÖM, J. L. Factors influencing the outcome of non-surgical periodontal treatment: a multilevel approach. **J Clin Periodontol**, v. 34, n. 8, p. 682-690, 2007.

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

VILELA, S. F. et al. Photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 6, p. 704-10, 2012.

WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, p. 381-394, 2000.

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

YIN, R.; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. **Curr Med Chem**, v.22, n. 18, p. 2159-2185, 2015.

YU, Q. et al. In vitro evaluation of tobramycin and aztreonam versus *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived human airway epithelial cells. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2673-81, 2012.

7 ANEXO – Normas da revista *Brazilian Dental Science*, utilizadas para a preparação do artigo.

1 - General Information

Brazilian Dental Science (BDS) publishes original scientific articles, invited reviews, short communications and case reports, which provide an international readership with up-to-date results of basic and clinical studies in the field of oral and maxillofacial science and aims to clarify the relevance of these results for a modern practice.

To submit a manuscript for BDS, it is necessary to register in the website, providing a login and password. **Important:** Before concluding the registration form, please certify that the option **author** of the "Register as" item is checked. Once registered as author, enter 'User Home' (third link at the top menu), then enter 'author' and 'start a new submission.' The manuscripts should be written in concise and clear English for a proper comprehension. Paper with a maximum of six authors will be considered for reviewing. Research in humans must provide the protocol number of the Institutional Review Board in the "Material and Methods" session of the manuscript.

Editors and reviewers spend many hours reading manuscripts, and therefore they appreciate receiving material that has been carefully prepared in accordance with these Instructions to Authors. In addition, manuscripts which are not written in fluent English will be rejected automatically without refereeing.

Laboratory or Clinical Research Manuscripts (in full and "Short Communication") must include:

- Title (English and Portuguese)
- Abstract (English and Portuguese)
- Introduction, Material & Methods, Results, Discussion and Conclusion
- References

Case Report / Clinical Technique Manuscripts must include:

- Title (English and Portuguese)
- Abstract (English and Portuguese)
- Brief Literature Review
- Description of technique/case
- Discussion
- References

Discussion should include the presentation of potential problems and a summary of advantages and disadvantages of the clinical technique/case report.

Literature Review Manuscripts must include: Title (English and Portuguese)

- Abstract (English and Portuguese)
- Critical Review
- References

Critical Reviews: These manuscripts should summarize information that is well known and emphasize recent developments over the last five years with a prominent focus on critical issues and concepts that add a sense of excitement to the topic being discussed. Manuscripts are to be submitted by invitation only. Authors interested in submitting to this section must contact the Editor-in-chief of Brazilian Dental Science, Dr. Sergio Gonçalves, at sergio@fosjc.unesp.br for submission approval and instructions.

2 - Manuscript preparation

To facilitate the editing of your manuscript, and lessen the time to publication, please adhere to the following simple general guidelines and advices:

1. Use double spacing throughout, with margins of 2 cm on each side, and Arial justified paragraph (size 12).
2. The article should not contain any author identification.
3. Be especially careful to use full stop as decimal point, not comma. As spell checker, use American English.
4. Number the pages consecutively beginning with the Introduction. Do not number lines.
5. Be consistent: use the same form of units, etc., and key these elements in exactly the same way throughout the manuscript. Put a space between the digits and the unit, e.g. 5.2 mm.
6. When emphasizing words (seldom necessary), use the italics feature of your text processor software rather than the underline feature
7. Do not use the uppercase I for 1 (one) or the uppercase O for 0 (zero), use the proper numerals instead.
8. Use the space bar only as a word separator, not as a tabulator.
9. Format tables using the table functions of your text processor.

Title Page

A title page should be submitted as supplemental material containing the article title, name of authors and affiliations (degree, department, university, city, and country), and the corresponding author's address.

Abstract

Present the abstract limited to 250 words on a separate page. The abstract should briefly state the objective of the investigation, basic procedures, main findings, and principal conclusions. Use only standard abbreviations, and include no references. For Research Manuscripts, structure the abstract in one paragraph using the headings: Objective, Material and methods, Results, and Conclusions.

Keywords

Give not more than five keywords in alphabetical order after the abstract. Whenever possible, use terms from the Medical Subject Headings list of Index Medicus.

Abstract and keywords should be included in the main document file.

Introduction

Provide a context or background for the study (i.e. the nature of the problem and its significance). Give only strictly pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. In the last paragraph of the section, state the aim of the study concisely, and, if applicable, give the research hypothesis.

Material and Methods

In this section, describe all methods, materials and subjects so that researchers can readily repeat the study. Use appropriate subheadings for the different sections to obtain clarity. Define the material and equipment used in as detailed manner as necessary by, for example, name, product number and batch, and identify the manufacturer by product, city, and country in parentheses. For common methods, a brief description and a reference may be enough; however, if you deviate from the common method, give a full description. Quantitative estimates of the validity and reliability of the methods are desirable. Report length, height, weight, and volume in metric units (meters, kilograms, or liters), or their decimal multiples. Give temperatures in degrees Celsius and use of the International System of Units (SI) is recommended. Correct unit abbreviations should be used (e.g. "yr", "wk", "d", "h", "min", "s" and "µm"). Scientific names of bacteria, binomials in italics, must be given in full when first mentioned. Subsequent mention may abbreviate genus, taking care that this abbreviation is unambiguous (Staph. or Strep. instead of S.).

Results

Present your results in logical sequence giving the main or most important findings first, usually in past tense, without subjective comments and reference to previous literature. For clarity, the results section may have subheadings. The Result section is not the place for interpretation of the data, and must not include any references to other articles.

Do not repeat in the text, data easily found in the tables or illustrations (double documentation is not acceptable). Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess its support. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables.

Tables

Present each table in the body of the text. Do not submit tables as graphs but use the table facility of most text processors. Number the tables consecutively in Roman numerals and give each a short descriptive heading. Give each column a short or abbreviated head. Place explanatory matter in footnotes to the table, not in the heading.

If data from another published or unpublished source are used, obtain permission and acknowledge fully. As far as possible, tables have to be self-explanatory and understandable without reference to the text of the article.

Figures

Upload figures (illustrations) as supplemental material (step 4 of the submission process). The figures must be in electronic form in JPG or TIFF file format only. Optimize the size of the file for printing with 300 DPI and dimension of 10 X 15 cm.

Make sure that letters, numbers, and symbols added to illustrations are clear, in proportion to each other, and large enough to be legible when reduced for publication.

Give each figure a legend containing sufficient information to make it intelligible without reference to the text, and type all the legends together, double-spaced, on separate page(s) at the end of the main manuscript file. Consider all illustrations as figures and number them consecutively in Arabic numerals. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce it. If images of persons are used, obtain written permission prior to submission.

Discussion

The Discussion section should present the interpretation of the findings. This section is the only proper section for subjective comments. Authors are strongly urged to avoid undue repetition of what has already been reported in the results section, or introduced in the introduction.

Conclusion

This topic there ought to be a correspondence between the aims and hypotheses in the end of the introduction and conclusions.

References

Articles published in peer-reviewed journals are preferably accepted as references. Manuscripts being in the writing process, master dissertations or doctorate thesis, and abstracts presented at conferences are not acceptable as references. Book references should be kept at the indispensable minimum as they show the opinions of the respective authors and/or editors. References to the most recent books with international access will only be accepted.

References must be numbered (numbers between squared brackets - eg: [12]) consecutively as they appear in the text and must follow the Vancouver Reference System (details may be found at <http://www.icmje.org/index.html#reference>).

Examples as follows:

1. Costa TR, Ferreira SQ, Klein-Junior CA, Loguercio AD, Reis A. Durability of surface treatments and intermediate agents used for repair of a polished composite. *Oper Dent.* 2011 Mar-Apr;35(2):231-7.

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

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. The manuscript is original and has not been published previously, nor is under consideration by another journal.
2. The submission file is in Microsoft Word (.doc or .docx) format.
3. The text is double-spaced; uses 12-point Arial font; employs italics, rather than underlining; tables are placed in the text body at appropriate points, rather than at the end; and figures and illustrations are not embedded in the text, being provided in separated JPG or TIFF format files.
4. The text adheres to the stylistic and bibliographic requirements outlined in the Submission Guidelines, which is found in About the Journal.
5. If submitting to a peer-reviewed section of the journal, the instructions in Ensuring a Blind Review have been followed.

Privacy Statement

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.