

Gabriel de Oliveira Figueiredo

**Efeito da terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto
de alumínio ftalocianina sobre a proliferação de *Candida*
spp. *in vitro***

Brasília
2020

Gabriel de Oliveira Figueiredo

**Efeito da terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto
de alumínio ftalocianina sobre a proliferação de *Candida*
spp. *in vitro***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Ruffeil Moreira
Mesquita

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças
Fonseca

Brasília
2020

Dedico esse trabalho ao meu querido pai, Ocimar e à minha amada e eterna mãe, Paula, meus irmãos, David e Junior e todas as pessoas fundamentais que me incentivaram para que esse momento de sonho finalmente chegasse.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tantos momentos iluminados.

À minha mãe, que mesmo não estando presente no nosso plano físico, influenciou muito no meu caráter, na minha sede em buscar meus sonhos e, principalmente, a nunca desistir.

Ao meu pai por ser nossa base nos momentos mais difíceis e por ter tido muita fé em mim.

À Universidade de Brasília por ter me mostrado um mundo incrível de oportunidades e de pessoas que certamente me marcaram e moldaram minha personalidade eternamente.

Aos meus colegas da turma 71, em especial, às pessoas que foram minhas companheiras na clínica: Letícia, Rafaella Côrtes, Jieni, Beatriz, Juliana Auth e Jordana.

Ao excelentíssimo corpo docente da Odontologia da UnB em que tive o privilégio de aprender e me espelhar em profissionais tão incríveis.

À Professora Doutora Carla que foi a minha maior incentivadora no campo da pesquisa e ao Professor Doutor Marcio por sua paciência, entusiasmo e ensinamentos laboratoriais e da vida.

Às pessoas no laboratório que me nortearam e deram todo suporte para que eu desenvolvesse esse trabalho. Muito obrigado Athayde, Kunal e, em especial, Camila Gomes por ter sido tão prestativa, caridosa e paciente comigo, tenho certeza que ganhei uma amiga importantíssima que levo com muito orgulho no meu peito.

Aos meus amigos, em especial, Douglas, Juliana Castro, Emilly, Túlio, Guilherme, Marcos, Gabriel José, Bárbarah e Daniel por sempre me apoiarem nos momentos mais complicados.

EPIGRAFE

“As oportunidades multiplicam-se à medida que são agarradas.”

Sun Tzu

RESUMO

FIGUEIREDO, Gabriel. **Efeito da terapia fotodinâmica com cloreto de alumínio ftalocianina em nanoemulsão sobre a proliferação de *Candida* spp. *in vitro***. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A candidose é uma lesão de origem fúngica, que tem como principais alvos hospedeiros imunocomprometidos em razão de alguma síndrome, transplante, tratamento quimioterápico ou uso de próteses removíveis dentárias. O agente etiológico mais comum nesses casos é *Candida albicans*, embora outras espécies do mesmo gênero, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* possam contribuir para a manifestação de sintomas. O tratamento mais comum é o uso de antifúngicos que podem causar nefro- ou hepatotoxicidade, além de seleção de isolados resistentes aos fármacos. Portanto, o uso da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por fotossensibilizante em nanoemulsão se mostra uma boa alternativa para a inativação e inibição do crescimento de fungos. Esse estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a ação da TFD mediada pela Nanoemulsão contendo Cloreto de Alumínio Ftalocianina (NE-AIFtCl) em 4 espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A TFD mediada por NE-AIFtCl mostrou-se eficiente na redução do crescimento *in vitro* de leveduras de *C. albicans*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis*, mesmo em baixas concentrações (2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM e 300 nM). Portanto, apresentamos o potencial da TFD mediada por NE-AIFtCl como um possível tratamento alternativo para a inibição de crescimento de agentes causadores de candidose.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Gabriel. **Effect of photodynamic therapy mediated by an aluminum chloride phthalocyanine nanoemulsion on the growth of *Candida* species *in vitro***. 2020. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasilia.

Abstract

Candidiasis is a fungal lesion whose main target hosts are individuals immunocompromised due to some syndrome, transplantation, chemotherapy treatment or the use of removable dental prostheses. The most common etiological agent in these cases is *Candida albicans*, although other species of the same genus, such as *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* may contribute to the manifestation of symptoms. The most common treatment is the use of antifungal drugs that can cause nephro- or hepatotoxicity and promote the selection of drug-resistant isolates. Therefore, the use of photodynamic therapy (PDT) mediated by photosensitizers in nanoemulsions is a good alternative for inactivating and inhibiting the growth of fungi. This study aimed to evaluate, *in vitro*, the action of PDT mediated by a nanoemulsion containing Aluminum Chloride Phthalocyanine (NE-AIFtCl) in four *Candida* species: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. PDT mediated by the NE-AIFtCl proved to be efficient in reducing the *in vitro* growth of *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* yeasts, even under low concentrations (2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM e 300 nM). Therefore, we present the potential of PDT mediated by NE-AIFtCl as a possible alternative treatment for inhibiting the growth of the agents that cause candidiasis.

SUMÁRIO

Artigo Científico	10
Folha de Título	11
Resumo	12
Abstract	14
Introdução	15
Candidose Oral	16
Terapia Fotodinâmica	20
Nanoemulsão de Cloreto de Alumínio Ftalocianina	22
Materiais e Métodos	24
Resultados e Discussão	26
Considerações Finais	36
Referências	36
Anexos	42
Normas da Revista	42

ARTIGO CIENTÍFICO

Esse trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

FIGUEIREDO, G.O., MESQUITA, C.R.M., FONSECA, M.J.P. Efeito da terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto de alumínio ftalocianina sobre a proliferação de *Candida* spp. *in vitro*. Apresentado sob as normas de publicação da revista Brazilian Oral Research.

FOLHA DE TÍTULO

Efeito da terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto de alumínio ftalocianina sobre a proliferação de *Candida* spp. *in vitro*.

Effect of photodynamic therapy mediated by a nanoemulsion of aluminum chloride phthalocyanine on the growth of *Candida* species *in vitro*.

Gabriel de Oliveira Figueiredo¹

Carla Ruffeil Moreira Mesquita²

Marcio José Poças-Fonseca³

¹ Aluno de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

² Professora do Departamento de Odontologia da Universidade de Brasília.

³ Professor do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília.

Correspondência: Prof. Dr. Carla Ruffeil Moreira Mesquita
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de
Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 -
Asa Norte - Brasília - DF

E-mail: carlarm@globocom.com / Telefone: (61) 981343413

RESUMO

Efeito da terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto de alumínio ftalocianina sobre a proliferação de *Candida* spp. *in vitro*.

Resumo

A candidose é uma lesão de origem fúngica, que tem como principais alvos hospedeiros imunocomprometidos em razão de alguma síndrome, transplante, tratamento quimioterápico ou uso de próteses removíveis dentárias. O agente etiológico mais comum nesses casos é *Candida albicans*, embora outras espécies do mesmo gênero, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* possam contribuir para a manifestação de sintomas. O tratamento mais comum é o uso de antifúngicos que podem causar nefro- ou hepatotoxicidade, além de seleção de isolados resistentes aos fármacos. Portanto, o uso da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por fotossensibilizante em nanoemulsão se mostra uma boa alternativa para a inativação e inibição do crescimento de fungos. Esse estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a ação da TFD mediada pela Nanoemulsão contendo Cloreto de Alumínio Ftalocianina (NE-AIFtCl) em 4 espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A TFD mediada por NE-AIFtCl mostrou-se eficiente na redução do crescimento *in vitro* de leveduras de *C. albicans*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis*, mesmo em baixas concentrações (2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM e 300 nM). Portanto, apresentamos o potencial da TFD mediada por NE-AIFtCl como um possível tratamento alternativo para a inibição de crescimento de agentes causadores de candidose.

Palavras – Chave

Terapia fotodinâmica, *Candida* spp., Cloreto de alumínio ftalocianina, nanoemulsão.

Relevância Clínica

A terapia fotodinâmica representa uma alternativa promissora para o tratamento de lesões fúngicas, pois há a diminuição ou anulação do uso de fármacos. Dessa forma, reduz-se a nefro- e hepatotoxicidade e a seleção de microorganismos resistentes, principalmente em pacientes debilitados e que fazem uso contínuo de outros medicamentos.

ABSTRACT

EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY MEDIATED BY AN ALUMINUM CHLORIDE PHTHALOCYANINE NANOEMULSION ON THE GROWTH OF *CANDIDA* SPECIES *IN VITRO*

Abstract

Abstract

Candidiasis is a fungal lesion whose main target hosts are individuals immunocompromised due to some syndrome, transplantation, chemotherapy treatment or the use of removable dental prostheses. The most common etiological agent in these cases is *Candida albicans*, although other species of the same genus, such as *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* may contribute to the manifestation of symptoms. The most common treatment is the use of antifungal drugs that can cause nephro- or hepatotoxicity and promote the selection of drug-resistant isolates. Therefore, the use of photodynamic therapy (PDT) mediated by photosensitizers in nanoemulsions is a good alternative for inactivating and inhibiting the growth of fungi. This study aimed to evaluate, *in vitro*, the action of PDT mediated by a nanoemulsion containing Aluminum Chloride Phthalocyanine (NE-AIFtCl) in four *Candida* species: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. PDT mediated by the NE-AIFtCl proved to be efficient in reducing the *in vitro* growth of *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* yeasts, even under low concentrations (2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM e 300 nM). Therefore, we present the potential of PDT mediated by NE-AIFtCl as a possible alternative treatment for inhibiting the growth of the agents that cause candidiasis.

Key-words: Photodynamic therapy, *Candida* spp., aluminum chloride phthalocyanine, nanoemulsion.

INTRODUÇÃO

Candida albicans é uma levedura comumente encontrada na microbiota dos tratos digestório e urogenital do hospedeiro humano. No entanto, na cavidade bucal de indivíduos imunocomprometidos, a candidose bucal é um problema frequente que se instala como uma infecção crônica, sem evoluir para grave envolvimento sistêmico.¹⁻⁶ Fatores - como comprometimento imunológico de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), indivíduos em tratamento oncológico, pacientes em unidades de terapia intensiva, idosos que fazem uso de próteses dentárias, tabagistas, crianças, grávidas e outras condições que levem à imunossupressão - favorecem a instalação da doença.⁷

A espécie *C. albicans* é a maior responsável por lesões de candidose oral e vaginal em seres humanos, seguidas por *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. O tratamento convencional para a candidose é a administração de antifúngicos de uso externo ou interno, sendo os principais a nistatina, o fluconazol e o cetoconazol. Entretanto, seu uso contínuo tem levado à seleção de isolados resistentes, reduzindo o efeito terapêutico, e promovendo intoxicação ao hospedeiro quando administrados indiscriminadamente.⁸

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido estudada como alternativa para o tratamento de lesões superficiais causadas por fungos, uma vez que não é necessária a administração de fármacos de uso interno. Por definição, a TFD é caracterizada pela associação de um fotossensibilizante que será excitado por um comprimento de onda de luz adequado, na presença de oxigênio, sendo capaz de gerar Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) que causam resposta oxidativa, danos moleculares e morte celular.¹⁻⁹

O cloreto de alumínio ftalocianina (AlFtCl) é um fotossensibilizante porfirínico que apresenta elevado rendimento na produção de oxigênio singletos e tripletos. Entretanto, a hidrofobicidade de AlFtCl requer o uso de novas tecnologias de

entrega para promover a sua dispersão em ambientes fisiológicos. Nesse contexto, a nanotecnologia tem servido como importante aliada no uso de AlFtCl, associada a lipossomas, nanoemulsões, dentre outros.⁹

Portanto, levando em consideração a necessidade de novas abordagens para o tratamento de infecções orais por *Candida* spp., junto com o potencial da TFD mediada por fotossensibilizantes nanoestruturadas, esse estudo visa avaliar, *in vitro*, a ação da TFD mediada pela nanoemulsão contendo cloreto de alumínio ftalocianina (NE- AlFtCl) em 4 espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

CANDIDOSE ORAL

Candidose oral é um termo usado para uma série de doenças que se originam da infecção por *Candida* spp., causando lesões na mucosa do sistema estomatognático principalmente de indivíduos imunossuprimidos. As espécies e linhagens de *Candida* que causam a candidose bucal podem ser identificadas como componentes da microbiota residente bucal em parte da população, não sendo possível eliminar totalmente as espécies de *Candida* da boca.^{14,16,18} *Candida* spp. são microorganismos oportunistas, que em situações de disbiose da microbiota comensal oral, levam à doença.¹⁴ *C. albicans* é a espécie mais frequente encontrada em humanos e a maior causadora de lesões fúngicas bucais em indivíduos imunossuprimidos, causando, dentre as mais diversas consequências, dificuldade na alimentação interferindo na dieta e possivelmente acarretando em outros agravos. Contudo, leveduras de *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* podem ser encontradas conjuntamente em algumas lesões.^{14,15,17}

Existem fatores que levam a um risco maior de desenvolvimento de sinais e sintomas da doença. McIntyre, G.T. (2001) listou algumas condições: fatores fisiológicos, trauma,

fatores dietéticos, fatores endócrinos, malignidade, defeitos imunológicos, xerostomia e desequilíbrio da microbiota oral.^{14,15,16,19} Os fatores fisiológicos englobam idade (avançada ou tênue) e gestação e predispõem à candidose bucal, visto que estão associados a condições de resposta imune imatura ou deficiente.

O trauma (de próteses acrílicas e aparelhos ortodônticos) pode causar uma injúria da membrana mucosa prejudicando sua integridade e resistência. O contato entre o acrílico e a mucosa evita que componentes antimicrobianos salivares, como a lisozima, a lactoferrina e glicoproteínas, acessem os patógenos.^{14,17}

Alguns fatores da dieta, como elevada ingestão de açúcares, fornecem às leveduras metabólitos ideais para a proliferação. O consumo deficiente de nutrientes (como ferro, vitamina B12 e ácido fólico) pode ocasionar uma baixa resistência dos tecidos da mucosa oral à candidose.^{14,16}

Alterações endócrinas, falhas no sistema imune e neoplasias podem diminuir a defesa do organismo favorecendo infecções fúngicas oportunistas. Tratamentos quimioterápicos e radioterápicos aumentam o risco de desenvolvimento de lesões fúngicas na boca. Deve-se observar que o aparecimento de candidose bucal é um dos primeiros sintomas da infecção pelo vírus HIV.^{14,15,19}

A xerostomia é outro fator que favorece o aparecimento de lesões fúngicas na cavidade bucal, pois a diminuição do fluxo salivar reduz os componentes antimicrobianos presentes na saliva.^{14,15} A microbiota oral em disbiose, ocasionada principalmente por uso excessivo de antibióticos de amplo espectro, permite a colonização por fungos e o desenvolvimento da doença. Pessoas internadas em unidades de terapia intensiva

têm maior chance de desenvolver lesões em razão de alterações da microbiota bucal.^{14,15,16,17}

A candidose é classificada em primária e secundária. A primeira está relacionada a fatores locais, como o uso de próteses dentárias e, a segunda, às condições sistêmicas do paciente, como imunodeficiências. As lesões são classificadas pelas características e local afetado da mucosa bucal. Existem candidoses pseudomembranosas (Figura 1), hiperplásicas (Figura 2) e eritematosas (Figura 3). Há ainda lesões como queilite angular

e a glossite romboide mediana, que têm associação com as espécies de *Candida*.¹⁴⁻¹⁶

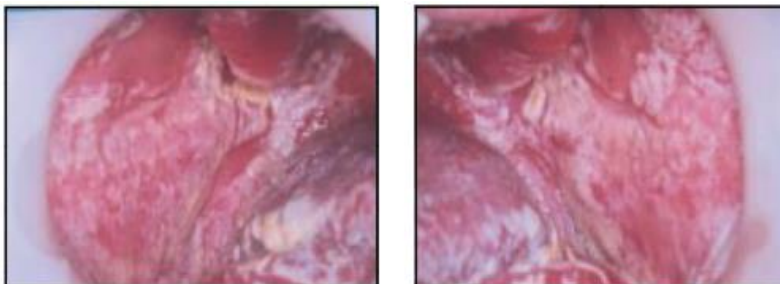


Figura 1- Candidose intraoral pseudomembranosa generalizada. Imagem de McIntyre, G.T. (2001).



Figura 2- Candidose hiperplásica em paciente edêntulo e tabagista. Imagem de McIntyre, G.T. (2001).



Figura 3- Candidose eritematosa em paciente edêntulo. Imagem de Ribeiro, R.L. (2019).

TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A TFD consiste em uma abordagem terapêutica promissora que requer três elementos: um agente fotossensibilizante, o comprimento de onda de luz apropriado para excitar eletronicamente o fotossensibilizante e oxigênio. Os processos de TFD resultam na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir de reações do tipo I ou II. No tipo I, há a transferência de elétrons do fotossensibilizante ativado para diversas classes de biomoléculas, resultando em proliferação de radicais livres que reagem com componentes celulares. No tipo II, há a transferência de energia do estado estimulado ou excitado do fotossensibilizante diretamente para oxigênio no estado tripleto fundamental, este então passa para o estado de oxigênio singleto excitado.²⁰⁻²³

Em ambos os casos, a transferência eletrônica culmina em elevado nível de EROs, que leva grande estresse oxidativo, e alterações em moléculas orgânicas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, resultando, na maioria das vezes, em citotoxicidade.²¹

A TFD é utilizada para o tratamento de infecções fúngicas superficiais e é bem consolidada na literatura, principalmente quando associada ao azul de metileno. É uma alternativa terapêutica promissora, pois exclui ou diminui a administração de fármacos a pacientes já debilitados, além de evitar a seleção de linhagens resistentes aos antifúngicos. A TFD teria uma possibilidade menor de gerar resistência antimicrobiana por conta do alto bombardeamento aleatório nas células alvo, ao contrário da administração antifúngica que com sua constante utilização acarretaria numa supressão da via dos fármacos.²³

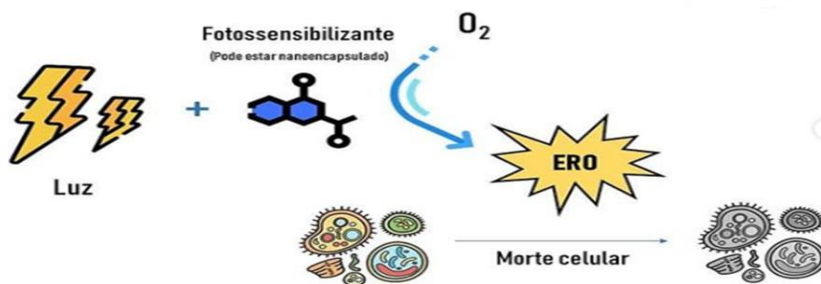


Figura 4. Representação esquemática da terapia fotodinâmica associada a um fotossensibilizante excitado por luz de comprimento de onda específico. A formação de espécies reativas de oxigênio ocorre a partir do O_2 tecidual resultando em morte ou danos na célula. Imagem de Gomes (2018).³⁰

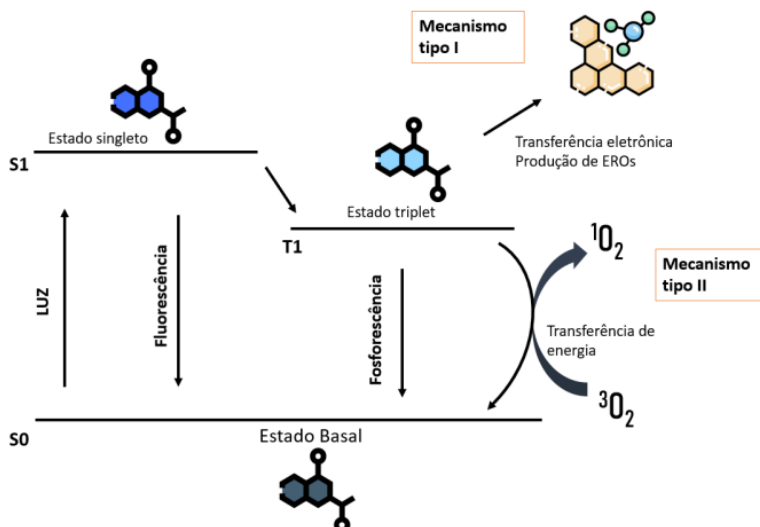


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação do tratamento fotodinâmico (TFD). O fotossensibilizante sai de seu estado basal para um estado excitado após exposição a luz em comprimento adequado podendo gerar espécies reativas de oxigênio pelos

mecanismos do tipo I t tipo II. EROs: espécies reativas de oxigênio. Iamgem de Gomes (2020).³⁰

NANOEMULSÃO DE CLORETO DE ALUMÍNIO FTALOCIANINA

As características ideais de um fotossensibilizante são: não ser tóxico na ausência de luz, incorporação eficiente pelos tecidos alvos, fototoxicidade, excitação em comprimento de onda de luz que seja penetrante em tecidos biológicos (650-850 nm) e produção de uma carga elevada de espécies reativas de oxigênio.²⁴

O AIFtCl tem se destacado na pesquisa com TFD por suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas. Ele é fotoativado em um comprimento de onda que varia de 650 a 850 nm, que corresponde à luz na região do vermelho, e apresenta alta capacidade de penetração em tecidos biológicos (cerca de 3 mm).²⁴

Entretanto, o AIFtCl tem uma substância hidrofóbica que o torna incompatível para uso em tecidos biológicos, uma vez que este sofre agregação em meio aquoso, o que reduz seu rendimento fotodinâmico. Dessa forma, a formulação desse fototerápico em nanossistemas faz-se necessária para otimizar o efeito em meios orgânicos, pois evita que os componentes hidrofóbicos do AIFtCl se agreguem.²²⁻²⁴

Entende-se por nanoemulsão uma dispersão em escala nanométrica, de dois líquidos imiscíveis, de forma homogênea. Isso se dá por conta de agentes surfactantes que atuam na interface dos líquidos, permitindo sua estabilidade pela redução da tensão superficial.²⁷⁻²⁹ A nanoemulsão apresenta vantagens em sistemas nanoparticulados, pois é de fácil obtenção, é produzida

com componentes de baixo custo e é estável em meios biológicos, otimizando o fotossensibilizante.²⁴

As nanoemulsões têm a capacidade de proteger os componentes lipofílicos, permitindo que as moléculas hidrofóbicas se disperssem em meios hidrofílicos.²⁴

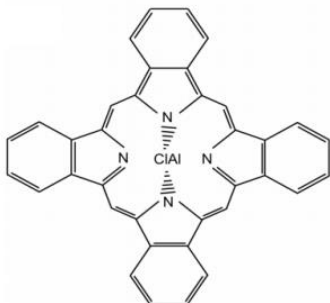


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura química do cloreto de alumínio ftalocianina (AlPcCl).



Figura 7 – Fotografia de Tubo de centrífuga contendo nanoemulsão de cloreto de alumínio ftalocianina fornecida e desenvolvida no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília - UnB.

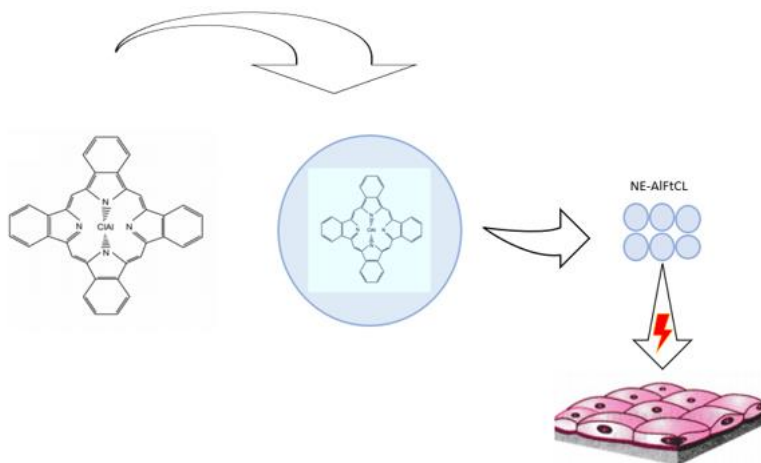


Figura 8. Representação esquemática da AIFtCl encapsulada por nanoemulsão melhorando a sua absorção nos tecidos orgânicos após TFD.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Regulação Gênica e Mutagênese, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. As leveduras das diferentes espécies de *Candida* foram estriadas a colônias isoladas em meio ágar-sabouraud (40 g/L de dextrose, 10 g/L de peptona, 20 g/L de ágar, pH de 5,6), e incubadas a 28 °C por 72 h. Em seguida, as culturas foram estocadas a 4 °C até a realização dos experimentos. Estoques de leveduras em glicerol 35%, armazenadas a -8°C também foram realizados para manutenção de linhagens.

A nanoemulsão foi desenvolvida e fornecida pelo Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília – UnB pelo Professor Doutor Luis Alexandre Muehlmann. A nanoemulsão foi fabricada por emulsificação espontânea. Acrescentou-se em um recipiente o surfactante, o óleo e o fotossensibilizante, em seguida, adicionou-se água destilada. Na

sequência, a solução foi colocada sob agitação magnética suave a 60 °C por cerca de uma hora. Para a nanoemulsão com cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) foi utilizado Kolliphor EPL® como tensoativo e o óleo de rícino como solubilizante, na proporção de 3:1, respectivamente. A concentração de AlFtCl na nanoformulação final (NE-AlFtCl) foi de 40 µM. Também foi obtida, nas mesmas condições, nanoformulação sem AlFtCl (NE-B). As diferentes concentrações utilizadas das soluções de NE-AlFtCl foram preparadas em PBS imediatamente antes do uso.^{25,27,28}

Foi realizado pré-inóculo de uma colônia isolada de levedura em 4 mL de meio líquido Sabouraud (40 g/L de dextrose, 10 g/L de peptona, pH de 5,6), incubado a 28 °C por 24 h em plataforma giratória inclinada. A cultura obtida foi centrifugada por 5 min a 3000 g e o sobrenadante descartado. Adicionou-se o mesmo volume de tampão fosfato salino (PBS), seguido de homogeneização e contagem em hemocitômetro para ajuste da concentração celular para 2×10^6 células/mL. As células foram expostas a diferentes concentrações de NE-AlFtCl (2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM ou 300 nM por 30 min a 28 °C. Como controles, foram empregadas leveduras incubadas apenas com PBS, irradiadas ou não, e leveduras expostas à nanoemulsão sem irradiação.

Após exposição à nanoemulsão, as células foram centrifugadas por 5 min a 12000 g, o sobrenadante foi descartado seguindo-se adição de igual volume de PBS para lavagem e remoção de resíduos da nanoemulsão não internalizada pelas leveduras. As células em meio de cultura RPMI foram então distribuídas em duas microplacas de 96 poços, em uma concentração final de 10^6 células/mL. Cada condição experimental foi distribuída triplicata técnica. Uma das placas foi irradiada com um diodo emissor de luz (LED) no comprimento de onda de 660nm por 30 min, com potência de 60 mW/cm² e fluência de 108,22 J/cm². O aparelho utilizado foi um protótipo desenvolvido pelo Professor Paulo Eduardo Souza, no Laboratório de Softwares e

Instrumentalização do Departamento de Física Aplicada da UnB (Figura 7).

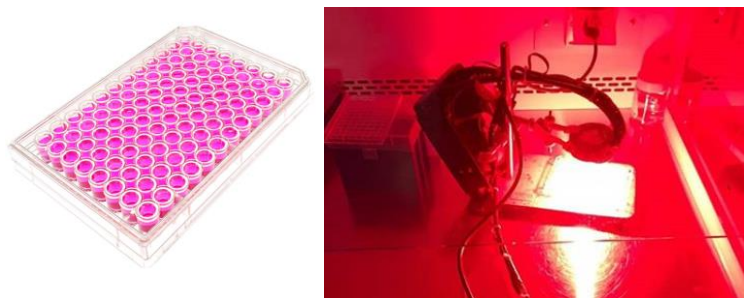


Figura 9. Fotografia da microplaca de cultura e do procedimento de exposição ao diodo emissor de luz (LED) com comprimento de onda de 660nm por 30min, com potência de 60 mW/cm² e fluência de 108,22 J/cm².

Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C em espectrofotômetro/incubadora (Epoch 2 EON Microplate reader, Biotek Inc, USA), com leitura a 600 nm a cada hora por 72 h. As curvas de crescimento, baseadas na densidade óptica (OD), foram obtidas e comparadas. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão da média e avaliados estatisticamente. Os gráficos e a análise de variância (ANOVA two-way) foram realizados utilizando-se o *software* Graphpad Prism 8.0 (Califórnia, USA) e o nível de significância (α) adotado foi de 0,05 (*).

Foram realizados três experimentos independentes para cada condição experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para *C. albicans*, a TFD causou um atraso significativo no crescimento em todas as concentrações de fotossensibilizante testadas, exceto 40 nM (Figura 10).

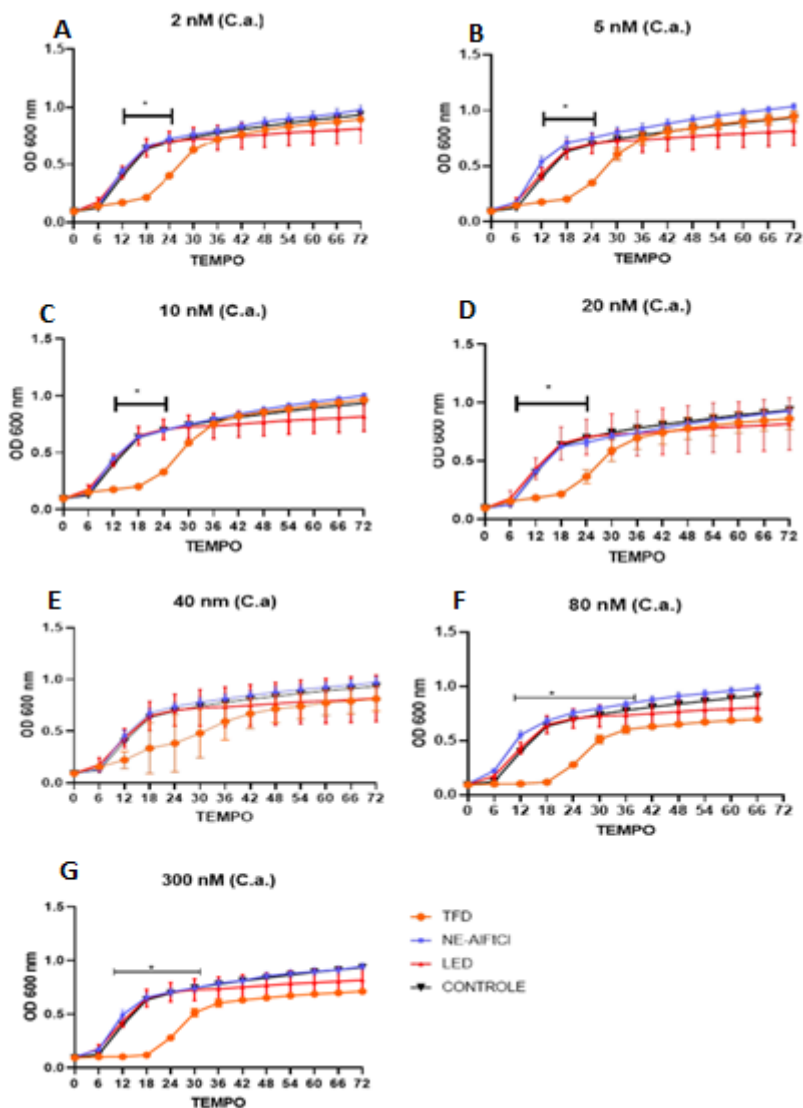


Figura 10. Efeito da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por diferentes concentrações de nanoemulsão contendo cloreto de alumínio ftalocianina (NE-AIFtCl): 2, 5, 10, 20, 40, 80 e 300 nM, sobre a proliferação de *C. albicans in vitro*.

Observou-se que nas primeiras 24 h, houve um deslocamento da fase exponencial das leveduras tratadas, indicando que o crescimento inicial foi mais lento que os respectivos controles. Após esse período, na fase estacionária, a densidade óptica das leveduras expostas à TFD iguala-se ao dos controles. Portanto, conclui-se que o efeito da TFD nessa espécie se limitou às primeiras divisões celulares, havendo recuperação da capacidade de proliferação entre 24 h e 36 h após o tratamento.

O estudo de Paz-Cristobal et al. (2013) demonstrou que a TFD é eficaz na eliminação de *C. albicans in vitro* mesmo em linhagens resistentes ao fluconazol. Foram empregados dois fotossensibilizantes com diferentes mecanismos de ação: a hipericina e o azul de metileno. Os autores concluíram que a hipericina foi mais eficiente em baixas concentrações enquanto o azul de metileno foi eficaz apenas em altas concentrações. O estudo demonstrou ainda que a hipericina apresentou citotoxicidade mais baixa na ausência de irradiação. Esse controle evidencia que o fotossensibilizante foi ativado predominantemente em determinado comprimento de onda, corroborando a biossegurança do fotossensibilizante.¹⁰

Nosso trabalho demonstrou que a NE-AIFtCl não apresenta citotoxicidade escura para nenhuma das espécies de *Candida* estudadas. Nos gráficos, essa característica é representada pela curva de cor azul (NE-AIFtCl), que corresponde ao crescimento das leveduras expostas ao sensibilizante, mas não à irradiação. Essa curva segue os padrões das curvas controles de leveduras incubadas apenas em PBS ou em RPMI.

Demonstramos ainda que, em *C. albicans*, a TFD empregando diferentes concentrações de fotossensibilizante (2 nM a 300 nM) resultou em curvas de crescimento semelhantes, sugerindo que quantidades equivalentes de AIFtCl tenham sido internalizadas pelas leveduras.

Drogas antifúngicas, em concentrações menores do que as clinicamente empregadas, poderiam potencializar os efeitos citostáticos da TFD que observamos nesse estudo. Pretendemos, ainda, avaliar se inibidores de histonas desacetilases, como o butirato de sódio e a tricostatina A, atuariam sinergicamente à TFD-AIFtCl, como foi recentemente demonstrado para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Morais et al., 2019).

Yi-Hsuan e colaboradores (2018) demonstraram que o fluconazol é mais eficiente no controle da proliferação de células planctônicas de *C. albicans* do que em biofilmes. Os autores, em seguida, avaliaram a ação combinada de fluconazol e de TFD mediada por curcumina como agente fotossensibilizante. Obtiveram, assim, tanto a redução do crescimento de células livres quanto de biofilmes.

Para *C. glabrata*, observou-se maior redução da proliferação celular com as concentrações de fotossensibilizante de 10 nM a 300 nM (Figura 11).

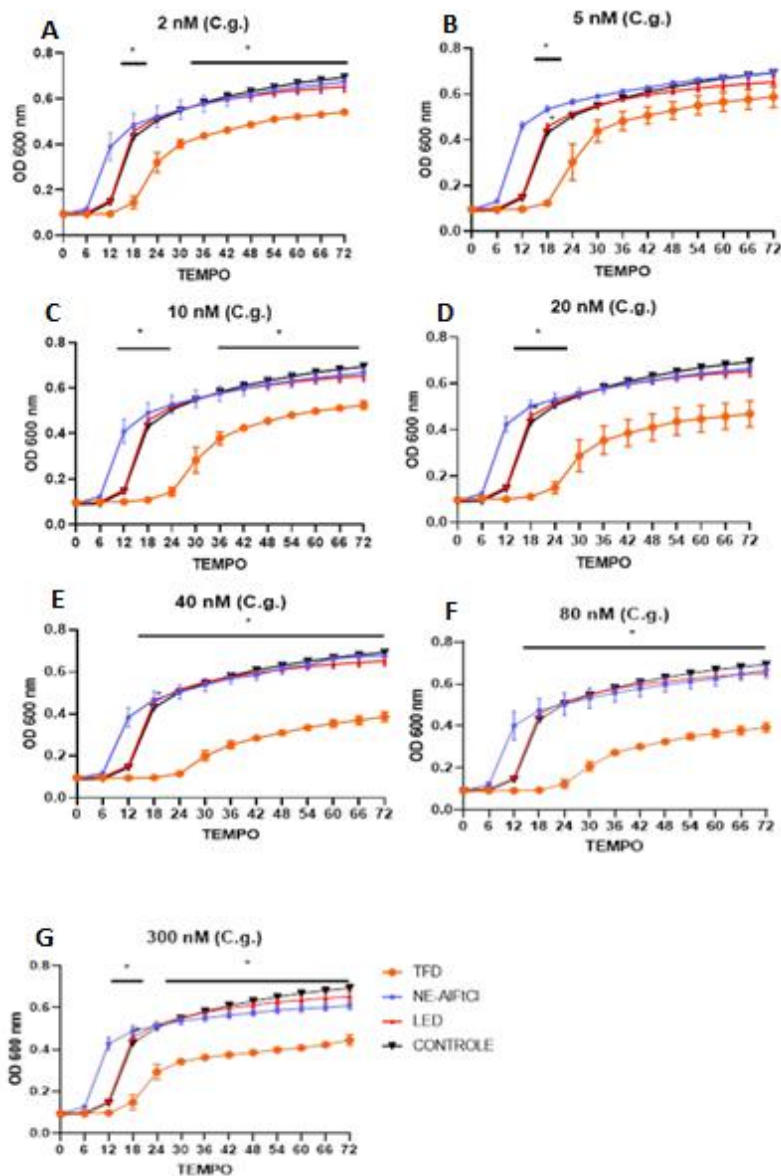


Figura 11. Efeito da TFD mediada por diferentes concentrações de nanoemulsão contendo cloreto de alumínio ftalocianina (NE-AIFtCl): 2, 5, 10, 20, 40, 80 e 300 nM sobre a proliferação de *C. glabrata* in vitro.

Quando administrado de 10 nM a 300 nM do agente fotossensibilizante, OD das culturas correspondeu à metade da dos controles até as 72 h de crescimento. Com 2 nM, a inibição da proliferação foi menor, porém significativa estatisticamente. Com 5 nM não se detectou redução significativa da proliferação. Com base nesses dados, acreditamos que o efeito da TFD nessa espécie seja mais duradouro do que para *C. albicans*, afetando mais a capacidade replicativa do fungo, principalmente nas maiores concentrações testadas.

Em 2017, Freitas e colaboradores demonstraram que aplicações repetidas de TFD sobre *C. glabrata* foram mais eficazes no controle da formação de biofilme sobre resina acrílica polimerizada do uma única aplicação. O fotossensibilizante empregado foi o azul de metileno associado a eritrosina¹². Poderíamos propor aplicações repetidas de TFD com NE-AIFtCl para essa espécie, visando a aumentar a inibição do crescimento. Concentrações de AIFtCl superiores a 300 nM poderiam ser alternativamente empregadas.

Para *C. tropicalis*, as duas maiores concentrações utilizadas (80 e 300 nM) apresentaram o maior efeito inibitório, atrasando a fase exponencial de crescimento e reduzindo a densidade óptica final (Figura 12).

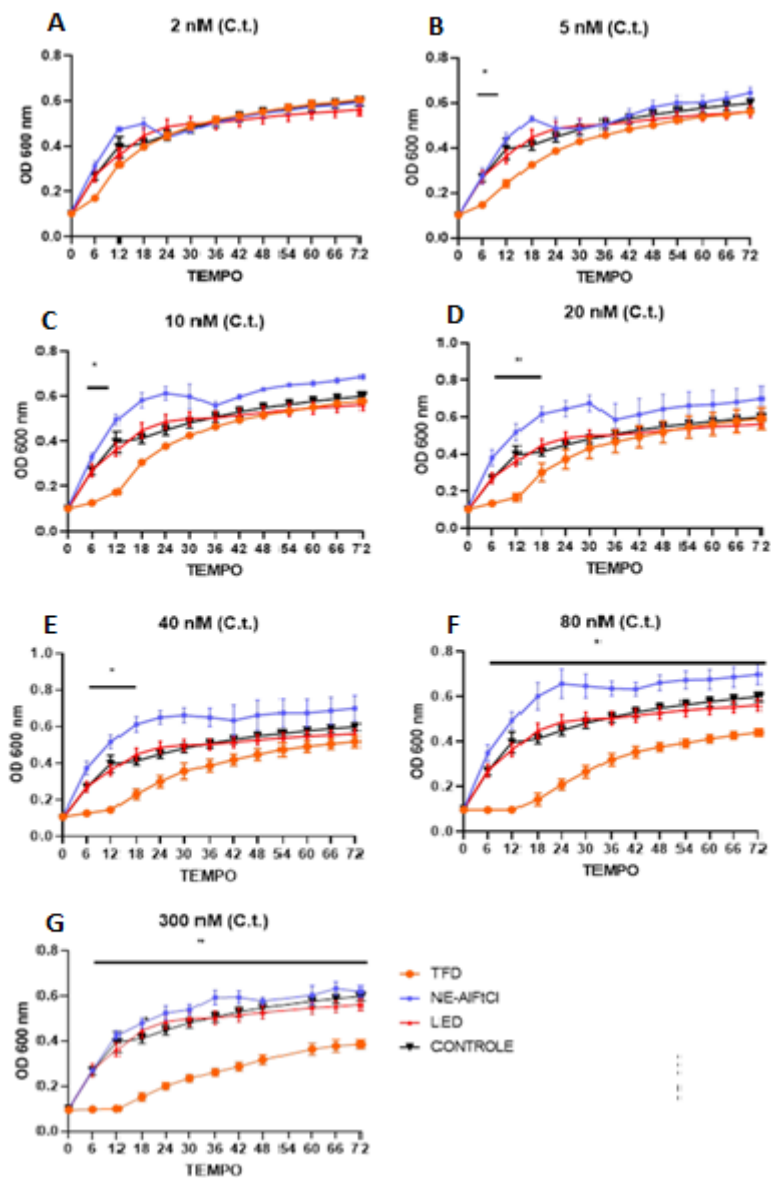


Figura 12. Efeito da TFD mediada por diferentes concentrações de nanoemulsão contendo cloreto de alumínio ftalocianina (NE-AIFtCl): 2, 5, 10, 20, 40, 80 e 300 nM sobre a proliferação de *C. tropicalis* *in vitro*.

A concentração de 2 nM de AICIFt não apresentou efeito sobre a proliferação de *C. tropicalis*. Concentrações de 5 a 40 nM atrasaram o início da fase exponencial de crescimento, sem afetar a OD final na fase estacionária. Verificamos um claro efeito dose de fotossensibilizante-dependente para a redução da proliferação das leveduras dessa espécie.

O emprego de TFD mediada por nanopartículas encapsuladas de quitosana tripolifosfato de ftalocianina e flucitosina reduziu a proliferação, a formação de pseudo-hifas e a virulência leveduras de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol¹³. A redução na viabilidade foi causada em parte pela ação antimicrobiana das nanopartículas de quitosana, sendo essa potencializada pela TFD.

C. parapsilosis apresentou crescimento uniforme e idêntico aos controles após TFD em todas as concentrações testadas, conforme a Figura 13. Dentre as 4 espécies estudadas nesse projeto, essa foi a única a apresentar resistência à TFD.

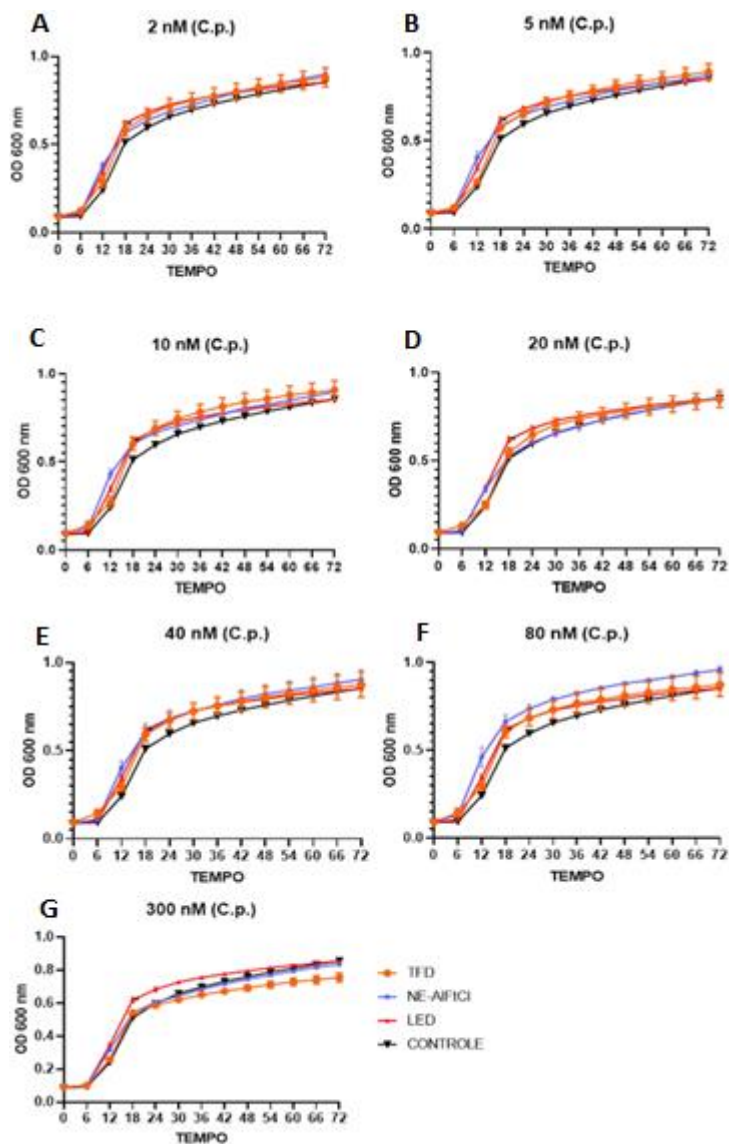


Figura 13. Efeito da TFD mediada por diferentes concentrações de nanoemulsão contendo cloreto de alumínio ftalocianina (NE-AIFtCl): 2, 5, 10, 20, 40, 80 e 300 nM sobre a proliferação de *C. parapsilosis* *in vitro*.

Rezusta e colegas (2011) concluíram que *C. parapsilosis* é mais resistente à TFD mediada por hipericina do que *C. albicans*, visto que foi necessário aumentar a concentração do fotossensibilizante para interferir com o crescimento de *C. parapsilosis*. A escala de fotossensibilizante utilizada por esses últimos autores foi de μM , uma ordem de grandeza acima das concentrações utilizadas no presente estudo.

Com isso em vista, consideramos aumentar a concentração de fotossensibilizante para essa espécie de modo a avaliar um possível efeito da TFD mediada por NE-AIFtCl em nanoemulsão na proliferação celular.²⁶

O protocolo utilizado para a aplicação da TFD em espécies de *Candida in vitro* foi o mesmo utilizado para espécies de *Cryptococcus* (Morais et al., 2019). Precisamos determinar a curva de incorporação de AIFtCl por leveduras de *Candida* de modo a refinar a interpretação dos dados.

Nossos experimentos foram realizados *in vitro*, o que representa o primeiro estágio de experimentação científica. Esperamos, com esses dados, contribuir para desenvolvimento de ensaios pré-clínicos.

A aplicação de LASER (luz por emissão estimulada de radiação) é consolidada na literatura científica e na clínica por sua eficiência na TFD. Entretanto, o dispositivo LASER é mais caro se compararmos com o LED, além do LASER ter a desvantagem de irradiar uma área limitada, enquanto o LED pode sensibilizar um perímetro mais abrangente.

Ressaltamos ainda a utilização de baixas concentrações de fotossensibilizante que se mostraram eficazes no controle da proliferação de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, para identificarmos uma possível concentração mínima com efeito citostático e/ou citotóxico e analisarmos em que processo biológico a TFD age. O aumento das concentrações de fotossensibilizante pode melhorar os efeitos da TFD, principalmente para *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

A administração conjunta de TFD com drogas antifúngicas e moduladoras da estrutura da cromatina deve ser investigada visando ao aumento da eficácia dessa terapia no combate a infecções por fungos patogênicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TFD mediada pela NE-AIFtCl se mostrou eficiente na redução do crescimento *in vitro* de leveduras de *C. albicans*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis*, mesmo em baixas concentrações. No entanto, a TFD mediada por AIFtCl em nanoemulsão não inibiu por completo a proliferação de leveduras dessas espécies nas concentrações testadas.

Estudos que avaliem os resultados da TFD com concentrações maiores de fotossensibilizante e sobre os atributos de virulência, como a formação de pseudo-hifas e de biofilmes, serão realizados.

REFERÊNCIAS

1. Marinho, SA. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida* sp. e de células epiteliais: estudo *in vitro*. 2006. 163 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
2. da Silva NR et al. Preclinical study of a cost-effective photodynamic therapy protocol for treating oral candidoses. *Lasers Med Sci*. 2017 Aug;32(6):1253-1260. doi: 10.1007/s10103-017-2228-4.
3. Paz-Cristobal MP et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*. 2014 Jan;57(1):35-42. doi: 10.1111/myc.12099.

4. Hsieh YH et al. An *in vitro* study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 24;19(2). pii: E337. doi: 10.3390/ijms19020337.
5. Fabio CA et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in murine model. *J Oral Pathol Med*. 2016 Sep;45(8):627-33..
6. STENDERUP, A. Oral mycology. *Acta Odontol. Scand.*, Stockholm, v. 48, n. 1, p. 3-10, Feb. 1990.
7. AGUIRRE URIZAR, J.M. Candidiasis orales. *Rev. Iberoam. Micol.*, Bilbao, v. 19, n.1, p. 17-21, marzo 2002.
8. BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. *Acta Odontol. Scand.*, Estocolmo, v. 48, n.1, p. 37-43, Feb. 1990b.
9. LONGO, João Paulo Figueiró et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *J Photochem Photobiol B*, v. 94, n. 2, p. 143–146, 9 fev. 2009.
10. PAZ-CRISTOBAL, M. P. et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*, [s.l.], v. 57, n. 1, p.35-42, 12 jun. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12099>.
11. HSIEH, Yi-hsuan et al. An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on *Candida albicans*. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 19, n. 2, p.337-348, 24 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19020337>.
12. FREITAS, Lírian Silva de Figueiredo et al. Repeated applications of photodynamic therapy on *Candida glabrata* biofilms formed in acrylic resin polymerized. *Lasers In Medical Science*, [s.l.], v. 32,

- n. 3, p.549-555, 14 jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-017-2147-4>.
13. HSIEH, Yi-hsuan et al. Sequential Photodynamic Therapy with Phthalocyanine Encapsulated Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles and Flucytosine Treatment against *Candida tropicalis*. *Pharmaceutics*, [s.l.], v. 11, n. 1, p.16-27, 4 jan. 2019. MDPI AG.
 14. MCINTYRE, Grant T.. Oral Candidosis. *Dental Update*, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 132-139, 2 abr. 2001. Mark Allen Group..
 15. SAMARANAYAKE, Lakshman P.. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 171-180, fev. 1992. Elsevier BV.
 16. LYNCH, Denis P.. Oral candidiasis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, [S.L.], v. 78, n. 2, p. 189-193, ago. 1994. Elsevier BV.
 17. BUDTZ-JÖRGENSEN, Ejvind. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontologica Scandinavica*, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 61-69, jan. 1990. Informa UK Limited.
 18. OKSALA, Erkki. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontologica Scandinavica*, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 71-74, jan. 1990. Informa UK Limited.
 19. HOLMSTRUP, Pelle; AXÉLL, Tony. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. *Acta Odontologica Scandinavica*, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 57-59, jan. 1990. Informa UK Limited.
 20. CARMELLO, Jc; ALVES, F; RIBEIRO, Apd; BASSO, Fg; COSTA, Ca de Souza; TEDESCO, Ac; PRIMO, Fi; MIMA, Eg; PAVARINA, Ac. *In vivo* photodynamic inactivation of *Candida albicans* using

chloro-aluminum phthalocyanine. *Oral Diseases*, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 415-422, 28 mar. 2016. Wiley.

21. CASTANO, Ana P.; DEMIDOVA, Tatiana N.; HAMBLIN, Michael R.. Mechanisms in photodynamic therapy: part one.: photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis And Photodynamic Therapy*, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 279-293, dez. 2004. Elsevier BV.
22. FUCHS, Beth Burgwyn; TEGOS, George P.; HAMBLIN, Michael R.; MYLONAKIS, Eleftherios. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Photodynamic Inactivation Is Associated with Cell Wall Integrity. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, [S.L.], v. 51, n. 8, p. 2929-2936, 4 jun. 2007. American Society for Microbiology.
23. DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R.. Photodynamic Therapy Targeted to Pathogens. *International Journal Of Immunopathology And Pharmacology*, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 245-254, set. 2004. SAGE Publications..
24. DONNELLY, Ryan F.; MCCARRON, Paul A.; TUNNEY, Michael M.. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiological Research*, [S.L.], v. 163, n. 1, p. 1-12, jan. 2008. Elsevier BV.
25. MORAIS, José Athayde Vasconcelos. Efeito do uso combinado de inibidor de histona desacetilase e terapia fotodinâmica sobre o *In Vitro* crescimento de *Cryptococcus* spp. in vitro. 2019. 80 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
26. REZUSTA, Antonio; LÓPEZ-CHICÓN, Patricia; PAZ-CRISTOBAL, Manuel P.; ALEMANY-RIBES, Mireia; ROYO-DÍEZ, David; AGUT, Montserrat; SEMINO, Carlos; NONELL, Santi; REVILLO, M^a Jose; ASPIROZ, Carmen. Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on *Candida* Species†. *Photochemistry And Photobiology*, [S.L.], v. 88, n. 3, p. 613-619, 30 dez. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01053.x>.

27. MUEHLMANN, Luis Alexandre; RODRIGUES, Mosar Corrêa; LONGO, João Paulo Figueiró; GARCIA, Mônica Pereira; PY-DANIEL, Karen Rapp; VELOSO, Aline Bessa; SOUZA, Paulo Eduardo Narciso de; SILVA, Sebastião William da; AZEVEDO, Ricardo Bentes. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma mcf-7 cells. *Journal Of Nanobiotechnology*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-11, 13 maio 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-015-0095-3>.
28. MUEHLMANN, Luis; MA, Beatriz; LONGO, Joao; SANTOS, Maria; AZEVEDO, Ricardo. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *International Journal Of Nanomedicine*, [S.L.], p. 1199-1213, mar. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s57420>.
29. RODRIGUES, Mosar Corrêa; VIEIRA, Livia Gumieri; HORST, Frederico Hillesheim; ARAÚJO, Eduarda Campos de; GANASSIN, Rayane; MERKER, Carolin; MEYER, Thomas; BÖTTNER, Julia; VENUS, Tom; LONGO, João Paulo F.. Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology*, [S.L.], v. 204, p. 111808-111856, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111808>.
30. CABRAL, Camila Gomes. **Análise do efeito do tratamento fotodinâmico mediado por nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina sobre a produção de hidrolases de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *Penicillium echinulatum***. 2020. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

NORMAS DA REVISTA

BRAZILIAN ORAL RESEARCH

MISSÃO, ESCOPO E POLÍTICA DE SUBMISSÃO

A Brazilian Oral Research - BOR (versão online ISSN 1807-3107) é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO (Divisão brasileira da International Association for Dental Research - IADR). A revista tem classificação A2 Qualis Capes (Odontologia), Fator de Impacto™/2018/2019 1,508 (Institute for Scientific Information - ISI), é revisada por pares (sistema duplo-cego) e tem como missão disseminar e promover o intercâmbio de informações sobre as diversas áreas da pesquisa odontológica e com acesso aberto, modalidade dourada, sem embargo.

A BOR aceita submissão dos seguintes tipos de artigos originais e de revisão, nas seguintes tipologias: Pesquisa Original (artigo completo ou Short Communication), Revisão Sistemática (e Meta-Análise), além de Cartas ao Editor. Todas as submissões deverão ser exclusivas à BOR.

As revisões críticas de literatura são artigos escritos à convite do editor.

A submissão dos manuscritos, e de toda documentação relacionada, deve ser realizada exclusivamente pelo ScholarOne Manuscripts™, através do link de submissão online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>).

O processo de avaliação do conteúdo científico do manuscrito será iniciado somente após o atendimento dos requisitos descritos nestas Instruções aos Autores. O manuscrito em desacordo com estes requisitos será devolvido ao autor de correspondência para adequações.

Importante: Após ser aceito por seu mérito científico, todo manuscrito deverá ser submetido a uma revisão gramatical e estilística do idioma inglês. Para conhecer as empresas recomendadas, entre em contato com bor@sbpqo.org.br. Os autores deverão encaminhar o texto revisado juntamente com o certificado de revisão fornecido pela empresa de edição escolhida. Não serão aceitas revisões linguísticas realizadas por empresas que não estejam entre as indicadas pela BOR.

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

O texto do manuscrito deverá estar redigido em inglês e fornecido em arquivo digital compatível com o programa "Microsoft Word" (em formato DOC, DOCX ou RTF).

Cada uma das figuras (inclusive as que compõem esquemas/compos) deverá ser fornecida em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Fotografias, micrografias e radiografias deverão ser fornecidas em formato TIFF, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais deverão ser fornecidos em formato PDF, em arquivo individual e

separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Arquivos de vídeo poderão ser submetidos, respeitando as demais especificidades, inclusive o anonimato dos autores (para fins de avaliação) e respeito aos direitos dos pacientes.

Importante: o ScholarOne™ permite que o conjunto dos arquivos somem no máximo 10 MB. No caso de a inclusão do arquivo de vídeo acarretar em tamanho superior, é possível informar o link de acesso ao vídeo. Na reprodução de documentação clínica, o uso de iniciais, nomes e/ou números de registro de pacientes são proibidos. A identificação de pacientes não é permitida. Um termo de consentimento esclarecido, assinado pelo paciente, quanto ao uso de sua imagem deverá ser fornecido pelo(s) autor(es) quando solicitado pela BOR. Ao reproduzir no manuscrito algum material previamente publicado (incluindo textos, gráficos, tabelas, figuras ou quaisquer outros materiais), a legislação cabível de Direitos Autorais deverá ser respeitada e a fonte citada.

As seções do manuscrito devem ser apresentadas observando-se as características específicas de cada tipo de manuscrito: folha de rosto (Title Page), introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências.

Folha de rosto (Title Page; dados obrigatórios)

Indicação da área temática da pesquisa enfocada no manuscrito.
Áreas Temáticas: Anatomia; Biologia Craniofacial; Biologia Pulpar; Bioquímica; Cariologia; Ciências do Comportamento; Cirurgia Bucomaxilo; Controle de Infecção; Dentística; Disfunção Temporomandibular; Estomatologia; Farmacologia; Fisiologia; Imaginologia; Implantodontia - Clínica Cirúrgica; Implantodontia -

Clínica Protética; Implantodontia Básica e Biomateriais; Imunologia; Materiais Dentários; Microbiologia; Oclusão; Odontogeriatrics; Odontologia Legal; Odontologia Social; Odontopediatria; Ortodontia; Ortopedia; Patologia Oral; Periodontia; Prótese; Saúde Coletiva; Terapia Endodôntica.

Título informativo e conciso, limitado a um máximo de 110 caracteres incluindo espaços.

Nomes completos e por extenso de todos os autores, incluindo os respectivos e-mails e ORCID.

Recomenda-se aos autores confrontar seus nomes anotados na Folha de Rosto (Title Page) com o perfil criado no ScholarOne™, de modo a evitar incompatibilidades.

Dados de afiliação institucional/profissional de todos os autores, incluindo universidade (ou outra instituição), faculdade/curso em inglês, departamento em inglês, cidade, estado e país. Só é aceita uma afiliação por autor. Verificar se as afiliações foram inseridas corretamente no ScholarOne™.

Texto Principal

Resumo: deve ser apresentado na forma de um parágrafo único estruturado (sem sub-divisões em seções), contendo objetivo, metodologia, resultados e conclusões. No Sistema, utilizar a ferramenta Special characters para caracteres especiais, se aplicável.

Descritores: devem ser fornecidos de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais, escolhidos dentre os descritores cadastrados em <https://meshb.nlm.nih.gov/search> (não serão aceitos sinônimos).

Introdução: deve apresentar o estado da arte do assunto pesquisado, a relevância do estudo e sua relação com outros

trabalhos publicados na mesma linha de pesquisa ou área, identificando suas limitações e possíveis vieses. O objetivo do estudo deve ser apresentado concisamente ao final dessa seção.

Metodologia: devem ser fornecidas todas as características do material pertinente ao assunto da pesquisa (ex.: amostras de tecido, sujeitos da pesquisa). Os métodos experimentais, analíticos e estatísticos devem ser descritos de forma concisa, porém suficientemente detalhada para permitir que outros possam repetir o trabalho. Os dados de fabricantes ou fornecedores de produtos, equipamentos, ou softwares devem ser explicitados na primeira menção feita nesta seção, como segue: nome do fabricante, cidade e país. Os programas de computador e métodos estatísticos também devem ser especificados. A menos que o objetivo do trabalho seja comparar produtos ou sistemas específicos, os nomes comerciais de técnicas, bem como de produtos ou equipamentos científicos ou clínicos só devem ser citados nas seções de "Metodologia" e "Agradecimentos", de acordo com o caso. No restante do manuscrito, inclusive no título, devem ser utilizados os nomes genéricos. Nos manuscritos que envolvam radiografias, microrradiografias ou imagens de MEV, devem ser incluídas as seguintes informações: fonte de radiação, filtros e níveis de kV utilizados. Os manuscritos que relatem estudos em humanos devem incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (World Medical Association, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). O número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Estudos observacionais devem seguir as diretrizes STROBE (<http://stroke-statement.org/>) e o check list deve ser submetido. Ensaio clínicos devem ser relatados de acordo com o protocolo padronizado da CONSORT Statement (<http://www.consort-statement.org/>), revisões sistemáticas e

meta-análises devem seguir o PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>), ou Cochrane (<http://www.cochrane.org/>).

Ensaio Clínicos

Os ensaios clínicos segundo as diretrizes CONSORT disponíveis em www.consort-statement.org. O número de registro do ensaio clínico e o nome do registro da pesquisa serão publicados com o artigo.

Manuscritos que relatem a realização de estudos em animais devem também incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida de maneira ética, e o número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Caso a pesquisa envolva um registro gênico, antes da submissão, as novas sequências genéticas devem ser incluídas num banco de dados público, e o número de acesso deve ser fornecido à BOR. Os autores poderão utilizar as seguintes bases de dados:

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit>

EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>

DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

As submissões de manuscritos que incluam dados de microarray devem incluir a informação recomendada pelas diretrizes MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment - <http://www.mged.org/index.html>) e/ou descrever, na forma de itens, como os detalhes experimentais foram submetidos a uma das bases de dados publicamente disponíveis, tais como:

ArrayExpress: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>

GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Resultados: devem ser apresentados na mesma ordem em que o experimento foi realizado, conforme descrito na seção

"Metodologia". Os resultados mais significativos devem ser descritos. Texto, tabelas e figuras não devem ser repetitivos. Os resultados com significância estatística devem vir acompanhados dos respectivos valores de p.

Tabelas: devem ser numeradas e citadas consecutivamente no texto principal, em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas separadamente do texto em formato DOC, DOCX ou XLS (podem estar reunidas em um único arquivo).

Discussão: deve discutir os resultados do estudo em relação à hipótese de trabalho e à literatura pertinente. Deve descrever as semelhanças e as diferenças do estudo em relação aos outros estudos correlatos encontrados na literatura, e fornecer explicações para as possíveis diferenças encontradas. Deve também identificar as limitações do estudo e fazer sugestões para pesquisas futuras.

Conclusões: devem ser apresentadas concisamente e estar estritamente fundamentadas nos resultados obtidos na pesquisa. O detalhamento dos resultados, incluindo valores numéricos etc., não deve ser repetido.

Agradecimentos: as contribuições de colegas (por assistência técnica, comentários críticos etc.) devem ser informadas, e qualquer vinculação de autores com firmas comerciais deve ser revelada. Esta seção deve descrever a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa, incluindo os respectivos números de processo.

Referências: só serão aceitas como referências as publicações em periódicos revisados por pares.

As citações de referências devem ser identificadas no texto por meio de números arábicos sobrescritos. A lista completa de referências deve vir após a seção de "Agradecimentos", e as referências devem ser numeradas e apresentadas de acordo com o Estilo Vancouver, em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo International Committee of Medical Journal Editors, conforme apresentadas em Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>). Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o List of Journals Indexed in Index Medicus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). A correta apresentação das referências é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Grafia de termos científicos: nomes científicos (binômios de nomenclatura microbiológica, zoológica e botânica) devem ser escritos por extenso, bem como os nomes de compostos e elementos químicos, na primeira menção no texto principal.

Unidades de medida: devem ser apresentadas de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (<http://www.bipm.org> ou <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>).

Notas de rodapé no texto principal: devem ser indicadas por meio de asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Figuras: fotografias, micrografias e radiografias devem ter uma largura mínima de 10 cm, resolução mínima de 500 dpi, e devem ser fornecidas em formato TIFF. Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais devem ser fornecidos em formato PDF. Todas as figuras devem ser submetidas, individualmente, em arquivos separados (Figure 1a, Figure 1b, Figure 2...) e não inseridas no arquivo de texto. As figuras devem ser numeradas e

citadas consecutivamente no corpo do texto, em algarismos arábicos. As legendas das figuras devem ser inseridas todas juntas no final do texto, após as referências.

CARACTERÍSTICAS E FORMATAÇÃO DOS TIPOS DE MANUSCRITOS

Pesquisa Original

Devem ser limitados a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Será aceito um máximo de 8 (oito) figuras e 40 (quarenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação Folha de rosto (Title Page)

Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)

Resumo - máximo de 250 palavras

Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais

Introdução

Metodologia

Resultados

Discussão

Conclusão

Agradecimentos

Referências - máximo de 40 referências

Legendas de figuras

Figuras - máximo de 8 (oito) figuras, conforme descrito acima

Tabelas.

Resumo de Pesquisa Original (Short Communication)

Devem ser limitados a 10.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). É permitido um máximo de 2 (duas) figuras e 12 (doze) referências. O resumo deve conter, no máximo, 100 palavras.

Formatação

Folha de rosto

Texto principal (10.000 caracteres incluindo espaços)

Resumo - máximo de 100 palavras

Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais

Introdução

Metodologia

Resultados

Discussão

Conclusão

Agradecimentos

Referências - máximo de 12 referências

Legendas de figuras

Figuras - máximo de 2 (duas) figuras, conforme descrito acima

Tabelas.

Revisão Crítica de Literatura

A submissão desse tipo de manuscrito será realizada apenas a convite da Comissão de Publicação da BOR. Todos os manuscritos serão submetidos à revisão por pares. Esse tipo de manuscrito deve ter um conteúdo descritivo-discursivo, com foco numa apresentação e discussão abrangente de questões científicas importantes e inovadoras, e ser limitado a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Incluir uma apresentação clara do objeto científico de interesse,

argumentação lógica, uma análise crítica metodológica e teórica dos estudos e uma conclusão resumida. É permitido um máximo de 6 (seis) figuras e 50 (cinquenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação

Folha de rosto

Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)

Resumo - máximo de 250 palavras

Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais

Introdução

Metodologia

Resultados

Discussão

Conclusão

Agradecimentos

Referências - máximo de 50 referências

Legendas de figuras

Figuras - máximo de 6 (seis) figuras, conforme descrito acima

Tabelas.

Revisão Sistemática e Meta-Análise

Ao resumir os resultados de estudos originais, sejam eles quantitativos ou qualitativos, esse tipo de manuscrito deve responder a uma questão específica, ser limitado a 30.000 caracteres, incluindo espaços, e seguir o estilo e formato Cochrane (www.cochrane.org). O manuscrito deve informar detalhadamente como se deu o processo de busca e recuperação dos trabalhos originais, o critério de seleção dos estudos incluídos na revisão e fornecer um resumo dos resultados obtidos nos estudos revisados (com ou sem uma abordagem de meta-análise). Não há limite para a quantidade de referências e figuras. Tabelas e figuras, caso sejam incluídas,

devem apresentar as características dos estudos revisados, as intervenções que foram comparadas e respectivos resultados, além dos estudos excluídos da revisão. Demais tabelas e figuras pertinentes à revisão devem ser apresentadas como descrito anteriormente. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação

Folha de rosto

Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)

Resumo - máximo de 250 palavras

Formulação da pergunta

Localização dos estudos

Avaliação crítica Coleta de dados

Análise e apresentação dos dados

Aprimoramento

Atualização da revisão

Referências - não há limite para a quantidade de referências

Figuras - não há limite para a quantidade de figuras

Tabelas.

Carta ao Editor

Cartas devem incluir evidências que sustentem a opinião do(s) autor(es) sobre o conteúdo científico ou editorial da BOR, e ser limitadas a 500 palavras. Figuras ou tabelas não são permitidas.

"Checklist" para Submissão Inicial

Arquivo de folha de rosto (Title Page, em formato DOC, DOCX ou RTF).

Arquivo do texto principal (Main Document, manuscrito), em formato DOC, DOCX ou RTF.

Tabelas, em formato DOC, DOCX ou EXCELL.

Figuras: Fotografias, micrografias e radiografias (largura mínima de 10 cm e resolução mínima de 500 DPI) em formato TIFF. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images>). Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais em formato PDF. Cada uma das figuras deve ser submetida em arquivos separados e individuais (não inseridas no arquivo de texto). Declaração de interesses e de financiamento, submetida em um documento separado e em formato PDF.

TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS E DECLARAÇÕES DE RESPONSABILIDADE

O manuscrito submetido para publicação deve ser acompanhado do Termo de Transferência de Direitos Autorais e Declarações de Responsabilidade, disponível no sistema online e de preenchimento obrigatório.

Plágio

A BOR emprega um sistema de detecção de plágio. Ao enviar o seu manuscrito para a Revista, este manuscrito poderá ser rastreado. Isto não tem relação com a simples repetição de nomes / filiações, mas envolve frases ou textos utilizados.

Custo para publicação

Os autores não são submetidos a uma taxa de submissão de artigos e de avaliação.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

Periódicos

Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in developing countries: a review of the evidence. *Pediatrics*. 2005;115(2 Suppl):519-617. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1441>

Artigos com Título e Texto em Idioma Diferente do Inglês

Li YJ, He X, Liu LN, Lan YY, Wang AM, Wang YL. [Studies on chemical constituents in herb of *Polygonum orientale*]. *Zhongguo Ahong Yao Za Zhi*. 2005 Mar;30(6):444-6. Chinese.

Suplementos ou Edições Especiais

Pucca Junior GA, Lucena EHG, Cawahisa PT. Financing national policy on oral health in Brazil in the context of the Unified Health System. *Braz Oral Res*. 2010 Aug;24 Spec Iss 1:26-32.

Livros

Stedman TL. *Stedman's medical dictionary: a vocabulary of medicine and its allied sciences, with pronunciations and derivations*. 20th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.

Livros Online

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]*. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>

Websites

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>
Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage]. Brasília (DF): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010 [cited 2010 Nov 27]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>

World Health Organization [homepage]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 2011 Jan 17]. Available from: <http://www.who.int/en/>