



USO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E NEGATIVAS RESISTENTES

Priscila Maria de Lima Santos¹
priscilaml21@hotmail.com

Demetrius Pereira Santos²
priscilaml21@hotmail.com

Raiany Thais Gomes Silva³
priscilaml21@hotmail.com

Paulo Victor Ataliba Morais⁴
priscilaml21@hotmail.com

Suellen Emilliany Feitosa Machado⁵
priscilaml21@hotmail.com

RESUMO: A terapia fotodinâmica antimicrobiana (*antimicrobial photodynamic therapy* – aPDT) tem se mostrado promissora contra a resistência microbiana, uma forte ameaça à saúde pública mundial. A aPDT utiliza fotossensibilizadores e fonte de luz visível de baixa potência, em determinado comprimento de onda, resultando na formação de espécies de oxigênio reativo ou oxigênio singleto, na presença de oxigênio molecular, provocando danos oxidativos e morte celular. Os mecanismos de oxidação e morte celular ocorrem por reações fotoquímicas dos tipos I (transferência de elétrons) e II (transferência de energia). Este estudo objetivou descrever e discutir o uso da aPDT contra bactérias de interesse clínico, resistentes a antibióticos ou não. Tratou-se de uma revisão da literatura, cuja seleção dos artigos científicos que a embasaram foi realizada nas bases de dados Biblioteca Virtual de Saúde (BVS), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e *National Library of Medicine* (PubMed). Utilizou-se os descritores “Terapia fotodinâmica”, “Fotossensibilizadores”, “oxigênio *singleto*”, “resistência microbiana a medicamentos”, “Fotoquimioterapia antimicrobiana” e seus correspondentes em inglês. Considerou-se artigos científicos, de pesquisas originais, publicados entre 2015-2022 em português e inglês. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus MDR* na forma plactônica, e *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* na forma sésil, foram susceptíveis a aPDT utilizando fotossensibilizadores das classes fenotiazínicos, triantmentanos, porfirinas e curcumina, com comprimento de onda, tempo de irradiação e concentrações diferentes, podendo ter sua ação potencializada com adição do iodeto de potássio. Quanto às concentrações, não é fácil definir a mais eficaz e/ou ideal, pois outros parâmetros precisam ser considerados, como a metodologia (*in vivo* ou *in vitro*). Conclui-se que aPDT é uma alternativa não-invasiva, segura, rápida e, portanto, promissora para combater infecções bacterianas. Ademais, não gera resistência e pode ser utilizada topicamente ou no local da infecção. Novos estudos são necessários, inclusive, para desenvolver protocolos seguros para utilização na prática clínica.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Fotossensibilizadores. Oxigênio singleto. Resistência microbiana. Fotoquimioterapia antimicrobiana.

¹Farmacêutica, Tutora do curso de Farmácia, Ser Educacional

²Acadêmico do curso de Biomedicina, Estácio

³Farmacêutica Residente em Saúde da Família, UFPE

⁴Médico Residente em Cirurgia Geral, UEPA

⁵ Professora orientadora, UFPA.



ABSTRACT: Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has shown promise against microbial resistance, a major threat to global public health. aPDT uses photosensitizers and low-power visible light source at a given wavelength, resulting in the formation of reactive oxygen species or singlet oxygen, in the presence of molecular oxygen, causing oxidative damage and cell death. The oxidation mechanisms and cell death occur by photochemical reactions of types I (electron transfer) and II (energy transfer). This study aimed to describe and discuss aPDT use against clinical interest bacteria, resistant to antibiotics or not. This was a literature review, whose selection of scientific articles that supported it was carried out in the Virtual Health Library (BVS), Scientific Electronic Library Online (SciELO) and National Library of Medicine (PubMed) databases. The descriptors “Photodynamic therapy”, “Photosensitizers”, “singlet oxygen”, “microbial drug resistance”, “Antimicrobial photochemotherapy” and their corresponding words in English were used. Scientific articles, from original research, published between 2015-2022 in Portuguese and English were considered. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *S. aureus* MDR in the planktonic form, and *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* in the sessile form, were susceptible to aPDT using photosensitizers of the phenothiazine, trialmentane, porphyrin and curcumin classes, with wavelength, irradiation time and different concentrations, and its action may be potentiated with the addition of potassium iodide. Regarding concentrations, it is not easy to define the most effective and/or ideal, as other parameters need to be considered, such as the methodology (*in vivo* or *in vitro*). This study concluded that aPDT is a non-invasive, safe, fast and, therefore, promising alternative to fight bacterial infections. Furthermore, it does not generate resistance and can be used topically or at the site of infection. New studies are needed to develop safe protocols for the use in clinical practice.

Keywords: Photodynamic therapy. Photosensitizers. Singlet Oxygen. Microbial drug resistance. Antimicrobial photochemotherapy.

INTRODUÇÃO

A resistência microbiana é um problema de saúde pública relevante em nível global e diversos fatores contribuem para o seu aumento e disseminação, como o uso indiscriminado de antibióticos pela população, prescrições inadequadas, doses e posologia ineficazes e tratamento empírico. Estes fatores podem acarretar usos abusivos e irrelevantes dos antibióticos (IBRAHIM et al., 2021). As más práticas de higiene em hospitais também são responsáveis pela disseminação de cepas resistentes (MELO et al., 2019).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês: *antimicrobial photodynamic therapy* - aPDT) surge como uma alternativa no combate à resistência microbiana. Seu mecanismo é baseado na utilização de fotossensibilizadores (FS) diferentes e fonte de luz visível de baixa potência, considerando determinado comprimento de onda. Isto promove a formação de espécies de oxigênio reativo (do inglês: *Reactive Oxygen Species* - ROS) ou oxigênio singleto, na presença de oxigênio molecular, que provoca danos oxidativos e morte celular. As reações fotoquímicas se dão por distintos mecanismos. A reação do tipo I ocorre através da transferência de elétrons, enquanto a reação do tipo II ocorre por transferência de energia (MELO et al., 2021). Alguns fatores contribuem para o sucesso da aPDT, como a intensidade da fonte de luz e os tipos de FS. Estes últimos, por sua vez, precisam ter as seguintes características: alta absorção de luz visível, alta seletividade com célula bacteriana, ser atóxica na célula hospedeira na ausência de luz e alta produção de ROS (HAMBLIN, 2016).

Estudos realizados avaliaram a eficácia da aplicação da aPDT no tratamento de infecções provocadas por bactérias resistentes Gram positivas e Gram negativas, tanto na forma planctônica como na sésil. A eficácia do método já foi comprovada para espécies de *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina (do inglês: *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*- MSSA) e resistentes (do inglês: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*- MRSA), *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* (BRIGGS et al., 2018), *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* (PRAZMO et al., 2017). Microrganismos produtores de biofilmes são mais resistentes a aPDT devido à presença de uma matriz polimérica extracelular que os envolve, propiciando uma barreira mecânica. Nestes casos, torna-se necessário o emprego de



concentrações maiores de FS e dose de luz (KASHEF &, HAMBLIN, 2017; COLETTI et al., 2017).

Frente à problemática da resistência microbiana e os mecanismos de defesa desenvolvidos pelos microrganismos, que acarretam um crescimento acelerado de cepas resistentes à antibioticoterapia convencional, além da redução de pesquisas e desenvolvimento de novas moléculas ativas para combater doenças infecciosas que apresentam ameaças à saúde humana, torna-se necessário o uso de novas medidas não invasivas e não-antibióticas como alternativas viáveis. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi descrever e discutir o uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana nas bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse clínico, especialmente as resistentes a antibióticos convencionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa seguiu os princípios e diretrizes de uma revisão de literatura. Para a realização das buscas e seleção dos artigos científicos, foram consultadas as seguintes bases de dados: Biblioteca Virtual de Saúde (BVS), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e *National Library of Medicine* (PubMed). Utilizaram-se os seguintes descritores, conforme o vocabulário estruturado da base dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): terapia fotodinâmica, fotossensibilizadores, oxigênio *singlete*, resistência microbiana a medicamentos, fotoquimioterapia antimicrobiana e seus correspondentes em inglês.

Como critérios de inclusão, foram considerados artigos científicos disponíveis e originais, relacionados à temática em estudo e que foram publicados entre 2015 e 2021, disponíveis em língua portuguesa e inglesa. Os critérios de exclusão consistiram em não considerar monografias, dissertações, teses, trabalhos científicos repetidos nas bases de dados, artigos de opinião ou de reflexão, editoriais, pesquisa que não abordavam de forma direta o tema em apreço, literatura publicada fora do período previamente definido ou que estavam disponíveis em outro idioma que não fosse o português e o inglês.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações fotoquímicas, que fundamentam o mecanismo de ação da aPDT, também nomeadas como inativação fotodinâmica (PDI) por alguns autores (ALMEIDA et al., 2015; HASEGAWA et al., 2015; MESQUITA et al., 2018) ocorrem por mecanismos denominados tipos I e II. O mecanismo inicia-se com absorção de luz pelo FS, que passa do seu estado fundamental para um estado singlete excitado eletrônico, no qual o FS tem vida curta e pode retornar ao seu estado fundamental com emissão de luz (fluorescência), calor ou ser transformado no estado tripleto excitado (LIU et al., 2015).

A reação do tipo I ocorre com o FS no seu estado tripleto excitado, atraindo elétrons de moléculas circunjacentes como NADPH reduzido, Guanina (presente nos ácidos nucleicos), triptofano e tirosina nas proteínas (BENOV, 2015). Assim, serão gerados radicais que irão transferir elétrons extras do FS para um substrato, sendo este o oxigênio molecular em reações do tipo I, produzindo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este, por sua vez, pode sofrer uma dismutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), precursor de ROS mais citotóxico como radicais hidroxila ($\bullet OH$) e ânions de radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$) (LIU et al., 2015; CIEPLIK et al., 2018).

Na reação do tipo II, o FS no seu estado tripleto excitado reage com o oxigênio molecular (O_2) e forma o oxigênio singlete (1O_2) altamente reativo através de transferência de energia (LIU et al., 2015; KASHEF & HAMBLIN, 2017). O 1O_2 produzido na reação do tipo II tem sido o principal fator para os danos oxidativos na célula microbiana, pois as enzimas antioxidantes não evoluíram, além do curto tempo de vida dessa molécula (BENOV, 2015). Conseqüentemente, a



distância que eles percorrem em um ambiente biológico é curto, o que implica que a localização do FS é um fator chave para a eficiência fotodinâmica, uma vez que o local de ligação será onde os primeiros danos oxidativos irão ocorrer (ALVES et al., 2014; AWAD et al., 2016).

Os danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácido nucléicos não estão ligados apenas ao $^1\text{O}_2$, mas também a os ânions superóxidos e radicais hidroxilas, tendo em vista que um FS não age apenas pelo mecanismo do tipo I ou tipo II, podendo ocorrer simultaneamente os dois tipos de reação (ALVES et al., 2014; LIU et al., 2015). Contudo, ao final do mecanismo fotodinâmico, o FS retorna ao seu estado fundamental, podendo absorver novos fótons de luz para gerar novas ROS ou $^1\text{O}_2$.

Bactérias Gram positivas e Gram negativas são suscetíveis a aPDT, tanto na forma planctônica como na de biofilme. A classe dos fenotiazínicos, como o azul de toluidina e azul de metileno, possuem cargas catiônicas e são os FS mais estudados, apresentando potencial antimicrobiano frente aos dois grupos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii* (Gram negativas) e *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* (Gram positivas) (HUANG et al., 2018). A ação pode ser otimizada com a adição do sal iodeto de potássio (KI), como no caso da junção do azul de metileno com KI contra *E. coli* (VIEIRA et al., 2018). A utilização da aPDT frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse clínico, os FS utilizados e suas concentrações, o comprimento de onda e do tempo de irradiação em que houve susceptibilidade bacteriana são apresentados na Tabela 1.

Verde malaquita é um FS pertencente à classe dos triarilmentanos e, assim como os fenotiazínicos, possui carga catiônica. Sua ação pode ser maior quando comparada à do azul de metileno contra *E. coli*, tendo em vista que a concentração utilizada de verde malaquita é bem menor (HASEGAWA et al., 2015).

Dentre os FS citados na Tabela 1, destacam-se dois que pertencem à classe das porfirinas: sinoporfirina e hematoporfirina IX M. A sinoporfirina é utilizada no tratamento de câncer, apresenta solubilidade em água, fotoinativação, baixa toxicidade no escuro e bom rendimento quântico, mostrando-se eficiente no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e *S. aureus* MDR, assim como o azul de metileno (MAI et al., 2017). As porfirinas catiônicas são efetivas frente a bactérias sensíveis e a cepas resistentes a antibióticos (AWAD et al., 2016). A hematoporfirina IX M ($\text{C}_{50}\text{H}_{74}\text{N}_8\text{O}_2$) é um FS quimicamente modificado da hematoporfirina IX ($\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6$), qual é derivada da protoporfirina.



Tabela 1. Utilização da aPDT frente a bactérias Gram positivas e negativas: fotossensibilizadores, concentrações, tempo de irradiação e comprimento de onda (Legenda: (**): Biofilme; MDR: *Multidrug-resistant*; KI: iodeto de potássio).

Bactérias	Fotossensibilizadores	Concentrações	Tempo de irradiação (minutos)	Comprimento de onda(nm)	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. aureus</i> MDR	Sinoporfirinasódica	1 mM	75,0	635	Mai e tal. (2017)
	Azuldemetileno	0,1-0,5mM	16,0	665	Briggs et al. (2018)
<i>Escherichia coli</i>	Azuldemetileno	1000 μmolL^{-1}	15,0	600-680	Hasegawa et al. (2015)
	VerdeMalaquita	250 μmolL^{-1}	15,0	600-680	Hasegawa et al. (2015)
	Azuldemetileno + KI	100 μM +100nM	32,0	660	Huang et al. (2018)
<i>Enterococcus faecalis</i> **	Azuldetoluidina	13-15mg/mL	2,0	635	Prazmo et al. (2017)
	Curcumina	5,0mg/mL	5,0	450	Pourhajibagher et al. (2018)
<i>Streptococcus mutans</i> **	Hematoporfirina IXM	10mmol/L	1,0	420-480	Esper et al.(2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	Azuldemetileno	50 μM	1,0	660	Garcez et al. (2016)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Azuldemetileno	0,1mg/mL	7,13	660	Mello et al. (2019)

Fonte: Os autores.



Esta, por sua vez, é decorrente de moléculas biológicas como a hemoglobina, sendo, portanto, bem metabolizado. A hematoporfirina IX M mostrou-se eficaz frente a *Streptococcus mutans* (ESPER et al., 2019).

A curcumina, FS carregado positivamente, mostrou-se efetiva contra *Enterococcus faecalis*. Pourhajibagher et al. (2018) relataram que este FS foi mais efetivo que o azul de toluidina contra *E. faecalis* na forma de biofilme, fato que discorda com o resultado exposto na Tabela 1. Esta discordância pode ser justificada pela concentração usada no referido estudo (0,1mg/mL). Essa concentração pode ser considerada baixa em comparação a 13-15 mg/mL usada por Prazmo et al. (2017). Os comprimentos de onda usados por Pourhajibagher et al. (2018) e Prazmo et al. (2017) foram semelhantes (635 nm), havendo divergência no tempo de irradiação (Pourhajibagher et al. (2018) usaram o tempo de 5 minutos e Prazmo et al. (2017) usaram apenas 2 minutos).

Comparar a concentração eficaz e a concentração ideal pode não ser simples, tendo em vista que foram usadas concentrações diferentes e é necessário avaliar outros parâmetros como metodologia aplicada (*in vivo* ou *in vitro*), trata-se de uma forma planctônica ou biofilme, dentre outros. O tempo de irradiação em bactérias na forma de biofilme tende a ser maior, em consequência da presença da matriz polimérica que as envolvem (KASHEF & HAMBLIN, 2017), sendo necessários maiores quantidades de oxigênio singleto e ROS para fotoinativar as biomoléculas. Dessa forma, o tempo de irradiação influencia totalmente na quantidade de oxigênio singleto produzido (BRIGGS et al., 2018).

Neste ponto de vista, os resultados apresentados na Tabela 1 não estão em acordo com os acima descritos, pois bactérias na forma de biofilme necessitaram de tempos de irradiação menores quando comparados às planctônicas. Os comprimentos de onda apresentados nos resultados estão dentro dos parâmetros da luz visível de 400 a 700nm, sendo a maioria dos FS ativados na região de luz vermelha entre 630 e 700nm. Já os derivados de porfirinas e curcumina são excitados nos comprimentos de onda entre 405 e 550nm na região de luz azul (LIU et al., 2015; VIEIRA E VIEIRA, 2017).

CONCLUSÕES

A aPDT é um procedimento rápido, não invasivo, seguro, e que tem se mostrado promissor tanto *in vitro* como *in vivo*. Dentre suas maiores vantagens, cita-se o fato de ser um procedimento que não gera resistência bacteriana, devido à capacidade de danificar uma série de biomoléculas que constituem a estrutura bacteriana, além da possibilidade de ser administrada tanto topicamente como diretamente no local da infecção. Embora as maiorias das infecções ocorram dentro do corpo, é possível que tanto o FS quanto a luz alcancem determinadas regiões como nariz, garganta, ouvido, trato gastrointestinal, pulmões, trato urinário, além de casos de infecções mais profundas, por intermédio de endoscópio ou fibra óptica. A técnica possui aplicabilidade na dermatologia, odontologia e nas práticas clínicas.

Nesse estudo, verificou-se que vários trabalhos constataram que as bactérias Gram positivas e Gram negativas são susceptíveis a aPDT tanto na forma de planctônica como na séssil. Os FS carregados positivamente são efetivos contra ambos os grupos, sendo o de melhor escolha, pois em uma infecção pode haver mais de um grupo de bactéria colonizando a área. Parâmetros como concentração, tempo de irradiação ainda são controversos, sendo necessária a realização de outras pesquisas com o intuito de estabelecer protocolos seguros.



REFERÊNCIAS

- ALVES, E. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Medicinal Chemistry*, v. 6, n. 2, p. 141-164, 2014.
- ALMEIDA A. et al. Photodynamic inactivation of bacteria: finding the effective targets. *Future Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 10, p. 1221-1224, 2015.
- AWAD, M.M. et al. Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 7679-7688, 2016.
- BENOV, L. Photodynamic therapy: current status and future directions. *Medical Principles and Practice*, v. 24, n. 1, p. 14-28, 2015.
- BRIGGS, T. et al. Antimicrobial photodynamic therapy- a promising treatment for prosthetic joint infections. *Lasers in Medical Sciences*, v. 33, n. 3, p. 523-532, 2018.
- CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy- what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.
- COLETTI, T.M.S.F.A. et al. Optimization of antimicrobial photodynamic therapy in biofilms by inhibiting efflux pump. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 35, n. 7, p. 378-385, 2017.
- ESPER, M.A.L.R. et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and *Streptococcus mutans* biofilms for prevention of White spot lesions during orthodontic treatment: An in vitro investigation. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 155, p. 243-253, 2019.
- GARCEZ, A.S. et al. Uma nova estratégia para PDT antimicrobiana em endodontia. *Revista da Associação Paulista de Cirurgias Dentistas*, v. 70, n. 2, p. 126-30, 2016.
- HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 33, p. 67-73, 2016.
- HASEGAWA, G.K.F. et al. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by methylene blue and malachite green under red LED light. *Revista Ambiente e Água*, v. 10, n. 2. p. 318-326, 2015.
- HUANG, Y.Y. et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue and potassium iodide to treat urinary tract infection in a female rat model. *Scientific Reports*, v. 8. p. 7257, 2018.
- IBRAHIM, S. et al. *Acinetobacter baumannii* multirresistente como uma preocupação emergente em hospitais. *Molecular Biology Reports*, v. 48, n. 10, p. 6987-6998, 2021.



KASHEF, N.; HAMBLIN, M.R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation?. *Drug Resistance Updates*, v. 31, p. 31-42, 2017.

LIU Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Clinical and Translational Research*, v. 1, n. 3, p. 140-167, 2015.

MAI, B. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy for *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant bacterial burn infection in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 5915-5931, 2017.

MELO, M.A. et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) para tratamentos de biofilme. *Virulência*, v. 12, n. 1, p. 2247-2272, 2021.

MELO, F.S. et al. Uso racional de antimicrobianos na unidade de terapia intensiva. *Revista de Enfermagem UFPE on line*, v. 13, n. 5, p. 1475-84, 2019.

MELLO, M.M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against clinical isolates of carbapenem-susceptible and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Laser in Medical Science*, p. 1-7, 2019.

MESQUITA, M.Q. et al. Revisiting current photoactive materials for antimicrobial photodynamic therapy. *Molecules*, v. 23, p. 2-47, 2018.

POURHAJIBAGHER, M. et al. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic Therapy*, v. 24, p. 206-211, 2018.

PRAZMO, E.J. et al. Effectiveness of repeated photodynamic therapy in the elimination of intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm: an in vitro study. *Lasers in Medical Science*, v. 32, n.3, p. 655-661, 2017.

VIEIRA, C. et al. Uma visão sobre o efeito de potenciação de iodeto de potássio na eficácia de aPDT. *Microbiologia Frontal*, n. 9, p. 2665, 2018.

VIEIRA, P.N., VIEIRA, S.L.V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 21, n. 3, p. 209-212, 2017.