

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA COM LED DE ALTA
INTENSIDADE MEDIADA POR ERITROSINA
CONTRA BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS
FAECALIS***

Silvana Cristina Gama Vaz Rodrigues

2019

Silvana Cristina Gama Vaz Rodrigues

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM
LED DE ALTA INTENSIDADE MEDIADA POR ERITROSINA
CONTRA BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

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

Área de Concentração: Odontologia
Integrada

Orientador: Prof. Dr. Etevaldo Matos
Maia Filho

Co-Orientadora: Profa. Dra Ceci
Nunes Carvalho

São Luís

2019

Rodrigues, Silvana Cristina Gama Vaz
Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com LED de alta intensidade mediada por eritrosina contra biofilme de *Enterococcus faecalis* – São Luís, 2019.
XXXXX p.
Dissertação (Mestrado) – Universidade CEUMA.
Orientador: Prof. Dr. Etevaldo Matos Maia Filho

1 Eritrosina. 2 Terapia Fotodinâmica. 3 *Enterococcus faecalis*

CDU: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Nome: Silvana Cristina Gama Vaz Rodrigues

Título: Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com LED de alta intensidade mediada por eritrosina contra biofilme de *Enterococcus faecalis*

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

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Etevaldo Matos Maia Filho

Instituição: UNICEUMA

Assinatura: _____

Profa. Dra. Meire Coelho Ferreira

Instituição: UNICEUMA

Assinatura: _____

Profa. Dra. Izabelle Maria Cabral de Azevedo

Instituição: UNICEUMA

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Vaz e Assunção** pelo exemplo de família que construíram. São meu alicerce e minha base. Aos meus irmãos **Rosana, Liana, Luciana, Vaz Filho e Pollyana** pelo incentivo em encarar essa difícil caminhada para realização do meu sonho de ser Mestre. Amo muito vocês!

Ao meu esposo **Ribamar Nery** pela compreensão nas horas difíceis, apoio incondicional e incentivo em tudo que faço para crescer na minha profissão. Meu amor para sempre.

Aos meus filhotes **Leonardo e Marina**, maior amor da minha vida e meu orgulho. Peço desculpas pelos momentos que estive ausente para que esse meu sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, incondicionalmente, por iluminar meu caminho, dando-me garra para enfrentar todas as dificuldades e conseguir alcançar tão valoroso mérito.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. **Etevaldo Matos Maia Filho**, que soube ser paciente e sabiamente me conduzir nessa jornada, dividindo comigo seus conhecimentos. Agradeço sua disponibilidade e auxílio para minha formação.

A minha dedicada co-orientadora Profa. Dra. **Ceci Nunes Carvalho**, por sua vontade em contribuir para execução deste e por suas doces palavras em momentos difíceis.

A Profa. Dra. **Tânia Maria Gaspar Novais**, do Departamento de Farmácia da UNICEUMA, pelo seu carinho e dedicação nos auxiliando com a parte microbiológica do estudo, sem a qual teria sido impossível a realização deste.

Ao Sr. **Marinaldo Maciel Leitão Filho**, técnico do Laboratório Multidisciplinar da UNICEUMA, que muito colaborou com a parte técnica de nossa pesquisa.

Aos colegas **Thiago Quirino Mota da Silva, Isabel Alessandra Miranda Nunes**; aos acadêmicos de odontologia **Raquel Farias**

Fernandes (amiga para a vida, que conquistei com os muitos momentos de convívio no laboratório), **Patrick Pereira Garcia** e **Maydson Moreira Gomes** pela fundamental ajuda na realização da etapa laboratorial desta pesquisa.

A UNICEUMA pela disponibilidade de suas instalações.

Aos amigos **Bruna, Camila, Claudio, Daniella, Daniel, Gustavo, Lucas, Lucila, Paulo, Rosyara, Samuel e Thiago** (minha dupla), presentes que ganhei com o Mestrado. **Aqui ninguém solta a mão de ninguém...** vocês foram fundamentais em todos os momentos.

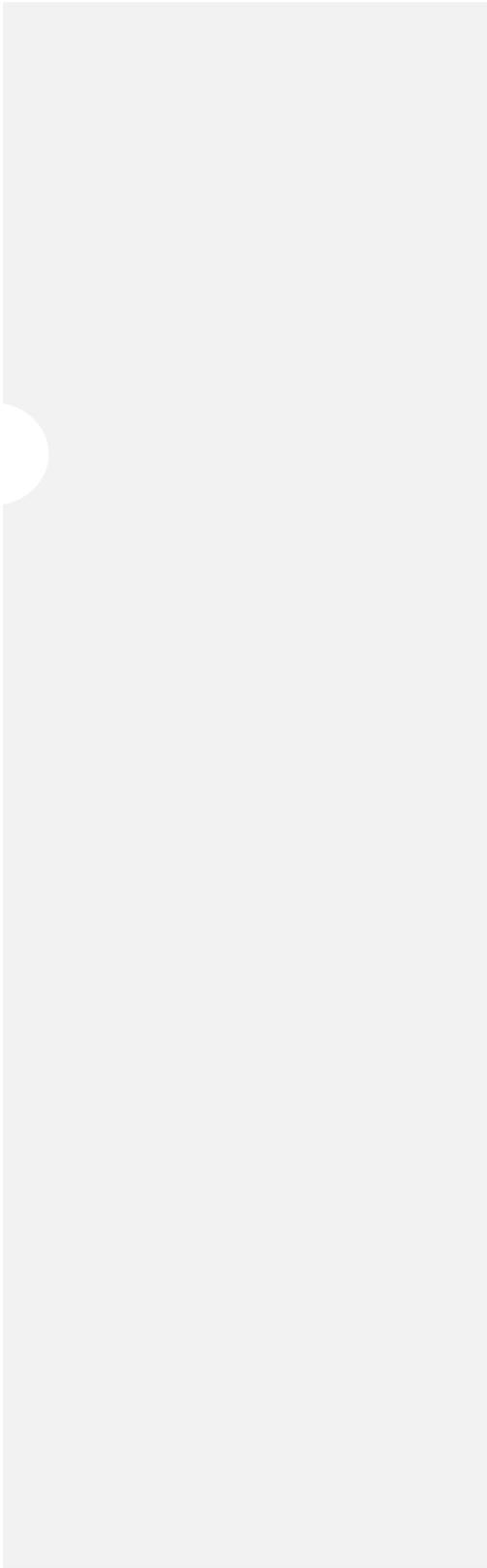
À todos os professores do programa de Pós-Graduação, meu muito obrigada.

À **Erymônica** e demais funcionários da Pós-Graduação pela ajuda nos momentos difíceis e sempre com uma solução rápida e satisfatória para todos os nossos apelos.

Aos professores e funcionários da Clínica da Graduação, quando lá fizemos nosso Estágio Docente. Aprendemos muito.

A todos que mesmo indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

meus sinceros agradecimentos



“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

RESUMO

Rodrigues SCGV. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com LED de alta intensidade mediada por eritrosina contra biofilme de *Enterococcus faecalis* [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2019.

RESUMO

Introdução: O insucesso no tratamento endodôntico deve-se a permanência de microrganismos no sistema de canais radiculares, principalmente por sua complexa anatomia. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) estão presentes na maioria dos casos de infecção persistente. Como alternativa auxiliar na desinfecção de canais radiculares, tem-se utilizado a Terapia Fotodinâmica (TFD). Objetivo: Avaliar o efeito da TFD com eritrosina usando *light emitting diodes* (LED) azul de alta intensidade em canais radiculares contaminados com biofilme de *E. faecalis*. Métodos: 50 canais unirradiculares de dentes humanos foram preparados e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. Os dentes foram divididos em quatro grupos para tratamento (n=10): Irradiação com LED somente (L+E-), LED irradiado na presença de eritrosina 50µM (L+E50), LED irradiado na presença de eritrosina 100µM (L+E100), LED irradiado na presença de eritrosina 200µM (L+E200), e dois grupos controle positivo (n=5) e negativo (n=5). Cinco minutos foi o tempo de pré-irradiação e um minuto para a radiação. Foram realizadas coletas antes e logo após o tratamento, e contadas as unidades formadoras de colônias (log UFC mL⁻¹). Os dados foram submetidos ao teste de Wilcoxon para avaliar se as reduções foram significativas. Resultado: As reduções log UFC mL⁻¹ foram de 0,22 para L+E-, 0,39 para L+E50, 0,65 para L+E100 e 1,04 para L+E200. Houve uma redução crescente da log UFC mL⁻¹ com o aumento da concentração de eritrosina. O efeito da TFD antimicrobiana da eritrosina na redução de *E. faecalis* foi significativo em todas as concentrações (p<0,05). Conclusão: A

eritrosina irradiada por LED de alta intensidade durante 1 minuto teve um efeito antimicrobiano na redução do biofilme de *E. faecalis*.

Descritores: Eritrosina. Terapia Fotodinâmica. *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

Rodrigues SCGV. Effect on *Enterococcus faecalis* biofilm of antimicrobial photodynamic therapy using high-intensity LED mediated by erythrosine [dissertation]. São Luís. CEUMA University; 2019.

ABSTRACT

Introduction: Failures with endodontic treatment are due to the permanency of microorganisms in the root canal system, mainly as a result of the complex anatomy. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) features in most of the cases of persistent infection. One option that has been used to help to disinfect the root canals is Photodynamic Therapy (PDT). Aim: To evaluate the effect of PDT with erythrosine using high-intensity blue light emitting diodes (LED) on root canals contaminated with *E. faecalis* biofilm. Methods: For a period of 21 days, 50 single-root canals from human teeth, were prepared and contaminated with *E. faecalis*. The teeth were divided into four groups for treatment (n=10): Irradiation using only LED (L+E-), LED irradiation with the presence of erythrosine 50µM (L+E50), LED irradiation with the presence of erythrosine 100µM (L+E100), LED irradiation with the presence of erythrosine 200µM (L+E200), and two control groups, one positive (n=5) and one negative (n=5). Five minutes was the pre-irradiation time and one minute for the radiation. Materials were collected at canals before and after treatment, and the colony forming units (log CFU mL⁻¹) were counted. The data were submitted to the Wilcoxon signed-rank test to verify if the reduction was significant. Results: The log CFU mL⁻¹ reductions were 0.22 for L+E-, 0.39 for L+E50, 0.65 for L+E100 and 1.04 for L+E200. There was a progressive reduction in log CFU mL⁻¹ with increased concentrations of erythrosine. The antimicrobial photodynamic effect of the erythrosine in reducing *E. faecalis* was significant at all concentrations (p<0.05). Conclusion: Erythrosine irradiated by high-

intensity LED for 1 minute, produced an antimicrobial effect in the reduction of *E. faecalis* biofilm.

Keywords: Erythrosine. Photodynamic Therapy. *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

LED – *Light Emitting Diodes*

UNICEUMA – Universidade CEUMA

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

TFD – Terapia Fotodinâmica

UFC – Unidade Formadora de Colônia

CFU – *Colony Forming Units*

FDA – *Food and Drugs Association*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CRT – Comprimento Real de Trabalho

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

TSb – *Tryptic Soy Broth*

TSa - *Tryptic Soy Agar*

nm – Nanômetro

μM – Micromolar

ROS – Espécie de Oxigênio Reativo

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Formação dos grupos experimentais de acordo com a aplicação de Led e fotossensibilizador.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios (desvio padrão) de log UFC mL⁻¹ nos diferentes grupos nos dois momentos de avaliação.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma

Figura 2 – Gráfico box plot

Figura 3 – Máquina de precisão de corte Isomet.....

Figura 4 – Corte do dente na máquina

Figura 5 – Verifica patência apical.....

Figura 6 – CRT

Figura 7 – Sistema rotatório Reciproc

Figura 8 – Calibração lima R40

Figura 9 – Instrumentação com rotatório

Figura 10 – Padrão de instrumentação

Figura 11 – Capela de lâmina de fluxo

Figura 12 – Coleta de *Enterococcus faecalis*

Figura 13 – Ajuste da densidade ótica

Figura 14 – Comparativo da densidade ótica

Comentado [CC1]: Vc irá colocar as paginas?

Figura 15 – Bolinha de algodão	
Figura 16 – Jarra utilizada para ambiente microaerófilo	
Figura 17 – Estufa bacteriológica	
Figura 18 – Fluxograma	
Figura 19 – Tratamento da espécimes	
Figura 20 – Aplicação da fonte de luz	
Figura 21 – Coleta da cultura nos espécimes	
Figura 22 – Colocação dos cones no tubo eppendorf	
Figura 23 – Vortex	
Figura 24 – Tubos de ensaio numerados e placas de petri especificadas	
Figura 25 – Coleta do caldo no eppendorf	
Figura 26 – Diluição nos tubos de ensaio	
Figura 27 – Coleta no tubo de ensaio	
Figura 28 – Deposição da cultura na placa	
Figura 29 – Desenho da placa	
Figura 30 – Contagem das UFCs	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS -----	20
2.1. SELEÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES UTILIZADOS --	20
2.2. CULTURA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> -----	21
2.3. METODOLOGIA PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> -----	21
2.4. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS -----	22
2.5. GRUPOS CONTROLE -----	22
2.6. METODOLOGIA DE APLICAÇÃO DO LED, TEMPO PRÉ- IRRADIAÇÃO E AGENTE FOTOSSENSIBILIZADOR-----	23
2.7. COLETAS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA-----	23
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	23
3. RESULTADOS -----	24
4. DISCUSSÃO -----	25
5. CONCLUSÃO -----	29
6. REFERÊNCIAS -----	29
7. ANEXO -----	34
7.1. METODOLOGIA DETALHADA -----	
7.2. PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA---	
7.3. NORMAS DA REVISTA: <i>PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY</i> -----	

CAPÍTULO 1

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com LED de alta intensidade mediada por eritrosina contra biofilme de *Enterococcus faecalis*.

RESUMO

Introdução: O insucesso no tratamento endodôntico deve-se a permanência de microrganismos no sistema de canais radiculares, principalmente por sua complexa anatomia. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) estão presentes na maioria dos casos de infecção persistente. Como alternativa auxiliar na desinfecção de canais radiculares, tem-se utilizado a Terapia Fotodinâmica (TFD). **Objetivo:** Avaliar o efeito da TFD com eritrosina usando *Light Emitting Diodes* (LED) azul de alta intensidade em canais radiculares contaminados com biofilme de *E. faecalis*. **Métodos:** 50 canais unirradiculares de dentes humanos foram preparados e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. Os dentes foram divididos em quatro grupos para tratamento (n=10): Irradiação com LED somente (L+E-), LED irradiado na presença de eritrosina 50µM (L+E50), LED irradiado na presença de eritrosina 100µM (L+E100), LED irradiado na presença de eritrosina 200µM (L+E200), e dois grupos controle positivo (n=5) e negativo (n=5). Cinco minutos foi o tempo de pré-irradiação e um minuto para a radiação. Foram realizadas coletas antes e logo após o tratamento, e contadas as unidades formadoras de colônias (log UFC mL⁻¹). Os dados foram submetidos ao teste de Wilcoxon para avaliar se as reduções foram significativas. **Resultado:** As reduções log UFC mL⁻¹ foram de 0,22 para L+E-, 0,39 para L+E50, 0,65 para L+E100 e 1,04 para L+E200. Houve uma redução crescente da log UFC mL⁻¹ com o aumento da concentração de eritrosina. O efeito da TFD antimicrobiana da eritrosina na redução de *E. faecalis* foi significativo em todas as concentrações

($p < 0,05$). Conclusão: A eritrosina irradiada por LED de alta intensidade durante 1 minuto teve um efeito antimicrobiano na redução do biofilme de *E. faecalis*.

Descritores: Eritrosina. Terapia Fotodinâmica. *Enterococcus faecalis*.

INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos no sistema de canais radiculares pode determinar a colonização de seus túbulos, canais acessórios, istmos e deltas apicais, dificultando a total eliminação pela instrumentação, utilização de substâncias irrigadoras e medicação intracanal (1). A permanência de microrganismos no sistema de canais radiculares, devido a falhas no processo de limpeza e desinfecção dos canais, e também a recontaminação devido selamento inadequado (2), podem ocasionar o insucesso do tratamento endodôntico (3).

A persistência das infecções endodônticas depende de características relacionadas aos microrganismos, como a capacidade que tem em se adaptar às mudanças ambientais (4). Assim, o sucesso do tratamento endodôntico está condicionado à inibição do crescimento bacteriano remanescente e evitar sua recolonização (5).

As bactérias em forma de biofilme apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos, quando comparada às formas planctônicas, uma vez que se encontram aderidas a um substrato orgânico ou inorgânico, cercado por produtos extracelulares microbianos, formando uma matriz intermicrobiana (6).

E. faecalis, bactéria aeróbia facultativa gram-positiva, faz parte da microbiota bucal normal, está presente em casos de contaminação residual (7), e já foi isolada em cerca de 60 a 90% de dentes com sintomatologia pós-tratamento endodôntico (8). Em forma de biofilme invade os túbulos, tornando-os ambientes resistentes a alguns antimicrobianos (9), e mesmo a tratamentos mecânicos seguidos de limpeza química com soluções de hipoclorito de sódio ou clorexidina, (10). Biofilme de *E. faecalis* esta fortemente associado ao retratamento endodôntico (11).

Nesse contexto, a TFD tem-se tornado um método alternativo para potencializar a desinfecção de canais radiculares (12). É considerada minimamente invasiva (13), e baseia-se no uso de um fotossensibilizador não-tóxico, sensível a um comprimento de luz específico, que produz um oxigênio reativo citotóxico a algumas espécies de microrganismos, e promove eficiente redução microbiana (14,15). Pode ocorrer através de dois processos: tipo I – com a produção de radical hidroxila pela transferência de elétron para um nível mais avançado; ou tipo II – onde ocorre a formação de oxigênio singleto pela transferência de energia (16,17).

Recentes estudos Rodig *et al.* (2017) e Pourhajibagher *et al.* (2018) (13,17) demonstraram a efetividade da TFD contra microrganismos causadores da infecção endodôntica, em especial *E. faecalis*. Entretanto, não há na literatura estudos suficientes que

comprovem a ação da eritrosina irradiada por LED no combate a esses microrganismos.

Os fotossensibilizadores frequentemente utilizados na TFD são fenotiazinas (azul de metileno e toluidina), fitalocianina (azulene), clorinas (polilisinas), porfirinas (hematoporfirinas) e xantenas (rosa de bengala, eosina e eritrosina) (14,18).

Os corantes do grupo xanteno possuem alta absorção no comprimento de onda espectral entre 500 – 550 nm, correspondendo ao comprimento de onda dos LEDs (luz azul ou verde), e representam uma fonte de luz alternativa, devido ao seu baixo custo e também baixa atividade térmica (19).

A eritrosina já é utilizada na detecção de placa dentária, portanto, aprovada para utilização intra oral (20,21), uma vez que não é tóxica ao hospedeiro, e ainda tem seu uso aprovado pela *Food and Drugs Association* – FDA. Nesse sentido, os estudos laboratoriais servem para determinar a efetividade/benefício ou não do método/procedimento utilizado em teste específico (22).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano da TFD com eritrosina usando LED de alta intensidade em canais contaminados com biofilme de *E. faecalis*. A hipótese nula testada foi que os protocolos de irradiação não reduziram a atividade bacteriana imediatamente após o tratamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e Padronização dos espécimes utilizados

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade CEUMA (UNICEUMA), sob Parecer de nº 2.868.372, foram utilizados 50 dentes humanos unirradiculados extraídos (incisivos e caninos superiores), obtidos através do termo de doação de dentes.

Todos possuíam canais retos, sem obturação endodôntica, fratura ou reabsorções internas ou externas e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Suas coroas foram seccionadas por máquina de precisão de corte Isomet 1000 (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), estabelecendo um comprimento de raiz padronizado em 13 mm (10).

Com o objetivo de confirmar a patência apical, foi realizada a exploração do canal radicular com uma lima tipo K #10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), até o comprimento real de trabalho (CRT), que foi padronizado em 12 mm para todos os dentes. A instrumentação dos canais radiculares foi realizada com o sistema Reciproc® (VDW, Munich, Germany) com instrumento R40. Para a irrigação foram utilizados 2 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%, e a aspiração realizada por meio de pontas NaviTip® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) utilizando Kit de irrigação-aspiração Ultradent® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA). Terminada a instrumentação, os canais radiculares foram irrigados com 1 mL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil)

agitado com auxílio de uma lima manual por 3 minutos, e ao final do preparo utilizou-se 3 mL de soro fisiológico para a irrigação do canal radicular. Todos foram mantidos em soro fisiológico estéril com trocas diárias durante 5 dias para remoção de hipoclorito de sódio residual. Após este período, os espécimes foram vedados apicalmente com resina composta fotopolimerizável Opallis® (FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e impermeabilizados externamente com duas camadas de verniz para unhas (Procosa Produtos de Beleza Ltda., São Paulo/SP, Brasil) exceto na região cervical. Os dentes foram novamente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Cultura de *Enterococcus faecalis*

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em ambiente asséptico, dentro da câmara de fluxo laminar (BSTec, Brasil). Culturas puras de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram reativadas em Tryptic Soy Broth – TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) por 48 horas. As bactérias foram inoculadas em placas de Tryptic Soy Agar – TSa (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas, formando uma suspensão bacteriana preparada em solução fisiológica esterilizada, com concentração equivalente a 10⁸ bactérias/mililitro, esse ajuste da densidade óptica da suspensão foi realizado por meio da Escala de Macfarland 0,5.

Metodologia para formação de biofilme de *Enterococcus faecalis*

A formação do biofilme foi realizada pela aplicação da suspensão bacteriana pura de *E. faecalis* em meio de cultura TSb até preencher completamente o canal radicular utilizando seringa descartável de 0,5 mL (Becton Dickinson, Campinas, SP, Brasil). A cada 48 horas e durante 21 dias, o meio de cultura foi reinoculado nos espécimes para formação do biofilme. A cada reposição do meio de cultura, uma bolinha de algodão estéril, foi colocada na entrada do canal radicular. Todos os espécimes foram mantidos fechados em ambiente microaerófilo e em estufa a 37° C.

Distribuição dos grupos experimentais

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com o quadro abaixo.

Grupos	Tratamento	Amostra
L+E-	Apenas LED	10
L+E50	TFD com LED e eritrosina 50 µM	10
L+E100	TFD com LED e eritrosina 100 µM	10
L+E200	TFD com LED e eritrosina 200 µM	10

Quadro 1 - Formação dos grupos experimentais de acordo com a aplicação de LED e fotossensibilizador.

Grupos controle

Para o controle positivo (n=5), os espécimes receberam apenas a contaminação pela suspensão de *E. faecalis*, e no controle negativo (n=5), receberam meio de cultura estéril.

Metodologia de aplicação do LED, tempo pré-irradiação e agente fotossensibilizador

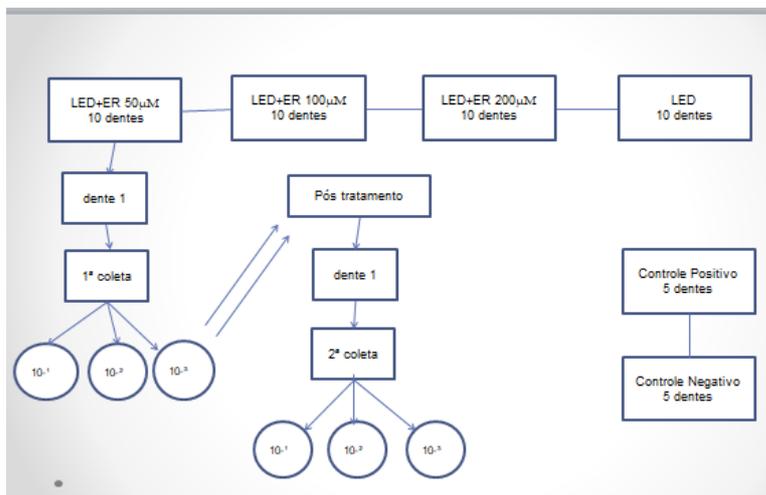
Para a realização da TFD, um mesmo operador utilizou o LED de alta intensidade (Valo, Ultradent, UT, EUA), com comprimento de onda entre 500 e 550nm, ajustado na potência *Xtra Power* (3200 mW/cm²), posicionado e acionado na entrada do canal, região cervical do dente, e foram realizadas 20 aplicações seguidas de 3 segundos cada, totalizando 1 minuto, com um depósito de energia de 192 J; a eritrosina B (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi utilizada como agente fotossensibilizador, com o tempo de pré-irradiação de 5 minutos (20).

Coletas e análise microbiológica

Em todos os grupos foram feitas duas coletas para avaliação microbiológica. A primeira foi realizada antes do tratamento e a segunda imediatamente após TFD. Ambas foram realizadas utilizando dois cones de papel absorventes estéreis #40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) após os canais radiculares terem sido previamente preenchidos com solução salina estéril. Os cones utilizados foram transferidos para tubos eppendorf de polipropileno (Cral, São Paulo / SP, Brasil) com 1,5 mL de solução salina estéril e agitados (Vortex AP 56, Phoenix, EUA) durante 1 minuto, sendo,

posteriormente, realizadas diluições decimais seriadas e semeadas em placas de petri com meio TSA em triplicata. As placas foram incubadas em microaerofilia a 37° C durante 48 horas. Os resultados foram obtidos por meio da contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL-1) e transformados em logaritmo (\log_{10} UFC/mL).

Fluxograma



Comentado [CC2]: Endodonticamente – corrigir na figura .
Sugiro tirar esse quadro azul e esse quadro com 50 dentes...deixe so o fluxograma mesmo

Figura 1 - Detalhamento da coleta microbiológica

Análise estatística

Após a constatação que os dados não apresentavam distribuição normal (Shapiro Wilk, $p < 0,01$), o teste Wilcoxon foi empregado para testar se havia diferença significativa dentro dos grupos entre a contagem de microrganismo inicial e após o

tratamento. O programa estatístico utilizado foi o SPSS 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

A figura 2 representa gráfico box plot evidenciando a mediana, valores máximos e mínimos e o intervalo interquartil de UFC/mL (\log_{10}) de acordo com os grupos avaliados.

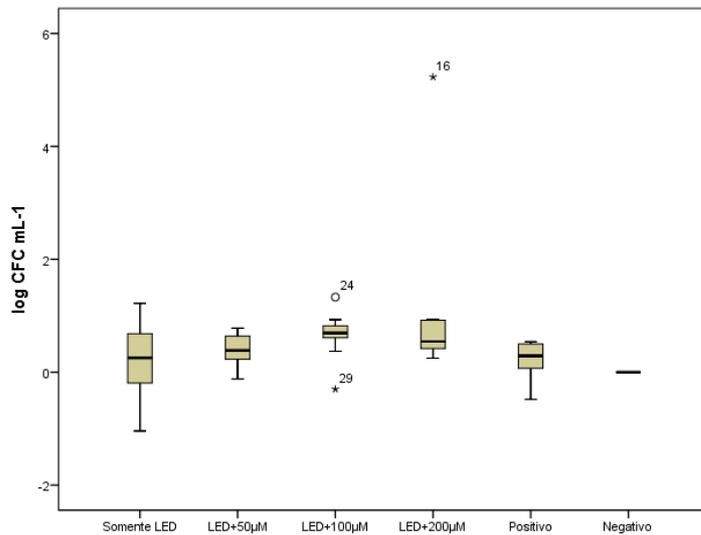


Figura 2 - Gráfico box plot mostrando o comportamento da distribuição dos valores de log UFC/mL nos diversos grupos avaliados.

A Tabela 1 mostra os valores médios (desvio padrão) de log UFC/mL dos grupos obtidos nos dois momentos de avaliação.

Houve diferença significativa entre as contagens inicial e pós-tratamento nos grupos que foram submetidos a terapia fotodinâmica com eritrosina ($p < 0,05$).

Tabela 1. Valores médios (desvio padrão) de log UFC mL⁻¹ nos diferentes grupos nos dois momentos de avaliação.

	L+E-	L+E50	L+E100	L+E200	Positivo	Negativo
Inicial	5,11 (0,47) ^A	5,32 (0,20) ^A	5,43 (0,31) ^A	5,61 (0,36) ^A	5,50 (0,46) ^A	0,00 (0,00) ^A
Pós-tratamento	4,88 (0,37) ^A	4,93 (0,30) ^B	4,78 (0,41) ^B	4,56 (1,63) ^B	5,31 (0,24) ^A	0,00 (0,00) ^A

Letras diferentes na vertical=Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A inibição do crescimento bacteriano foi percebida nos grupos que sofreram irradiação. No grupo L+E50, os valores médios da 1^a e 2^a coletas foram 5,32 e 4,93 respectivamente. O grupo L+E100 apresentou os valores 5,43 e 4,78 respectivamente. O grupo L+E200 apresentou uma diferença estatisticamente mais significativa em relação aos outros grupos, na 1^a coleta obteve 5,61 e após o tratamento 4,56. Todos os resultados foram referentes aos valores médios de log UFC mL⁻¹.

No grupo L+E-, houve uma diminuição no crescimento bacteriano, com os valores médios de 5,11 e 4,88, não se mostrando estatisticamente significativa quando comparado ao controle positivo.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a hipótese nula foi rejeitada, pois os grupos que foram tratados com eritrosina reduziram, imediatamente após a

irradiação, a quantidade de *E. faecalis* em forma de biofilme. A TFD foi eficaz em todos os grupos com concentrações diferentes de eritrosina. Porém no grupo de maior concentração (L+E200), houve maior redução bacteriana.

Esta pesquisa utilizou um LED de alta intensidade, com comprimento de onda entre 500 – 550nm, faixa de maior absorção da eritrosina, segundo o estudo de Metcalf *et al.* (2006) (23). O mesmo foi utilizado em sua potência máxima (3200mW/cm²), durante 1 minuto, entregando 192 J de energia para cada espécime. Uma dose de energia elevada se comparada ao estudo de Metcalf *et al.* (2006) (23) que entregou 6,75J de energia, sobre biofilme de *S. mutans*.

Existem cerca de 500 espécies de bactérias em infecções endodônticas (24,25), no entanto, a *E. faecalis* aparece em cerca de 77% dos casos de indicação de retratamento endodôntico (26), que crescem na maioria das vezes em forma de biofilme, o que as tornam muito mais patogênicas (24), além de apresentar maior resistência as medicações (27).

A grande diferença entre bactérias planctônicas e biofilme bacteriano, é que as primeiras flutuam livremente. No biofilme, a estrutura é altamente organizada e as bactérias ficam aderidas em uma superfície, e os microrganismos apresentam um fenótipo alterado em relação ao seu crescimento (24).

A persistência do *E. faecalis* pode ser explicada por sua capacidade em tolerar ou se adaptar a condições desfavoráveis, permanecendo em infecções mesmo após o tratamento endodôntico (28).

Existem diferentes estratégias terapêuticas endodônticas quando se trata de erradicar biofilme, dentre elas: TFD, utilização de nanopartículas antibacterianas e ozonioterapia.

A TFD pode alcançar áreas inacessíveis e ser uma alternativa satisfatória para a terapia endodôntica (25). No entanto, tem-se concluído que é incerta a completa eliminação do *E. faecalis* através da TFD (29), devido diferenças de métodos utilizados em diversas pesquisas (1,30). A revisão sistemática feita por Plotino *et al.* (2018) (30), deixou clara a necessidade de determinar parâmetros específicos e apropriados em relação ao fotossensibilizador, energia utilizada e tempo de irradiação.

O presente estudo utilizou o biofilme de *E. faecalis*, na tentativa de encontrar um protocolo eficaz no combate a infecções endodônticas persistentes pós-terapia.

Existem diversos estudos laboratoriais de TFD que utilizam biofilme bacteriano nas suas metodologias (17,22,31), porém os diferentes protocolos tornam difícil a comparação entre seus resultados. De qualquer forma, estudos tem demonstrado a eficácia da TFD frente a infecções locais (32–34).

Segundo Cieplik *et al.* (2013) (35), a TFD diminui o impacto de fatores da virulência bacteriana como formação de biofilme e na prevenção da colonização bacteriana nos canais radiculares.

Para Bacellar *et al.* (2018) (36), na TFD ocorre a geração de aldeídos lipídicos (substâncias que abrem poros nas membranas e levam ao vazamento do conteúdo da célula ou de suas organelas) o que é fundamental para a morte bacteriana, e a produção desses componentes depende do fotossensibilizador utilizado.

Nesse contexto, Mahdi *et al.* (2015) (20) mostraram a eritrosina como uma boa opção de fotossensibilizador, e ainda encontraram sua efetividade de 5 a 10 vezes maior que o azul de metileno frente biofilme de *Streptococcus mutans*. No presente estudo, utilizando a eritrosina, foi constatada a redução do biofilme do *E. faecalis*, porém não houve comparativo com o azul de metileno.

Neste estudo foram realizadas 20 aplicações seguidas de 3 segundos, totalizando 1 minuto, com máxima potência do LED azul de alta intensidade, e foi observada redução bacteriana progressiva de acordo com o aumento da concentração. No entanto, há necessidade de avaliar outros protocolos alterando parâmetros como tempo de radiação e concentração do fotossensibilizador.

O estudo de Metcalf *et al.* em 2006 (23) já havia feito esse comparativo, utilizando diferentes tempos de irradiação, fracionados por até 15 minutos. Foi observado que o fracionamento das doses

de luz branca resultou em uma maior redução de *S. mutans* comparada com irradiação contínua.

No presente estudo foram utilizadas concentrações de eritrosina de 50, 100 e 200 μM e foi observada maior redução de *E. faecalis* com o aumento da concentração utilizada. O estudo de Costa *et al.* (2011) (37) utilizou 400 μM irradiado com LED verde e obteve efeito fotodinâmico significativo frente biofilme e planctons de *Candida albicans*, e *Candida dubliniensis*. Para inibir, essas mesmas bactérias em forma planctônica, foi utilizada a eritrosina nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 e 0.78 μM .

Segundo Hoedke *et al.* (2018) (25) houve maior redução bacteriana do biofilme de multiespécies (*E. faecalis*, *Streptococcus oralis* e *Prevotella intermedia*) imediatamente após a TFD (laser diodo e cloreto de fenotiazina) quando comparado a coleta realizada 5 dias depois. Neste estudo, também houve redução significativa do biofilme bacteriano nas coletas realizadas imediatamente após os tratamentos, nos grupos que utilizaram a TFD com eritrosina. Não foram realizadas coletas em dias posteriores.

Os resultados deste estudo mostraram uma redução bacteriana no grupo que foi utilizado somente o LED, no entanto, essa redução não foi estaticamente significativa, quando comparado à coleta inicial. Por outro lado, a utilização da TFD com LED de alta intensidade e eritrosina, em todas as concentrações avaliadas, mostrou-se eficaz na redução do biofilme bacteriano de *E. faecalis*,

entretanto, em nenhum grupo houve a total eliminação das bactérias.

Estes achados estão de acordo com os trabalhos de Costa *et al.* (2011) Pereira *et al.* (2013) e Rodig *et al.* (2017) (17,37,38), que concluíram não haver efeito antibacteriano significativo quando se usa somente o LED, no entanto, Foschi *et al.* (2007) (39) afirmaram que o aumento da temperatura nos túbulos dentinários pode causar dano a bactéria.

O estudo de Dai *et al.* (2012) (40) mostrou que ocorre inativação dos microrganismos pela aplicação da luz, e segundo os autores isso se deve a produção de porfirinas endógenas que podem agir como fotossensibilizador e provocar um processo letal de auto fotossensibilização com produção de espécie de oxigênio reativo (ROS).

Segundo Xhevdet *et al.* (2014) (4), o curto tempo de irradiação pode dificultar a completa eliminação das bactérias, pela baixa concentração de ROS que dificulta a difusão do fotossensibilizador nos túbulos dentinários.

Em relação ao tempo de pré-irradiação, Pileggi *et al.* (2013) (27) utilizaram arbitrariamente 30 minutos, muito elevado para uso clínico. No presente estudo foi utilizado 5 minutos como tempo de pré-irradiação, o mesmo empregado por Pereira *et al.* (2013), Mahdi *et al.* (2015) e Tomé *et al.* (2017) (32,38,41). Esse é um tempo já considerado na literatura como efetivo para pré-irradiação.

O tempo de aplicação da luz, neste estudo, foi de 1 minuto, pois o LED utilizado foi de alta intensidade (3200mW/cm²) o que possibilitou uma grande dose de energia em um curto período de tempo, a exemplo de Romão *et al.* (2018) (42), que utilizaram um LED de alta intensidade pulsado (1200mW/cm²) com eritrosina, em um tempo curto (40 segundos) mostrando um parâmetro eficiente no controle da suspensão planctônica de *Streptococcus mutans*. E também comparando com o estudo de Borba *et al.* (2017) (43) que evidenciou inibição do crescimento bacteriano sobre uma suspensão planctônica de *E. faecalis*, utilizando eritrosina com 5 e 10 µM, nos tempos de 120 e 240 segundos irradiados com uma luz de alta potência.

Por outro lado, para Rossoni *et al.* (2010) (14), a TFD com eritrosina não foi capaz de reduzir as unidades formadoras de colônias (UFCs) de outras espécies planctônicas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae*), quando comparado ao grupo controle. Diferente do grupo que utilizou rosa de bengala, que reduziu significativamente as UFCs/ml em relação ao grupo controle, indicando sua alta toxicidade frente aos espécimes estudados.

Porém, em um estudo de Wood *et al.* (2006) (44), utilizando eritrosina (22 µM), num tempo de pré-irradiação de 15 minutos, com uma fonte de luz branca (lâmpada com filamento de tungstênio –

22,7mW/cm²), irradiando por 15 minutos, a TFD foi capaz de erradicar biofilme de *Streptococcus mutans*.

O presente estudo mostrou uma redução significativa do biofilme de *E. faecalis* com eritrosina nas concentrações 50, 100 e 200 µM ativada por uma luz azul (LED) de alta intensidade com comprimento de onda rotineiramente utilizado nos consultórios dentários (500-1500 nm).

O LED de alta intensidade foi capaz de inibir crescimento de *E. faecalis* em forma de biofilme, porém são necessários mais estudos para definir protocolos mais apurados, em virtude da quantidade de parâmetros existentes que podem ser alterados.

CONCLUSÃO

A utilização da TFD com eritrosina, nas concentrações de 50, 100 e 200 µM, utilizando LED de alta intensidade durante 1 minuto, mostrou-se eficaz na redução do biofilme bacteriano de *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soukos NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection. J Endod. 2006;32(10):979–84.
2. Wong R. Conventional endodontic failure and retreatment. Dent Clin North Am. 2004;48(1):265–89.
3. Jr JFS. Micro2. 2000;1–10. Available from: [papers2://publication/uuid/BCF59C3B-30E0-4E9D-BA18-8482005EE236](https://pubs2://publication/uuid/BCF59C3B-30E0-4E9D-BA18-8482005EE236)
4. Xhevdet A, Stubljar D, Kriznar I, Jukic T, Skvarc M, Veranic P, et

- al. The disinfecting efficacy of root canals with laser photodynamic therapy. *J Lasers Med Sci*. 2014;5(1):19–26.
5. Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. *Int Endod J*. 2011;44(4):307–13.
6. Costerton J. Bacterial Biofilms In Nature And Disease. *Annu Rev Microbiol*. 2002;41(1):435–64.
7. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006;32(2):93–8.
8. Sundqvist G, Figdor D, Endo D, Persson S. Échec Endo. 1998;85(1):86–93.
9. Love RM. 2001 년 IEJ - E faeculis 생존.pdf. 2001;399–405.
10. ———Núñez SC, Ribeiro MS, Hamblin MR, Tegos GP, Garcez AS, Jorge AOC. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2006;39(1):59–66.
11. ———~~Alves Soares JA, Maria S, Santos C Soares SMCS, Rodolfo R, Tavares RRDJ~~, Castro C De, et al. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Exploring different photodynamic therapy parameters to optimize elimination of *Enterococcus faecalis* in planktonic form. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. Elsevier; 2018;22(October 2017):127–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.03.009>
12. ———Júnior POT, Dedivitis RA, Fonseca MB, Pallota RC, Veronezi JF, Filho HF, et al. Photodynamic Therapy for Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis* . *Photomed Laser Surg*. 2008;26(3):209–13.
13. ———Pourhajibagher M, Kazemian H, Chiniforush N, Hosseini N. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. Elsevier; 2018;24(July):206–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.09.014>
14. ———Rossoni RD, Junqueira JC, Santos ELS, Costa ACB, Jorge AOC. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. *Lasers Med Sci*. 2010;25(4):581–6.

15. —Junqueira JC, Ribeiro MA, Rossoni RD, Barbosa JO, Querido SMR, Jorge AOC. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Photodynamic Antimicrobial Effects of Malachite Green on *Staphylococcus*, Enterobacteriaceae, and *Candida*. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2010;28(S1):S-67-S-72. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2009.2526>
16. —Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang C-Y, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases Bacterial elimination using conventional methods in periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2009;51:109–40.
17. —Rödig T, Endres S, Konietschke F, Zimmermann O, Sydow HG, Wiegand A. Effect of fiber insertion depth on antibacterial efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in root canals. *Clinical Oral Investigations*; 2017;1753–9.
18. —Konopka K, Goslinski T. Photodynamic Therapy in Dentistry CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE Photodynamic Therapy in Dentistry. *J Dent Res*. 2007;86(8):694–707.
19. —Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. 2017;26(12):1–23.
20. —Mahdi Z, Habiboalh G, Mahbobeh NN, Mina ZJ, Majid Z, Nooshin A. Lethal effect of blue light-activated hydrogen peroxide, curcumin and erythrosine as potential oral photosensitizers on the viability of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Laser Ther*. 2015;24(2):103–11.
21. —Costa ACBP, Rasteiro VMC, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*. 2012;55(1):56–63.
22. —Swimberghe RCD, Coenye T, Moor RJG De, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection : a literature review. 2018;1–25.
23. —Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. 2006;(May 2018):190–2.
24. —Diaz PI. Microbial Diversity and Interactions in Subgingival Biofilm Communities. 2012;15:17–40.

25. ———Hoedke D. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. 2018;23–34.
26. ———Jr FS, Ro IN. Polymerase chain reaction – based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. :85–94.
27. ———Lange N, Grad I, Wataha JC, Girard M, Bouillaguet S, Schrenzel J, et al. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;10(2):134–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2012.11.002>
28. ———Ørstavik D. V Irlence F Actors of *E Nterococcus Faecalis* : 2004;15(5):308–20.
29. ———Haider S, Dent SM, Habib K, Ph A, D FJP. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals : A systematic literature review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;10(4):632–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.07.006>
30. ———Plotino G. Photodynamic therapy in endodontics. 2018;1–15.
31. ———Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic Therapy as an Alternative Treatment for Disinfection of Bacteria in Oral Biofilms. 2012;596(June):588–96.
32. ———Mahdi Z, Sina F, Mahbobeh NN, Habiboallah G, Mina ZJ, Majid Z. Bactericidal effect of visible light in the presence of erythrosine on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* compared with diode laser, an in vitro study. *Laser Ther*. 2014;23(4):263–71.
33. ———Wilson BC, Patterson MS. The physics , biophysics and technology of photodynamic therapy The physics , biophysics and technology of photodynamic therapy. 2008;
34. ———Lee Y, Park H, Lee J, Seo H, Lee S. The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2012;4(000):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2012.63>
35. ———Cieplik F, Späth A, Leibl C, Gollmer A. endogenous photosensitizers Blue light kills *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* due to its endogenous photosensitizers. 2013;(September 2014).
36. Bacellar IOL, Oliveira MC, Dantas LS, Costa EB, Durantini

M, Cosa G, et al. Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact- Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids. 2018;

37. —Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AOC, Costa ACBP, da Silva Hashimoto ESH, de Campos Rasteiro VM, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;56(11):1299–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.05.013>

38. —Pereira CA, Costa ACBP, Carreira CM, Junqueira JC, Jorge AOC. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):859–64.

39. —Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med*. 2007;39(10):782–7.

40. —Dai T, Gupta A, Murray CK, Vrahas MS, Tegos GP, Hamblin MR. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? *Drug Resist Updat* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;15(4):223–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drup.2012.07.001>

41. —Tomé FM, Paula Ramos L De, Freire F, Pereira CA, de Oliveira ICB, Junqueira JC, et al. Influence of sucrose on growth and sensitivity of *Candida albicans* alone and in combination with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci. Lasers in Medical Science*; 2017;32(6):1237–43.

42. —Paschoal MAB, Leite HLA, Gonçalves LM, Romão IQ, Branco-de-Almeida LS, Cavalcante SIA. Effect of Combining Erythrosine with a High-Power Dental Curing Light Appliance on the Viability of a Planktonic Culture of *Streptococcus mutans*. *Photomed Laser Surg*. 2018;36(12):676–9.

43. —Sabin A, Borba ASMM, Maria S, Cavalcante M, Borba M, Aurélio M, et al. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Photodynamic therapy with high-power LED mediated by erythrosine eliminates *Enterococcus faecalis* in planktonic forms. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. Elsevier; 2017;19(July):348–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.07.007>

44. —Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. 2006;(February):680–4.

ANEXOS

ANEXO 1 - METODOLOGIA DETALHADA

1.1 - Seleção e Padronização dos espécimes utilizados

Este estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Ceuma (São Luís, Brasil) sob o número de parecer 2.868.372 (anexo 1). Foi dispensada a apresentação do Termo de Doação dos Dentes.

Após aprovação, foram selecionados 50 dentes humanos unirradiculados extraídos (incisivos e caninos superiores). Todos possuíam canais retos, sem obturação endodôntica, fratura ou reabsorções internas ou externas. Os dentes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Suas coroas foram seccionadas por máquina de precisão de corte Isomet 1000 (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), estabelecendo um comprimento de raiz padronizado em 13 mm (10).



Figura 3 - máquina de precisão de corte Isomet

Figura 4 – corte do dente na máquina

Com o objetivo de confirmar a patência apical, foi realizada a exploração do canal radicular com uma lima tipo K #10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), até o comprimento real de trabalho (CRT), que ficou em 12 mm para todos os dentes.



Figura 5 – verifica patência apical



Figura 6 – CRT

A instrumentação dos canais radiculares foi realizada com o sistema

rotatório Reciproc® (VDW, Munich, Germany) com uso da lima R40.



Figura 7 - Sistema Rotatório Reciproc® (VDW, Munich, Germany)



Figura 8 – calibração lima R40



Figura 9 – instrumentação com rotatório



Figura 10 – padrão de instrumentação

Para a irrigação foram utilizados 2 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%, e a aspiração realizada por meio de pontas NaviTip® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) utilizando Kit de irrigação-aspiração Ultradent® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA). Terminada a instrumentação, os canais radiculares foram irrigados com 1 mL de EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil), agitado com auxílio de uma lima manual por 3 minutos, e ao final do preparo utilizou-se 3 mL de soro fisiológico para a irrigação do canal radicular.

Os dentes foram mantidos em soro fisiológico estéril com trocas diárias durante 5 dias para remoção de hipoclorito de sódio residual. Após este período, todos os espécimes foram vedados apicalmente com resina composta fotopolimerizável Opallis® (FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e impermeabilizados externamente com duas camadas de verniz para unhas (Procosa Produtos de Beleza Ltda., São Paulo/SP, Brasil) exceto na região

cervical. Os dentes foram novamente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

1.2- Cultura de *Enterococcus faecalis*

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em ambiente asséptico, dentro da câmara de fluxo laminar (BSTec, Brasil)

Culturas puras de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram reativadas em Tryptic Soy Broth – TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) por 48 horas. As bactérias foram inoculadas em placas de Tryptic Soy Agar – TSa (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas, formando uma suspensão bacteriana preparada em solução fisiológica esterilizada, com concentração equivalente a 10⁸ bactérias/mililitro, esse ajuste da densidade óptica da suspensão foi realizado por meio da Escala de Macfarland 0,5.



Figura 11 – Capela de lâmina de fluxo

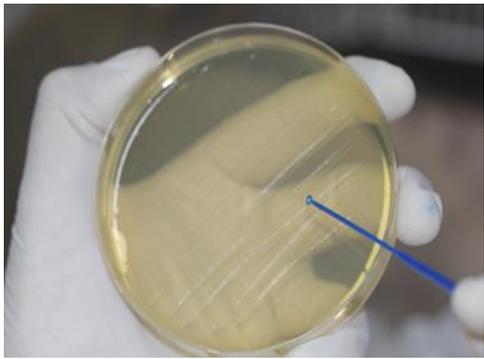


Figura 12 – coleta de *E. faecalis*

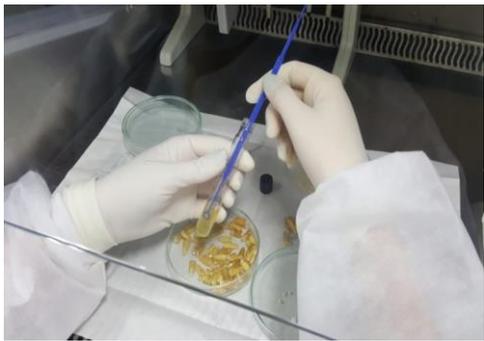


Figura 13 – ajuste da densidade ótica

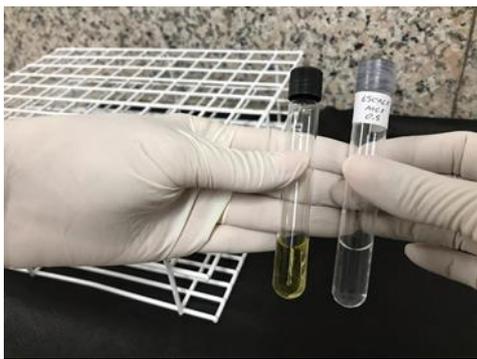


Figura 14 – comparativo da densidade com Escala de Macfarland 0,5

1.3 - Metodologia para formação de biofilme de *Enterococcus faecalis*

A formação do biofilme foi realizada pela aplicação da suspensão bacteriana pura de *E. faecalis* em meio de cultura TSb até preencher completamente o canal radicular utilizando seringa descartável de 0,5 mL (Becton Dickinson, Campinas, SP, Brasil). A cada 48 horas e durante 21 dias, o meio de cultura foi reinoculado nos espécimes para formação do biofilme.

A cada reposição do meio de cultura, uma bolinha de algodão estéril, foi colocada na entrada do canal radicular. Todos os espécimes foram mantidos fechados em ambiente microaerófilo e em estufa a 37° C.



Figura 15 – bolinha de algodão

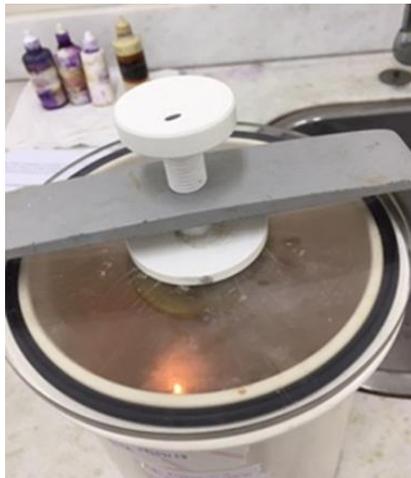


Figura 16 – jarra utilizada para ambiente microaerófilo



Figura 17 – estufa bacteriológica a 37°C

1.4 - Distribuição dos grupos experimentais

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com o quadro abaixo.

Grupos	Tratamento	Amostra
L+E-	Apenas LED	10
L+E50	TFD com LED e eritrosina 50 µM	10
L+E100	TFD com LED e eritrosina 100 µM	10
L+E200	TFD com LED e eritrosina 200 µM	10

Quadro 1. Formação dos grupos experimentais de acordo com a aplicação de LED e fotossensibilizador.

1.5 - Grupos Controle

No Controle Positivo (n=5), os espécimes receberam apenas a contaminação pela suspensão de *E. faecalis*, e no Controle Negativo (n=5), receberam meio de cultura estéril.

1.6 - Metodologia de aplicação do LED, tempo pré-irradiação e agente fotossensibilizador

Para a realização da terapia fotodinâmica, um mesmo operador utilizou o LED de alta intensidade (Valo, Ultradent, UT, EUA), com comprimento de onda entre 500 e 550nm, ajustado na potência *Xtra Power* (3200 mW/cm²), posicionado e acionado na entrada do canal, região cervical do dente, e foram realizadas 20 aplicações seguidas

de 3 segundos cada, totalizando 1 minuto, totalizando um depósito de energia de 192J; a eritrosina B (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi utilizada como agente fotossensibilizador, com o tempo de pré-irradiação de 5 minutos (32).

1.7 - Coletas e análise microbiológica

Em todos os grupos foram feitas duas coletas para avaliação microbiológica. A primeira foi realizada antes do tratamento e a segunda imediatamente após a terapia fotodinâmica. Ambas foram realizadas utilizando dois cones de papel absorventes estéreis #40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) após os canais radiculares terem sido previamente preenchidos com solução salina estéril.

1.8 - Fluxograma

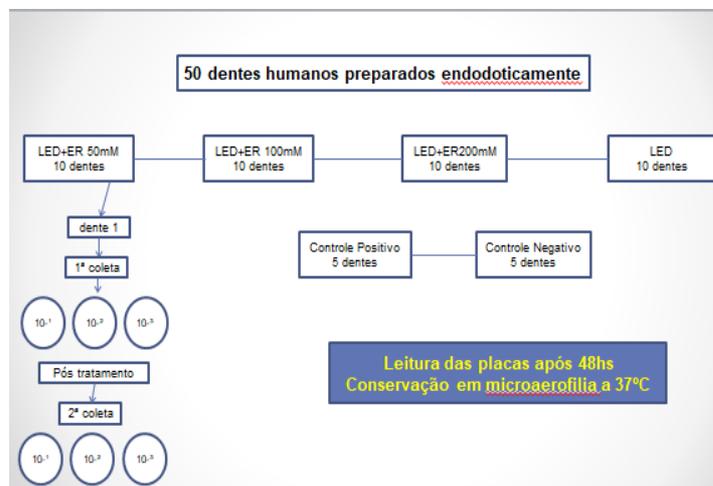


Figura 18 - Detalhamento da coleta microbiológica.

Em cada grupo, os espécimes sofreram duas coletas em triplicata.

As diluições foram em 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

Cada grupo de tratamento, com 10 espécimes, apresentava uma diluição diferente da eritrosina: LED+ER 50 μ M, LED+ER 100 μ M, LED+ER 200 μ M e o grupo tratado somente com o LED. Os grupos controle tinham 5 espécimes.

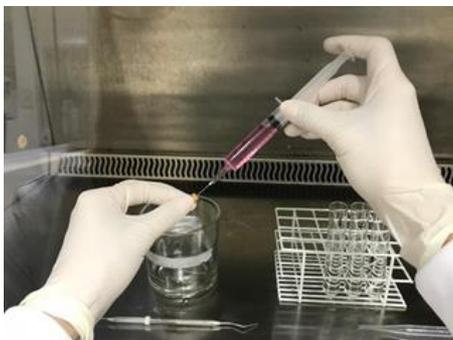


Figura 19 – preenchimento do canal radicular com o fotossensibilizador (eritrosina).

Após a colocação da eritrosina, o tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos.



Figura 20 – aplicação da fonte de luz

LED azul de alta intensidade aplicado na cervical dos dentes. Feitas 20 aplicações de 3 segundos cada, totalizando 1 minuto de irradiação.

Foram utilizados 2 cones de papel absorvente (#40) para a coleta nos espécimes. Eles foram transferidos para tubos eppendorf de polipropileno (Cral, São Paulo/SP, Brasil) com 1,5 mL de solução salina estéril e agitados (Vortex AP 56, Phoenix, EUA) durante 1 minuto.



Figura 21 – coleta da cultura nos espécimes



Figura 22 – colocação dos cones no tubo eppendorf



Figura 23 – Vortex AP 56

Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas e semeadas em placas de petri com meio TSA (Difco, Detroit, MI, EUA) em triplicata.

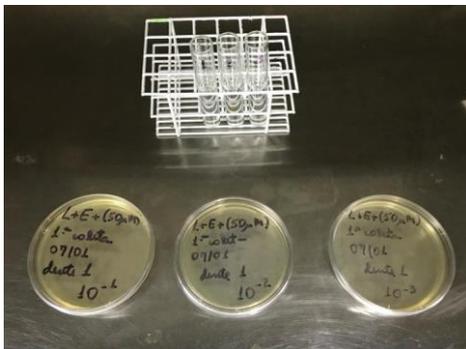


Figura 24 – tubos de ensaio numerados e placas de petri especificadas.

O tubo de ensaio nº 1 corresponde a placa com a diluição 10⁻¹, o tubo nº 2 corresponde a placa com a diluição 10⁻² e o tubo nº 3 corresponde a placa com a diluição 10⁻³.

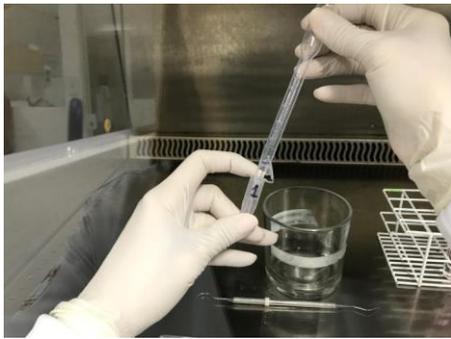


Figura 25 – coleta de 1ml do material após o vortex.



Figura 26 – diluição nos tubos de ensaio

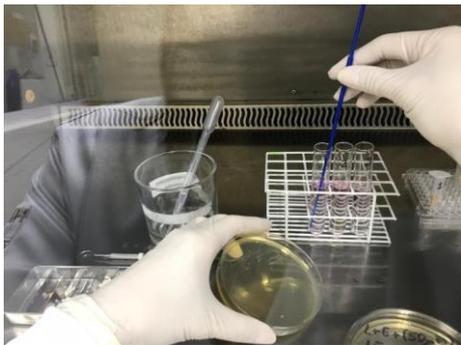


Figura 27 – coleta no tubo de ensaio para confecção da placa.

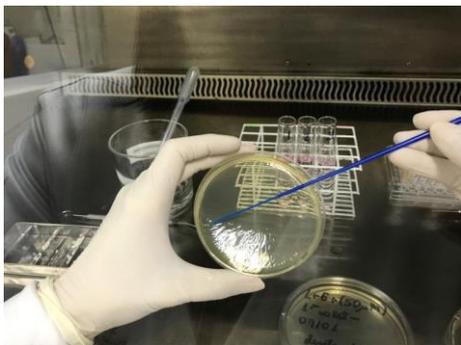


Figura 28 – deposição da cultura de *E. faecalis* na placa.

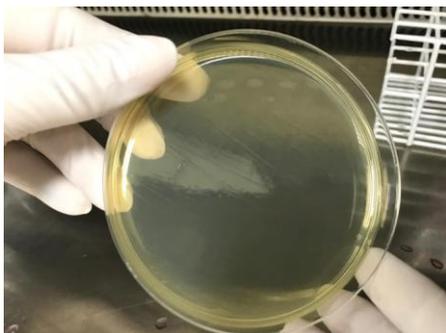


Figura 29 – desenho da placa.

As placas foram incubadas em microaerofilia a 37° C durante 48 horas. Os resultados foram obtidos por meio da contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹) e transformados em logaritmo (log₁₀ UFC/mL).



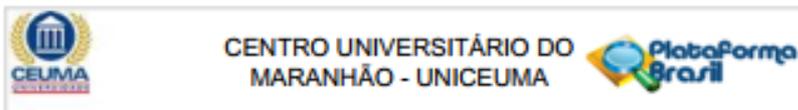
Figura 30 – contagem das UFCs.

1.9 - Análise estatística

Após a constatação que os dados não apresentavam distribuição normal (Shapiro Wilk, $p < 0,01$), o teste Wilcoxon foi empregado para testar se havia diferença significativa dentro dos grupos entre a contagem de microrganismo inicial e após o tratamento.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5%.

ANEXO 2: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Terapia fotodinâmica antimicrobiana com laser e led mediada por eritrosina e azul de metileno no combate de *Enterococcus faecalis* em forma de biofilme

Pesquisador: SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 96078618.3.0000.5084

Instituição Proponente: Centro Universitário do Maranhão - UNICEUMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.868.372

Apresentação do Projeto:

Introdução: A grande dificuldade de obter sucesso no tratamento endodôntico deve-se a permanência de microrganismos no sistema de canais radiculares, justificado por sua complexa estrutura anatômica. *Enterococcus faecalis* esta presente na maioria dos casos de contaminação residual, e é a bactéria geralmente relacionada ao insucesso do tratamento endodôntico. Dessa forma, na busca de alternativas para maximizar essa

descontaminação, tem-se utilizado a terapia fotodinâmica, como um método alternativo para a desinfecção de canais radiculares. **Objetivo:** Esperamos que o uso da eritrosina e do azul e metileno como fotossensibilizadores, ativados por laser de baixa potência, e por LED, apresente uma ação antimicrobiana maior que as medicações atualmente utilizadas no arsenal endodôntico. **Materiais e Métodos:** Serão utilizados 90 dentes humanos unimadulares extraídos, os quais serão instrumentados e irrigados. Os procedimentos microbiológicos serão realizados em ambiente

asséptico. As bactérias serão inoculadas e incubadas em microaerofilia a 37 °C por 24 horas. Serão oito grupos experimentais: um somente com uso da eritrosina, outro somente com uso do azul de metileno, outro apesar com aplicação do LED, outro apenas com aplicação do Laser, outro com TFD (terapia fotodinâmica) com LED e eritrosina, outro com TFD com LED e azul de metileno, outro com TFD com Laser e eritrosina, outro com TFD com Laser e azul de metileno. Haverá dois grupos controle, um positivo (n=5) onde os espécimes receberão somente a contaminação pela suspensão de *E. faecalis*, e outro negativo (n=5) apenas com meio de cultura estéril. O Laser será

Endereço: DOS CASTANHEIROS
Bairro: JARDIM RENASCENÇA CEP: 65.075-130
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3214-4212 E-mail: cep@ceuma.br



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA



Continuação do Parecer: 1.008.372

acionado utilizando uma fibra ótica dentro do canal. Será aplicado o teste Anova One Way com post hoc de Tukey para verificar se haverá diferença significativa entre os grupos experimentais. O programa de análise estatística utilizado será o SPSS 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA), com nível de significância 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Testar a eficácia da terapia fotodinâmica, utilizando os corantes eritrosina e azul de metileno irradiados por laser de baixa potência e LED sobre *Enterococcus faecalis*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Em se tratando de um estudo laboratorial os riscos seriam oriundos das etapas laboratoriais durante manipulação dos dentes e confecção dos espécimes. No entanto, medidas como utilização de EPI como máscara, gorro, luva e óculos são importantes e serão utilizados em todas as etapas.

Benefícios: Este estudo pretende avaliar uma alternativa viável e nova na descontaminação dos canais radiculares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa relevante diante da situação que se encontra devido ao aumento da resistência aos antibióticos e uma alternativa que requer prática por parte dos profissionais mas com sua significância ao longo prazo

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentam-se em conformidade (466/12) inclusive a carta de pendências foi enviada devida atualizada conforme solicitado anteriormente

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá apresentar a este cep relatório final da pesquisa

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1109671.pdf	15/08/2018 15:41:29		Aceito

Endereço: DOS CASTANHEIROS
Bairro: JARDIM RENASCENÇA CEP: 65.075-120
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3214-4212 E-mail: cep@ceuma.br



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA



Continuação do Parecer: 1.818.372

Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_detalhado.docx	15/08/2018 14:54:40	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito
Investigador				
Cronograma	Cronograma.docx	15/08/2018 14:48:06	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito
Outros	pendencia.docx	15/08/2018 14:42:48	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	15/04/2018 00:12:19	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_de_TCLE.pdf	14/04/2018 23:58:31	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_Silvana.pdf	14/04/2018 19:41:30	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Silvana.pdf	14/04/2018 18:58:03	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 02 de Setembro de 2018

Assinado por:
RUDYS RODOLFO DE JESUS TAVAREZ
(Coordenador)

Endereço: DOS CASTANHEIROS
Bairro: JARDIM RENASCENÇA CEP: 65.075-130
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3214-4212 E-mail: cap@ceuma.br

ANEXO 3: NORMAS DA REVISTA: *PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY*

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 1572-1000

DESCRIPTION

Official Journal of the European Platform for Photodynamic Medicine

Affiliated with the International Photodynamic Association

Also affiliated with the British Medical Laser Association and the Polish Society for Photodynamic Medicine

INDEXED in MEDLINE/PubMed, SciSearch/Science Citation Index Expanded, Current Contents/Clinical Medicine.

Aims and Scope:

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of **Photodiagnosis** and **Photodynamic Therapy** in all medical specialties. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer-review process.

AUDIENCE

Professionals in all medical disciplines with an interest in medical and biological applications of lasers and light sources, and photodiagnosis/photodynamic therapy in the treatment of human disease.

IMPACT FACTOR

2017: 2.895 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents / Clinical Medicine

Journal Citation Reports - Science Edition

SciSearch/Science Citation Index Expanded

Scopus

ScienceDirect

National Library of Medicine

Medline/Index Medicus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

R. Allison, 21st Century Oncology, Greenville, North Carolina, USA

Emeritus Editor

K. Moghissi, Yorkshire Laser Centre, Goole, UK

Associate Editors

H. Barr, Gloucester, UK

R. Boyle, Hull, UK

K. Dixon, Goole, UK

M. Eljamel, Lanark, UK

L. Freitag, Hemer, Germany

K. Furukawa, Tokyo, Japan

R. Hamblin, Boston, Massachusetts, USA

C. Hopper, Bromley, UK

Z. Huang, Lakewood, Colorado, USA

H. Kato, Tokyo, Japan

T. Mang, Orchard Park, New York, USA

H. Moseley, Dundee, UK

L. Turnbull, Hull, UK

H. Walt, Zurich, Switzerland

H. Wolfson, Jacksonville, Florida, USA

Editorial Board

M. Adamek, Katowice, Poland

A. Akopov, St. Petersburg, Russian Federation

D. Allan, Manchester, UK

E. Allan, Knutsford, UK

P. Barber, Dundee, UK

A. Batlle, Buenos Aires, Brazil

K. Berg, Oslo, Norway

G. Downie, Mount Pleasant, Texas, USA

R. Fekrazad, Tehran, Iran

L. Gasparyan, Helsinki, Finland

G. Gasser, Zurich, Switzerland

P. Hillemanns, Hannover, Germany

T. Horvath, Brno, Czech Republic

S. Ibbotson, Dundee, UK

P. Jichlinski, Lausanne, Switzerland

A. Juzeniene, Oslo, Norway

N. Kashef, Tehran, Iran

H. Kostron, Innsbruck, Austria

S. Ledcire, Rouen, France

M. Leroy, Suresnes, France

L. Li, Guangzhou, China

A. Makela, Helsinki, Finland

S. Mordon, Loos, France

T. Nakamura, Tochigi, Japan

D. Robinson, Rotterdam, Netherlands

P. Ross, Columbus, Ohio, USA

A. Sieron, Bytom, Poland

W. Stummer, Munster, Germany

I.B. Tan, Amsterdam, Netherlands

A. Thorpe, Leeds, UK

R. Waideich, Munich, Germany

M. Wainwright, Liverpool, England, UK

X. Wang, Shanghai, China

A. Woong-Shick, Kangnam, The Republic of Korea

P. Ziolkowski, Wroclaw, Poland

INTRODUCTION

Scope

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of Photodiagnosis and Photodynamic Therapy in all medical specialties. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer review process.

Types of manuscript

Research Papers should report original clinical studies or research not previously published or being considered for publication elsewhere. Work in Progress may also be submitted. See below for the standard layout. Submission of a manuscript to this journal gives the publisher the right to publish that paper if it is accepted. Manuscripts may be edited to improve clarity and expression.

Review articles, including institutional reviews of recent developments are welcome, and will undergo peer review. Reviews should have an abstract of up to 250 words.

Editorials

Although most Editorials in the journal are commissioned, authors may contact the Editor-in-Chief to request submission of their own Editorial.

Correspondence. Readers are encouraged to write about any topic that relates to photodiagnosis or photodynamic therapy, clinical, scientific, educational, social or economic. Letters should be no longer than 500 words and may include discussions on material previously printed in the Journal.

Case report will be considered if formatted as a research letter with 2 figures maximum. Maximum length is up to 1000 words with up to 6 references and 2 tables or figures. There should be no Abstract and no headings.

Short Communications should not exceed 1000 words and should consist of a background section (not to exceed 100 words), aims (not to exceed 50 words), methods (not to exceed 250 words), results (not to exceed 250 words) and conclusion (not to exceed 250 words). An abstract of 150-200 words should also be provided. The editorial team reserves the right to decide which tables/figures submitted are necessary.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our Information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see [Multiple, redundant or concurrent publication](#) for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see [Multiple, redundant or concurrent publication](#) for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the [corresponding author](#): (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports [responsible sharing](#)

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

• Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).

• No open access publication fee payable by authors.

• The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

• Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

• A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees who are willing to review the article (please obtain confirmation from the referees before submitting your manuscript). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Revised version of the manuscript

On the basis of the comments of the referees and editors, Authors may be asked to revise their manuscript. In order to facilitate the evaluation of the revisions by the referees and editors, upon revision, Authors are asked:

- to indicate all changes to the original manuscript by means of 'track changes'
- to add a letter for the referees, explaining how they dealt with all of the recommendations and questions from the referees. Authors should submit their revised version no later than 9 months after they were informed about the decision that the manuscript needs revision. If no revised manuscript is received 9 months after the decision, the manuscript will be considered as rejected.

PREPARATION

Style

Please use no abbreviations. Headlines and Subheadlines should be liberally employed in the Methods, Results, and Discussion sections. Use short paragraphs whenever possible. Clarity of expression, good syntax and the avoidance of medical jargon will be appreciated by the editors, reviewers and readers.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Open access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- o Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- o An open access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- o Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<https://www.elsevier.com/access>)
- o No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. <https://www.elsevier.com/fundingbodies>

If you need to comply with your funding body policy you can apply for the CC-BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **USD 2,500** excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>

Layout of manuscript

Divide the manuscript into the following sections: Title page, Structured Abstract, Key words (3-6), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References. The editors will consider the use of other sections if more suitable for certain manuscripts.

Essential title page information

• **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

The **Structured Abstract**, of no more than 250 words, should be written with particular care since this will be the only part of the article studied by some readers. The preferred subheadings are: Background, Methods, Results and Conclusions.

The **Introduction** should be brief and set out the purposes for which the study has been performed along with relevant previous studies only where essential.

The **Materials and Methods** should be sufficiently detailed so that readers and reviewers can understand precisely what has been done without studying the references directly. The description may be abbreviated when well accepted techniques are used.

The **Results** should be presented precisely. Keep discussion of their importance to a minimum in this section of the manuscript.

The **Discussion** should directly relate to the study being reported. Do not include a general review of the topic.

Tables should be typed with double spacing and each should be on a separate sheet. They should be numbered consecutively with Arabic numerals, and contain only horizontal lines. Provide a short descriptive heading above each table with footnotes and/or explanations underneath.

Figures should ideally be submitted in high-resolution TIF format, or alternatively in GIF, JPEG/JPG, or EPS format. The figures should be placed in separate files, named purely with the figure numbers (e.g. "Figure1.tif"). The cost of colour figures will be paid by the author.

Legends for Figures should be typed with double-spacing on a separate sheet.

Gene Accession Numbers

For each and every gene accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. Example: (GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Supplementary data

The journal accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;

-
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/photodiagnosis-and-photodynamic-therapy>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Ogiuro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking](#) page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals](#) page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Process of submission

Online submission

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy uses an online submission and review system. Authors can upload their article via the Elsevier Editorial System at <https://www.evise.com/profile/api/navigate/PDPDT>. By accessing the website Authors will be guided stepwise through the uploading of the various files. Editable file formats are necessary. We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Figure files (TIFF, EPS, JPEG) should be uploaded separately. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used. The system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary. For assistance please visit our [Support Center](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from [Frequently Asked Questions](#) to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).