

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE
MEDIADA POR AZUL DE METILENO CONTRA BIOFILME
DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

THIAGO QUIRINO MOTA DA SILVA

THIAGO QUIRINO MOTA DA SILVA

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE
MEDIADA POR AZUL DE METILENO 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: Prof^a. Dr^a Ceci
Nunes Carvalho

SÃO LUÍS – MA

2019

Axxxxp

Silva, Thiago Quirino Mota.

Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com laser de baixa intensidade mediada por Azul de Metileno contra biofilme de *Enterococcus faecalis* / Thiago Quirino Mota da Silva – São Luís: UNICEUMA, 2019.

70f.; 30 cm.

Monografia (Graduação) – Curso de Odontologia. Universidade CEUMA, 2019.

1. Azul de Metileno. 2. Terapia Fotodinâmica 3. *Enterococcus faecalis*
I. FILHO, Etevaldo Matos Maia. (Orientador). II. BANDÉCA, Matheus Coelho.(Coordenador). II. Título.

CDU: xxx.xxx

Nome: Thiago Quirino Mota da Silva

Título: Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com laser de baixa intensidade mediada por Azul de Metileno 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. Ceci Nunes Carvalho

Instituição: UNICEUMA

Assinatura: _____

Prof. Dr. Darlon Martins Lima

Instituição: UFMA

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus e à Nossa Senhora da Conceição por terem me permitido seguir neste caminho, não somente de flores, mas também de obstáculos, muitas vezes difíceis de serem superados, porém vencidos. Por terem me dado saúde física e psicológica para aguentar as provações a que fui submetido nestes anos e por terem me dado forças para nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais, Arthur Quirino da Silva Neto e Maria de Fátima Mota da Silva, meus maiores incentivadores, que me deram sempre os melhores ensinamentos da vida e entre eles que a educação é, sem dúvidas, a maior riqueza que podemos adquirir. Serão sempre meus eternos mestres.

À minha amada esposa, Walkyria Pereira Bonfim Quirino, por ser esta mulher guerreira, batalhadora e incentivadora. Por estar sempre caminhando ao meu lado nas realizações, nas alegrias da vida, assim também como nos momentos mais difíceis.

À minha querida irmã Amanda Mota da Silva, exemplo de superação e determinação por me ensinar que a vida é feita de escolhas, nem sempre corretas, mas que servem de lição e aprendizagem para toda a vida.

Ao meu filho, Thiago Quirino Bonfim Júnior, tesouro maior que tenho nesta vida e que farei sempre o possível e o impossível para lhe dar os melhores ensinamentos, amor e carinho que um filho merece.

Para vocês e por vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, o Autor da Vida, toda glória por essa conquista e gratidão pelas pessoas que colocou em meu caminho. Por ter me mostrado que o propósito da minha vida vai além das realizações pessoais. Todas as coisas começam nele e nele encontram seu propósito.

Ao meu orientador Professor Doutor **Etevaldo Matos Maia Filho**, por ser o idealizador deste trabalho, por acreditar no meu potencial e pelas conversas motivadoras. Agradeço ainda, pela disponibilidade em me ajudar e corrigir sempre que necessário. Acredito que cada correção contribuiu de forma significativa para o meu crescimento durante este período. Obrigado pela oportunidade de ter aberto (ou descortinado) as portas antes mesmo da conclusão do programa de mestrado na minha carreira profissional.

À minha co-orientadora professora Doutora **Ceci Nunes Carvalho**; obrigado por todo o conhecimento transmitido durante o curso e por ter contribuído de forma significativa para a execução desta pesquisa.

A todos os professores do **Mestrado em Odontologia Integrada da Universidade CEUMA** que, de forma singular, contribuíram para minha formação profissional. Obrigado pelo conhecimento transmitido, pelas críticas construtivas a cada trabalho executado que, mesmo sendo tão temidas pelos alunos, são de

imensa importância para o aperfeiçoamento profissional. Obrigado pela motivação a cada módulo, pelo estímulo para ser melhor, a refazer sempre que necessário e não ter medo de tentar outra vez.

Minha gratidão aos funcionários deste programa, em especial a **Erymônica** pela disponibilidade em auxiliar nos muitos pedidos que eu fazia. Obrigado por todas as documentações impressas e pela motivação durante este processo.

À Professora Doutora **Tânia Maria Gaspar Novais**, do Departamento de Farmácia da UNICEUMA, por todo o conhecimento compartilhado, pela revisão desta pesquisa e por ter me dado o privilégio de aprender um pouco mais sobre microbiologia; 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 desta pesquisa e pela agradável recepção durante o desenvolvimento das atividades de pesquisa deste trabalho.

Aos professores Doutores **Cyrene Piazero Silva Costa** e **Rudys Rodolfo de Jesus Tavares** e alunos da **Graduação em Odontologia do CEUMA** pelo conhecimento compartilhado durante o estágio docente na clínica escola. Aprendemos muito.

À minha querida avó e matriarca **Illuminata Martins Mota**; aos meus familiares e amigos **Alex, Alessandra, Ana, Lene, Neto, Luciana, Cíntia, Cleomar, Lucas, Miguel** que no convívio do dia a dia podem passar um pouco despercebidos mas nunca esquecidos

em todos os momentos de alegrias, tristezas e principalmente vitórias;
pela companhia, amizade, torcida e abraços amorosos.

À amiga que levarei para toda vida **Silvana Cristina Gama Vaz Rodrigues**, com apelido carinhoso de (minha dupla), por todos os momentos de aprendizagem e superação, nem sempre fáceis, mas conquistados em conjunto.

À querida amiga **Marcélia** por todos ensinamentos durante toda essa caminhada.

À colega de profissão, **Isabel Alessandra Miranda Nunes**; aos acadêmicos de odontologia **Raquel Farias Fernanda**, **Patrick Pereira Garcia** e **Maydson Moreira Gomes** pela fundamental ajuda na realização da etapa laboratorial desta pesquisa.

Aos amigos de mestrado **Bruna, Camila, Daniella, Daniel, Gustavo, Lucas, Rosyara, Samuel, Lucila, Paulo, Cláudio e Silvana** sendo estes quatro últimos a famosa (turma do cuscuz), que sempre estiveram dispostos a me ajudar. Foram companheiros em busca de um objetivo comum e se tornaram amigos para toda a vida. **Juntos somos mais fortes**. Vocês foram fundamentais em todos os momentos.

Aos anônimos quem em silêncio oraram por mim e de forma singular contribuíram para essa conquista.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

“Todo efeito inteligente tem em sua consequência também uma causa inteligente”.

Stephen Hawking

Silva TQM. Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com laser de baixa intensidade mediada por Azul de Metileno contra biofilme de *Enterococcus faecalis* [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2019.

RESUMO

Introdução: O insucesso no tratamento endodôntico deve-se principalmente à permanência de microrganismos no sistema de canais radiculares, devido a 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 a eficácia da TFD, utilizando o corante azul de metileno (AM) em diferentes concentrações, irradiado por Laser de baixa intensidade, em canais radiculares contaminados com biofilme de *E. faecalis*. **Materiais e Métodos:** Cinquenta dentes de humanos com canais unirradiculares foram instrumentados e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. Os dentes foram divididos em cinco grupos (n=10): Irradiação com Laser somente (L+AM-), Laser com AM 50µM (L+AM50), Laser com AM 100µM (L+AM100), Laser com AM 200µM (L+AM200), e 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 microbiológicas antes e logo após a TFD, e contadas as unidades formadoras de colônias (log UFC mL⁻¹). O teste T de Student para amostras pareadas foi empregado para testar se havia diferença significativa dentro dos grupos, enquanto a Anova One Way foi utilizada para testar se houve diferença significativa das reduções entre os grupos. **Resultados:** As reduções log CFC mL⁻¹ foram de 0,16 para L+AM-, 0,27 para L+AM50, 0,39 para L+AM100 e 0,45+AM200. O efeito da TFD antimicrobiana com o azul

de metileno na redução de *E. faecalis* foi significativo em todas as concentrações ($p < 0,05$), no entanto, não houve diferença significativa entre as concentrações ($p > 0,05$). **Conclusão:** A TFD com azul de metileno irradiada por Laser por 1 minuto, teve um efeito antimicrobiano na redução do biofilme de *E. Faecalis* nos canais radiculares.

Palavras-chave: Azul de Metileno, Terapia Fotodinâmica, *Enterococcus faecalis*.

Silva TQM. Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy with low intensity laser mediated by Methylene Blue against *Enterococcus faecalis* biofilm [dissertation]. São Luís, CEUMA University; 2019.

ABSTRACT

Introduction: Failure in endodontic treatment is mainly due to the permanence of microorganisms in the root canal system, due to its complex anatomy. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) are present in most cases of persistent infection. As an alternative to disinfect root canals, Photodynamic Therapy (PDT) has been used. **Purpose:** To evaluate the efficacy of PDT using methylene blue (MB) dye at different concentrations, irradiated by low intensity laser, in root canals contaminated with *E. faecalis* biofilm. **Materials and Methods:** Fifty human teeth with uniradicular canals were instrumented and contaminated with *E. faecalis* for 21 days. The teeth were divided into five groups (n = 10): Laser Irradiation Only (L + MB-), Laser with MB 50 μ M (L + MB50), Laser with AM 100 μ M (L + MB100), Laser with MB 200 μ M (L + MB200), and positive (n = 5) and negative (n = 5) control groups. Five minutes was the pre-irradiation time and one minute for the radiation. Microbiological collections were performed before and immediately after PDT, and colony forming units (log CFU mL⁻¹) were counted. Student's t-test for paired samples was used to test for significant differences within groups, while Anova One Way was used to test for significant differences in reductions between groups. **Results:** The log CFC mL⁻¹ reductions were 0.16 for L + MB-, 0.27 for L + MB50, 0.39 for L + MB100 and 0.45 + MB200. The effect of antimicrobial PDT with methylene blue on *E. faecalis* reduction was significant at all concentrations (p <0.05), however, there was no significant difference between concentrations (p > 0.05). **Conclusion:** Laser irradiated methylene blue PDT for 1 minute had an antimicrobial effect on the reduction of *E. Faecalis* biofilm in root canals.

Keywords: Methylene Blue, Photodynamic Therapy, Enterococcus faecalis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Formação dos grupos experimentais de acordo com a aplicação de Laser fotossensibilizador
27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios (desvio padrão) de log UFC mL⁻¹ nos diferentes grupos nos dois momentos de avaliação
30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma permanece
29

Figura 2 - Gráfico de erros mostrando o comportamento dos valores médios de redução microbiana nos diversos grupos avaliados

31

Figura 3 - Máquina de precisão de corte isomet

40

Figura 4 - Corte do dente na máquina

40

Figura 5 - Verificação da patência apical

41

Figura 6 - CRT

41

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

42

Figura 8 - Calibração lima R40

42

Figura 9 - Instrumentação com rotatório

42

Figura 10 - Padrão de instrumentação

43

Figura 11 - Capela de lâmina de fluxo

44

- Figura 12 - Coleta de *E. faecalis*
45
- Figura 13 - Ajuste da densidade ótica
45
- Figura 14 - Comparativo da densidade com Escala de Macfarland 0,5
45
- Figura 15 - Bolinha de algodão
46
- Figura 16 - Jarra utilizada para ambiente microaerófilo
47
- Figura 17 - Estufa bacteriológica a 37°C
47
- Figura 18 - Fluxograma do detalhamento da coleta microbiológica.
49
- Figura 19 - Preenchimento do canal radicular com o fotossensibilizador (azul de metileno)
50
- Figura 20 - Aplicação da fonte de luz
50
- Figura 21 - Coleta da cultura nos espécimes
51
- Figura 22 - Colocação dos cones no tubo eppendorf
51
- Figura 23 - Vortex AP 56
52
- Figura 24 - Tubos de ensaio numerados e placas de petri especificadas
52
- Figura 25 - Coleta de 1ml do material após o vortex
53
- Figura 26 - Diluição nos tubos de ensaio
53

Figura 27 - Coleta no tubo de ensaio para confecção da placa

54

Figura 28 - Deposição da cultura de *E. faecalis* na placa.

54

Figura 29 - Desenho da placa.

54

Figura 30 - Contagem das UFCs

55

LISTA DE ABREVIATURAS

AM – Azul de Metileno
AT – Azul de Toluidina
LASER – Light Amplified by Stimulated Emission
Radiation
UNICEUMA – Universidade CEUMA
E. faecalis – *Enterococcus faecalis*
TFD – Terapia Fotodinâmica
UFC – Unidade Formadora de Colônia
CFU – *Colony Forming Units*
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
C. albicans – *Candida albicans*
P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*
S. aureus - *Staphylococcus aureus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

21

2 MATERIAIS E MÉTODOS

24

2.1 Seleção e padronização das espécies

24

2.2 Cultura de *Enterococcus faecalis*

25

2.3 Metodologia para formação de biofilme de *Enterococcus faecalis*

26

2.4 Distribuição dos grupos experimentais

26

2.5 Grupos de Controle

27

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

28

2.7 Coletas e análise microbiológica

28

2.8 Fluxograma permanece

29

2.9 Análise estatística

29

3 RESULTADOS

29

4 DISCUSSÃO

31

5 CONCLUSÃO

35

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

36

ANEXOS

39

Anexo 1. Metodologia detalhada

40

Anexo 2. Parecer do comitê de ética

57

Anexo 3. Normas da revista: *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*

60

CAPÍTULO 1

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE MEDIADA POR AZUL DE METILENO CONTRA BIOFILME ENTEROCOCCUS FAECALIS

RESUMO

Introdução: O insucesso no tratamento endodôntico deve-se principalmente à permanência de microrganismos no sistema de canais radiculares, devido a 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 a eficácia da TFD, utilizando o corante azul de metileno (AM) em diferentes concentrações, irradiado por Laser de

baixa intensidade, em canais radiculares contaminados com biofilme de *E. faecalis*. **Materiais e Métodos:** Cinquenta dentes de humanos com canais unirradiculares foram instrumentados e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. Os dentes foram divididos em cinco grupos (n=10): Irradiação com Laser somente (L+AM-), Laser com AM 50µM (L+AM50), Laser com AM 100µM (L+AM100), Laser com AM 200µM (L+AM200), e 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 microbiológicas antes e logo após a TFD, e contadas as unidades formadoras de colônias (log UFC mL⁻¹). O teste T de Student para amostras pareadas foi empregado para testar se havia diferença significativa dentro dos grupos, enquanto a Anova One Way foi utilizada para testar se houve diferença significativa das reduções entre os grupos. Resultados: As reduções log CFC mL⁻¹ foram de 0,16 para L+AM-, 0,27 para L+AM50, 0,39 para L+AM100 e 0,45+AM200. O efeito da TFD antimicrobiana com o azul de metileno na redução de *E. faecalis* foi significativo em todas as concentrações (p<0,05), no entanto, não houve diferença significativa entre as concentrações (p>0,05). **Conclusão:** A TFD com azul de metileno irradiada por Laser por 1 minuto, teve um efeito antimicrobiano na redução do biofilme de *E. Faecalis* nos canais radiculares.

Palavras-chave: Azul de Metileno. Terapia Fotodinâmica. *Enterococcus faecalis*.

1. INTRODUÇÃO

A complexa estrutura do sistema de canais radiculares coloca a completa eliminação de microrganismos como um grande desafio (1). Os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares podem colonizar os túbulos dentinários, canais acessórios, istmos e deltas apicais, dificultando a eliminação através da instrumentação, uso de substâncias irrigadoras e pela medicação intracanal, levando ao insucesso do tratamento endodôntico (2).

Os fatores microbianos estão associados ao insucesso do tratamento na maioria dos casos, sendo que a persistência das infecções endodônticas depende de características relacionadas aos microrganismos, como sua capacidade de adaptação às mudanças ambientais (1). Logo, o sucesso do tratamento endodôntico está subordinado à inibição do crescimento bacteriano remanescente e evitar sua descolonização (3).

As bactérias no sistema de canais radiculares, se organizam em forma de biofilme, uma estrutura altamente organizada em que as bactérias ficam aderidas a uma superfície, tornando-se mais resistentes a antibióticos e mesmo a tratamentos mecânicos, limpeza química e irrigação com soluções como hipoclorito de sódio ou clorexidina (4).

Entre as bactérias associadas ao insucesso do tratamento endodôntico, destaca-se o *Enterococcus faecalis*, faz parte da microbiota bucal normal, bactéria aeróbia facultativa, gram-positiva,

responsável pela maioria dos casos de contaminação residual (5). Além disso, apresenta diversos fatores de virulência, como enzimas líticas, citolisinas, ácido lipoteicoico e capacidade de agregação de substâncias, além de ser capaz de suprimir a ação de linfócitos, contribuindo fortemente para o insucesso do tratamento endodôntico (1).

Para o sucesso do tratamento endodôntico tem-se buscado alternativas para eliminação de bactérias resistentes ao tratamento endodôntico convencional (6). Nesse sentido, a terapia fotodinâmica (TFD) é considerada minimamente invasiva (7), baseado no uso de um fotossensibilizador (FS) não-tóxico, sensível a um comprimento de luz específico, que produz oxigênio reativo citotóxico a algumas espécies de microrganismos, promovendo eficiente redução microbiana (8).

A ação da TFD pode ocorrer por meio de dois processos: tipo I – produção de uma 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, podendo ser repetida várias vezes, já que a mesma não é invasiva e nem apresenta efeitos cumulativos(9,10).

A fonte de luz utilizada pode ser um LASER (Light Amplified by Stimulated Emission Radiation) ou um diodo emissor de luz (LED), sendo que o LASER é a principal fonte de luz utilizada para ativar os FS na TFD. Foi introduzido para endodontia para melhorar os resultados obtidos por técnicas tradicionais e têm demonstrado ser

eficazes na redução de bactérias no sistema de canais radiculares (11).

Dentre as características necessárias para a escolha de um FS, destaca-se a baixa toxicidade após a administração, ser um composto hidrossolúvel passível de rápida eliminação, biologicamente estável, baixo custo e fotoquimicamente eficaz (12).

Os FS utilizados com maior frequência na TFD são fenotiazinas (azul de metileno e azul de toluidina), fitalocianina (azulene), clorinas (polilisinias), porfirinas (hematoporfirinas) e xantenas (rosa de bengala, eosina e eritrosina) (13,14).

Um dos principais representantes da família das fenotiazinas é o azul de metileno (AM), que apresenta características favoráveis para uso em TFD, como intensa absorção na região de 660 nm, baixa toxicidade, altamente solúvel em água, além de ser o FS de escolha em grande parte dos estudos, uma vez que este composto é utilizado na área da saúde para uma série de finalidades terapêuticas, em concentrações superiores as utilizadas em TFD (14).

O AM é um composto químico aromático heterocíclico. À temperatura ambiente, verifica-se como um sólido, pó verde, escuro, inodoro, que origina uma solução azul quando dissolvido em água. Mostra a toxicidade considerável para várias espécies de microrganismos, incluindo bactérias orais gram-positivas e gram-negativas (15).

Diante do exposto, este estudo se propõe a avaliar o efeito da TFD antimicrobiana contra o biofilme de *E. faecalis*, utilizando como

agente FS o AM em variadas concentrações, irradiado com uma fonte de luz Laser de baixa intensidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 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, (ANEXO1) foram utilizados 50 dentes extraídos de humanos unirradiculados (incisivos e caninos superiores), obtidos por meio 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 13mm.

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 12mm 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 2mL 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 1mL 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 3mL 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.

2.2 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.

2.3 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 0,5mL (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.

2.4 Distribuição dos grupos experimentais

Como agente fotossensibilizador, foi utilizado o azul de metileno (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA)

Os dentes foram divididos em cinco grupos (n=10): Irradiação com Laser somente (L+AM-), Laser com AM 50µM (L+AM50), Laser com AM 100µM (L+AM100), Laser com AM 200µM (L+AM200), e grupos positivo (n=5) e negativo (n=5). Os espécimes foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com o quadro abaixo:

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

Grupos	Tratamento	Amostra
L+AM-	Apenas Laser	10
L+AM50	TFD com Laser e AM 50 μ M	10
L+AM100	TFD com Laser e AM 100 μ M	10
L+AM200	TFD com Laser e AM 200 μ M	10

Fonte: Desenvolvido pelo mestrando.

2.5 Grupos Controle

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

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

Para a realização da TFD, um mesmo operador utilizou como recurso fotodinâmico um laser de baixa potência, com comprimento de onda do laser vermelho: 660nm \pm 10nm (LASER THERAPY XT-DMC, São Carlos/SP, Brasil.), ajustado na potência de 6J/Min. Com o objetivo de permitir a difusão da luz por toda a extensão do canal radicular, foi acoplada ao dispositivo, uma fibra óptica de 50 mm de

comprimento com diâmetro da ponta de 0,30mm e conicidade de 0,02mm/mm.

A fibra óptica foi introduzida no canal radicular, com o Laser acionado até o comprimento real de trabalho, com uma frequência de aproximadamente 10 introduções/retiradas por minuto, 6 ciclos de 10 segundos, 6J/min, após o tempo de pré-irradiação de 5 minutos.

2.7 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. Os cones utilizados foram transferidos para tubos eppendorf de polipropileno (São Paulo/SP, Brasil) com 1,5mL 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 (Difco, Detroit, MI, EUA) em triplicata. As placas foram incubadas 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).

2.8 Fluxograma

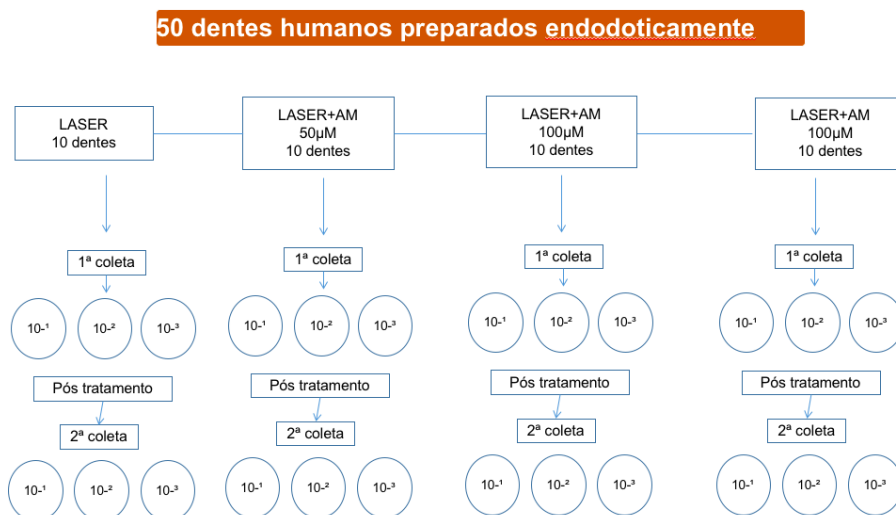


Figura 1 - Detalhamento da coleta microbiológica.

2.9 Análise estatística

Após a constatação que os dados apresentavam distribuição normal (Shapiro wilk, $p > 0,01$), o teste T de Student para amostras pareadas foi empregado para testar se havia diferença significativa dentro dos grupos entre a contagem de microrganismo inicial e após o tratamento. O teste Anova One Way foi utilizado para testar se houve diferença significativa das reduções entre os grupos.

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

3 RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os valores médio (desvio padrão) de CFU/mL (\log_{10}) dos grupos obtidos nos dois momentos de avaliação.

A figura 1 representa gráfico de erros evidenciando os valores médios de log CFC mL⁻¹ dos grupos com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%).

As reduções log UFC mL⁻¹ foram de 0,16 para L+AM-, 0,27 para L+AM50, 0,39 para L+AM100 e 0,45 para L+AM200.

A redução de *E. faecalis* foi significativa em todas as concentrações ($p < 0,05$), no entanto, não houve diferença significativa entre as concentrações ($p > 0,05$).

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

	L+AM-	L+AM50	L+AM100	L+AM200	Positivo	Negativo
Inicial	5,62 (0,26)	5,51 (0,21)	5,76 (0,20)	5,28 (0,27)	5,56 (0,34)	0,00 (0,00)
Pós TFD	5,46 (0,0,45)	5,24 (0,32)	5,36 (0,39)	4,83 (0,58)	5,42 (0,49)	0,00 (0,00)
<i>p</i> -valor	0,061	0,018*	0,002*	0,011*	0,155	1,000

*Valores de $p < 0,05$ =Diferença estatística significativa entre os valores médios de redução microbiana antes e depois da aplicação da TFD.

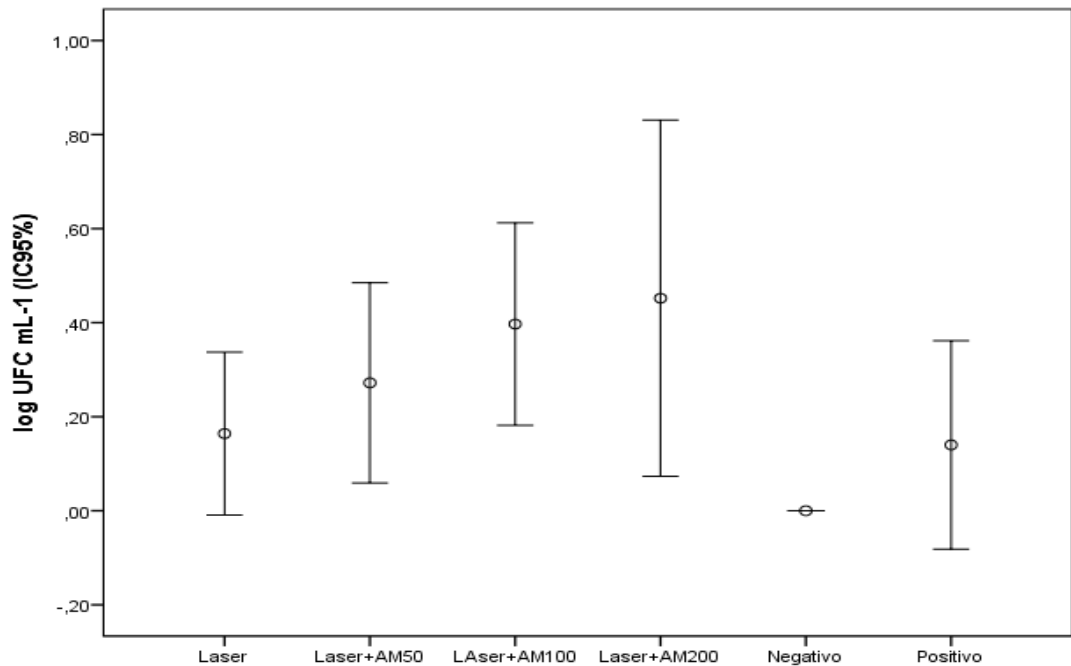


Figura 2. Gráfico de erros mostrando o comportamento dos valores médios de redução microbiana nos diversos grupos avaliados.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo a hipótese nula, que os protocolos que usariam terapia fotodinâmica não afetariam a redução bacteriana imediatamente após o tratamento com TFD com azul de metileno aplicada durante 60 segundos, foi rejeitada.

Neste estudo foi utilizado o tempo de irradiação de 60 segundos, mesmo tempo utilizado por Pourhajibagher et al. (16) e Yildirim et al. (17). Esse tempo foi suficiente para uma redução microbiana significativa em todas as concentrações. Os resultados mostraram ainda que *E. faecalis*, em forma de biofilme em canais radiculares de dentes extraídos, exposto a AM nas concentrações 50, 100 e 200 µM ativado com Laser com comprimento de onda 665nm, foram reduzidos significativamente. No entanto, nenhuma

concentração foi capaz de eliminar 100% o número de células bacteriana.

Talvez para a completa eliminação haveria necessidade de um maior tempo de irradiação e conseqüentemente uma maior dose de energia depositada, pois, segundo Williams et al. (18), o tempo de irradiação, assim como a dose de energia, são os fatores mais importantes na eliminação dos microrganismos durante a TFD. Também no estudo de Soukos et al. (2), utilizando uma concentração de 25 µg/ml (67 µM) de AM irradiado por Laser durante 5 minutos ocorreu uma redução de 97% de *E. faecalis*. Além do mais, Soares et al. (19) reportaram que a dose de energia depositada durante a TFD é fator primordial na completa eliminação dos microrganismos.

Assim sendo, segundo Xhevdet et al. (1) o curto tempo de irradiação pode dificultar a completa eliminação das bactérias, e a baixa concentração de ROS atrapalha a difusão do fotossensibilizador nos túbulos dentinários, ao mesmo tempo que o *E. faecalis* em forma de biofilme é um fator de persistência bacteriana após tratamento endodôntico (20).

Outro fato que deve ter contribuído para não eliminação total dos microrganismos é que a eliminação de *E. faecalis* em forma de biofilme é mais difícil, pois existe uma diferença significativa entre bactérias planctônicas e em forma de biofilme bacteriano. As primeiras flutuam livremente, enquanto o biofilme, é uma estrutura altamente organizada onde as bactérias ficam aderidas em uma

superfície, e os microrganismos apresentam um fenótipo alterado em relação ao seu crescimento (20) o que dificulta a sua eliminação.

Existe na literatura uma grande variação em relação ao tempo de pré-irradiação do FS, ou seja, o tempo em que o canal radicular fica inundado pela solução antes da aplicação da luz, variando entre 1 a 10 minutos (21-25).

No presente estudo, o tempo pré-irradiação, do AM foi de 5 minutos. Mesmo tempo foi utilizado por Garcez et al. (12), Souza et al. (26) e Fontana et al. (27), pois, acredita-se que esse tempo é necessário para permitir a penetração do AM por meio dos túbulos dentinários e interação com a parede bacteriana (28).

Em relação a concentração do AM, Garcez et al. (29) utilizou 50, 100, 150 e 300 μM e os resultados mostraram que uma concentração de 50-100 μM deveria ser as mais indicadas para uso da TFD com AM. Por outro lado, os estudos de Wainwright et al. (30) e Usacheva et al. (31) o AM foi utilizado em concentrações que variam de 42 μM (15,7 $\mu\text{g/ml}$) a 100 μM (37,4 $\mu\text{g/ml}$) para atingir o efeito bactericida em biofilme de *E. faecalis* in vitro, chegando a conclusão que quando maior a concentração do FS, maior era o fluxo de energia, elevando a efetividade da TFD.

Oliveira et al. (32) avaliaram, em vitro, o efeito antimicrobiano da TFD usando AM, na concentração de 50 μM , e laser de baixa potência contra *C. albicans*, *P.aeruginosa*, *E. faecalis* e *S.aureus*. A irradiação do laser na presença do AM eliminou 74,90% da *C. albicans*, 72,41% para da *P. aeruginosa*, 95,42% para *S. aureus* e

96,44 para *E. faecalis* mostrando diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos.

Segundo Komine et al. (33) a concentração inicial ideal para gerar oxigênio singlete e atingir o efeito bactericida da TFD, utilizando AM para a eliminação de *E. faecalis*, é de 35,2 $\mu\text{mol/L}$. Neste estudo, foram testadas as concentrações de 50, 100, 200 μM para observar se havia uma relação linear entre o aumento da concentração do FS com o aumento da redução microbiana. Percebeu-se que, em média, houve um aumento da redução com o aumento da concentração, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. A falta de correlação provavelmente foi devido a dispersão dos valores de redução ao redor da média em cada concentração. O caráter multifatorial, como demonstrado por Soares et al. (19), da atividade antimicrobiana da TFD, provavelmente foi responsável pela dispersão dos valores de redução microbiana.

Nossos achados sugerem que o AM, nas concentrações utilizadas neste estudo, tem o potencial de reduzir significativamente *E. faecalis* em forma de biofilme em canais radiculares, no entanto, há necessidade de outros estudos no intuito de estabelecer um protocolo adequado com um tempo maior de aplicação da luz, assim como, avaliar a efetividade dessas mesmas concentrações diante de diferentes cepas bacterianas causadoras de insucesso do tratamento endodôntico.

5 CONCLUSÃO

A utilização da terapia fotodinâmica utilizando Laser de baixa intensidade e azul de metileno, nas concentrações de 50, 100 e 200 μ M durante 1 minuto, mostrou-se eficaz na redução de *E. faecalis* na forma de biofilme bacteriano em canais radiculares de dentes humanos.

REFERÊNCIAS

1. Xhevdet A, Stubljarić D, Kriznar I, Jukić T, Skvarc M, Veranić P, et al. The disinfecting efficacy of root canals with laser photodynamic therapy. *J Lasers Med Sci*. 2014;5:19–26.
2. Soukos NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection. *J Endod*. 2006;32:979–984.
3. 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;44:307–313.
4. Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod* 2011;37:217–222.
5. 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;32:93–98.
6. Fonseca MB, Tessare PO, Pallota RC, Filho HF, Denardin OVP, Rapoport A, et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg*. 2008;26:265–289.
7. Pourhajibagher M, Kazemian H, Chiniforush N, Hosseini N, Pourakbari B, Azizollahi A, et al. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2018;24:206–211.
8. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15:308–320.
9. 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. *Periodontology* 2000. 2009;51:109–140.
10. 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 rootcanals. *Clin Oral Investig*. 2017;21:1753–1759.
11. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L. Laser application in tooth bleaching: An update review. *Minerva Stomatologica*. 2011;60:1–12.
12. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007;39:59–66.
13. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic Therapy in Dentistry. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2007; 86:694–707.
14. Chiniforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Bahador A. Clinical approach of high technology techniques for control and

- elimination of endodontic microbiota. *J Lasers Med Sci.* 2015;6:139–150.
15. Wainwright M, Crossley KB. Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons? *Journal of Chemotherapy.* 2002; 14:431–443.
 16. Pourhajibagher M, Raoofian R, Ghorbanzadeh R, Bahador A. An experimental study for rapid detection and quantification of endodontic microbiota following photo-activated disinfection via new multiplex real-time PCR assay. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 21:344–350.
 17. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent.* 2013;7:469.
 18. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue o on *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 2003; 37:190–193.
 19. Soares JA, Soares SMCS, de Jesus Tavares RR, de Castro Rizzi C, Vaz Rodrigues SCG, Maia Filho EM, et al. Exploring different photodynamic therapy parameters to optimize elimination of *Enterococcus faecalis* in planktonic form. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018;22:127–131.
 20. Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, et al. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. *Int Endod J.* 2018;51:123–134.
 21. Dujic J, Kippenberger S, Ramirez-Bosca A, Diaz-Alperi J, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, et al. Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *Int J Cancer.* 2009; 124:1422–1428.
 22. Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J.* 2002;35:268–274.
 23. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic Treatment of Endodontic Polymicrobial Infection In Vitro. *J Endod.* 2008;34:728-734.
 24. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, et al. Nanoparticle-based Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J Endod.* 2010;36:322–328.
 25. Nagai Y, Suzuki A, Katsuragi H, Shinkai K. Effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on the sterilization of infected dentin in vitro. *Odontology.* 2018; 106:154–161.
 26. Souza LC, Brito PRR, Machado de Oliveira JC, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010; 36:292–296.

27. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009; 44:751–759.
28. Upadya MH, Kishen A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *Int Endod J.* 2010;43:978–987.
29. Garcez AS, HAMBLIN MR. Methylene Blue and Hydrogen Peroxide for Photodynamic Inactivation in Root Canal - A New Protocol for Use in Endodontics. *Eur Endod J.* 2017;2:29–29.
30. Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DRA, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1997;19:75–80.
31. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;29:165–173.
32. Oliveira BP de, Lins CC dos SA, Diniz FA, Melo LL, Castro CMMB de. In Vitro antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms. *Brazilian J Oral Sci.* 2014; 13:53–57.
33. Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2013; 39:411–414.

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 2). Foi dispensada a apresentação do Termo de Doação dos Dentes.

Após aprovação, foram selecionados 50 dentes extraídos de humanos unirradiculados (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 13mm .

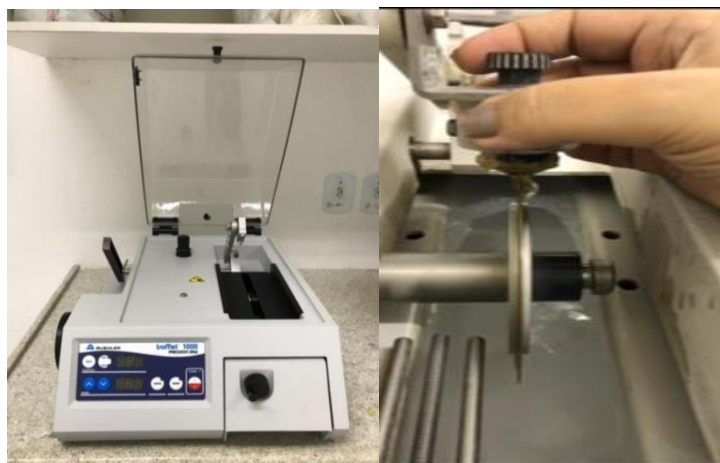


Figura 3 - máquina de precisão de corte Isomet
Figura 4 – corte do dente na máquina

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 12mm para todos os dentes.



Figura 5 – verifica patência apical

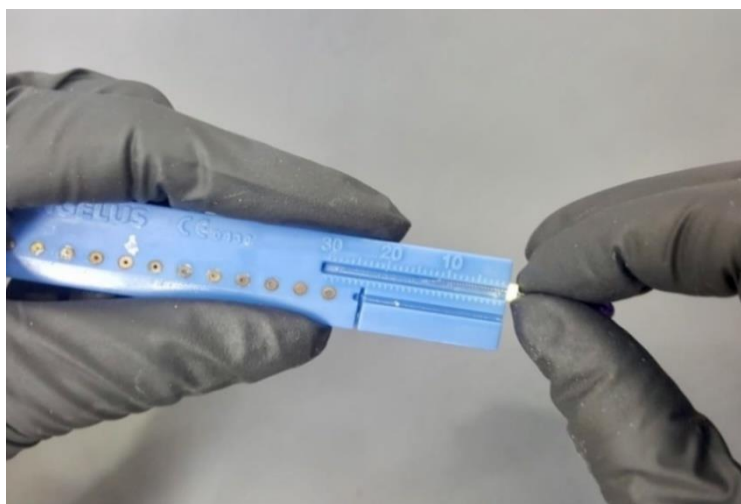


Figura 6 – CRT

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 2mL 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 1mL 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 3mL 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.

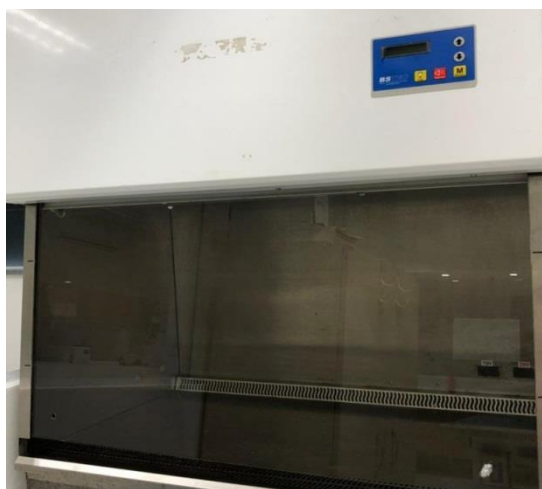


Figura 11 – Capela de lâmina de fluxo

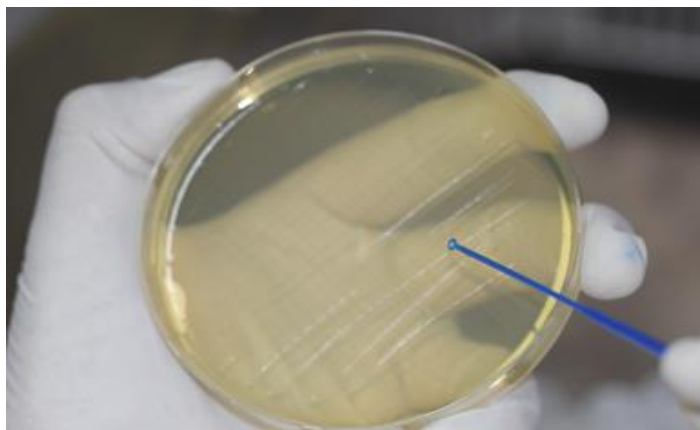


Figura 12 – coleta de *E. faecalis*

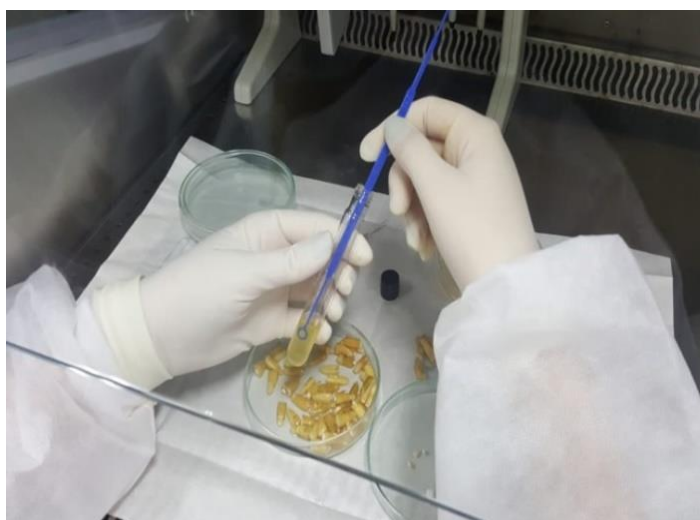


Figura 13 – ajuste da densidade ótica

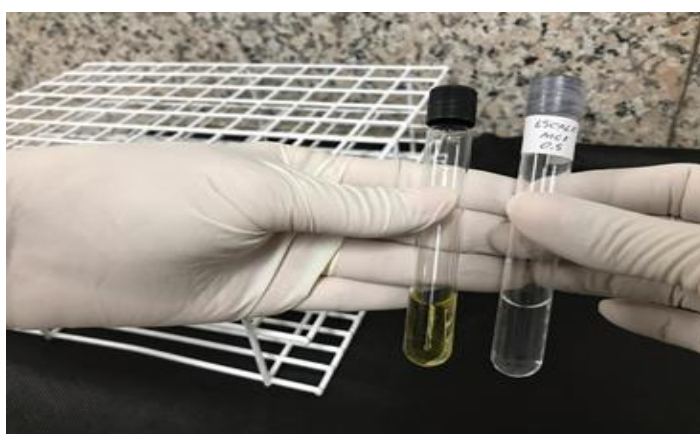


Figura 14 – comparativo da densidade com Escala de Macfarland 0,5

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 0,5mL (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

Como agente fotossensibilizador, foi utilizado o azul de metileno (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA)

Os dentes foram divididos em cinco grupos (n=10): Irradiação com Laser somente (L+AM-), Laser com AM 50 μ M (L+AM50), Laser com AM 100 μ M (L+AM100), Laser com AM 200 μ M (L+AM200), e

grupos positivo (n=5) e negativo (n=5). Os espécimes foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com o quadro abaixo:

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

Grupos	Tratamento	Amostra
L+AM-	Apenas Laser	10
L+AM50	TFD com Laser e AM 50 μ M	10
L+AM100	TFD com Laser e AM 100 μ M	10
L+AM200	TFD com Laser e AM 200 μ M	10

Fonte: desenvolvido pelo mestrando.

1.5 Grupos Controle

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

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

Para a realização da TFD, um mesmo operador utilizou como recurso fotodinâmico um laser de baixa potência, com comprimento de onda do laser vermelho: 660nm \pm 10nm (LASER THERAPY XT-DMC, São Carlos/SP, Brasil.), ajustado na potência de 6J/Min. Com o objetivo de permitir a difusão da luz por toda a extensão do canal radicular, foi acoplada ao dispositivo, uma fibra óptica de 50mm de

comprimento com diâmetro da ponta de 0,30mm e conicidade de 0,02mm/mm.

A fibra óptica foi introduzida no canal radicular, com o Laser acionado até o comprimento real de trabalho, com uma frequência de aproximadamente 10 introduções/retiradas por minuto, 6 ciclos de 10 segundos, totalizando 1 minuto, 6J/min. Como agente fotossensibilizador, foi utilizado o azul de metileno (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA), com o tempo de pré-irradiação de 5 minutos.

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

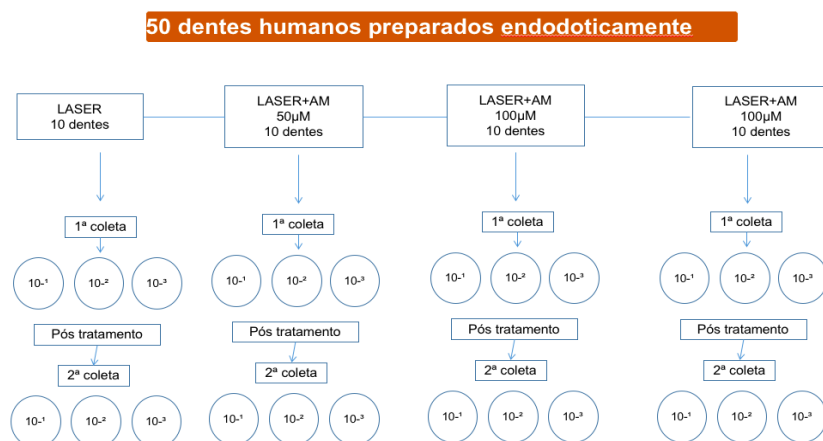


Figura 18 - Detalhamento da coleta microbiológica.

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 do AM: Laser+AM 50 μM , Laser+AM 100 μM , Laser+AM 200 μM e o grupo tratado somente com o Laser. Os grupos controle tinham 5 espécimes.

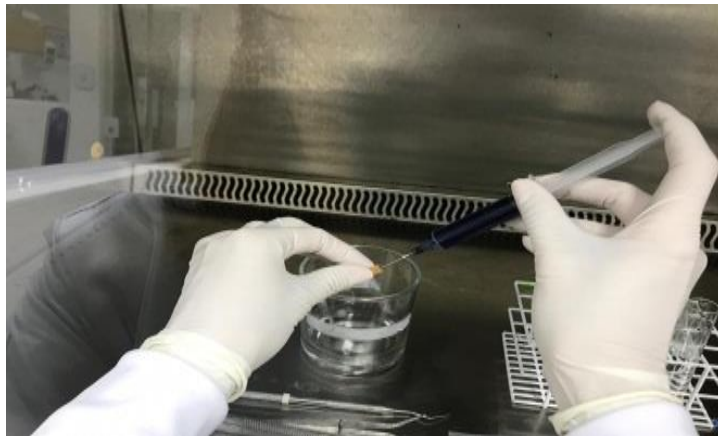


Figura 19 – preenchimento do canal radicular com o fotossensibilizador (azul de metileno).

Após a colocação do AM, o tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos.



Figura 20 – aplicação da fonte de luz

Laser de baixa intensidade aplicado na cervical dos dentes. Feitas 6 aplicações de 10 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 (São Paulo/SP, Brasil) com 1,5mL de solução salina estéril e agitados (Vortex AP 56, Phoenix, EUA) durante 1 minuto.

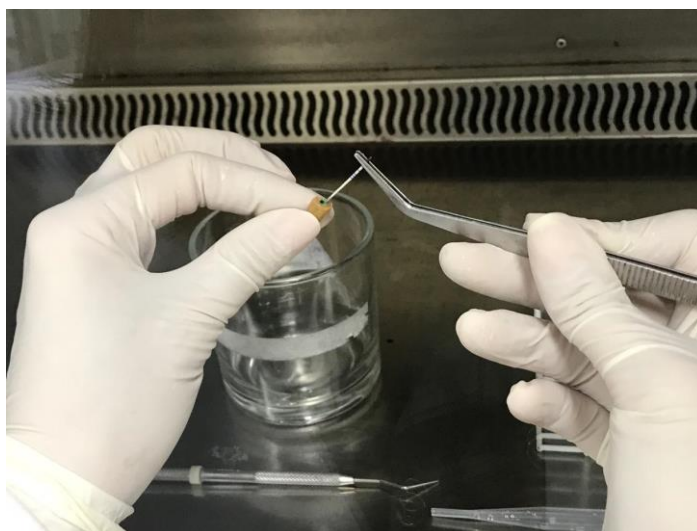


Figura 21 – coleta da cultura nos espécimes

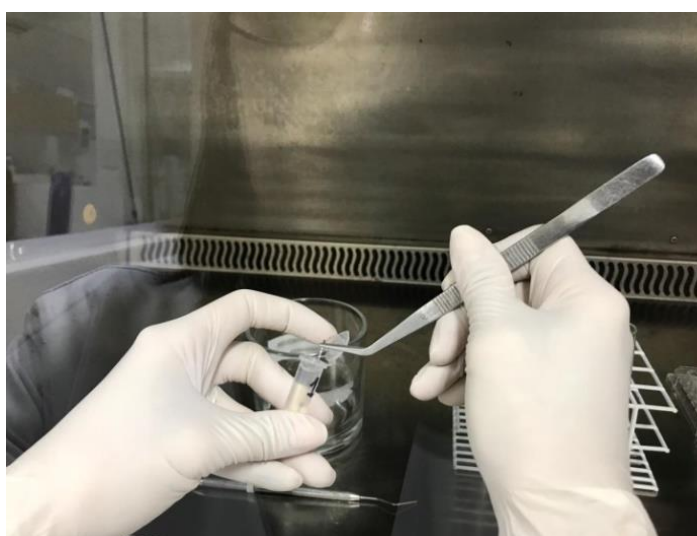


Figura 22 – colocação dos cones no tubo eppendorf

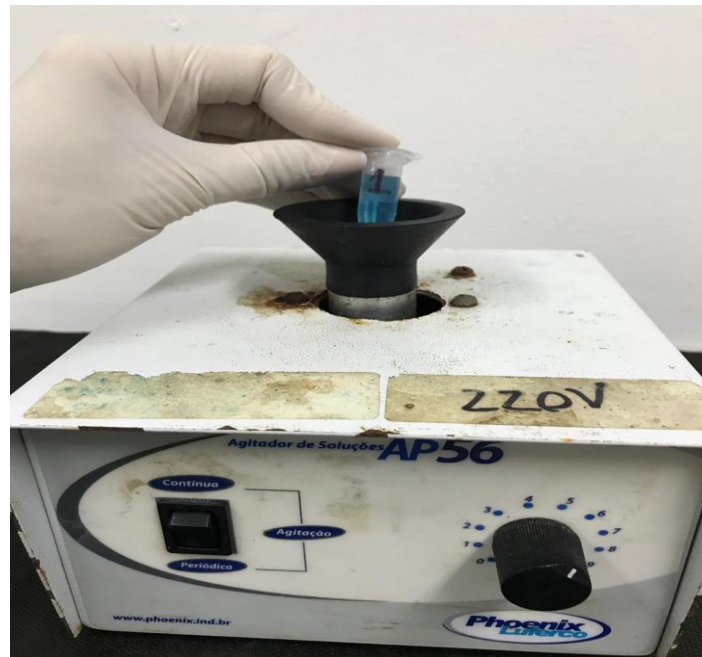


Figura 23 – Vortex AP 56

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

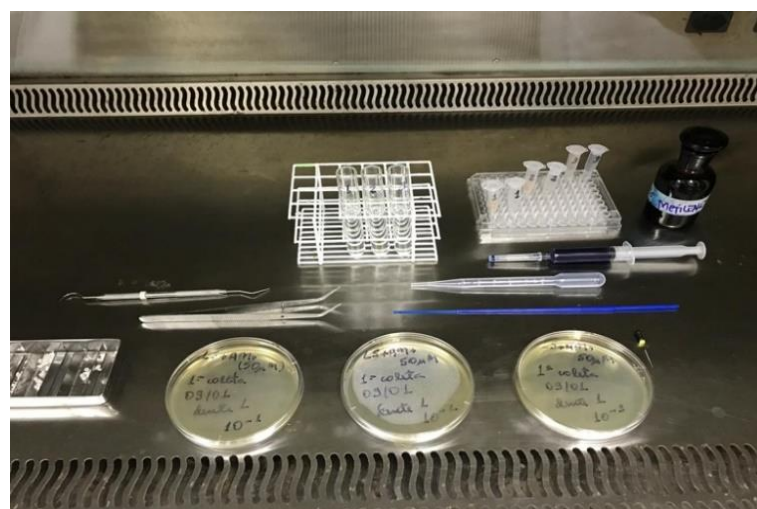


Figura 24 – tubos de ensaio numerados e placas de petri especificadas

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} .

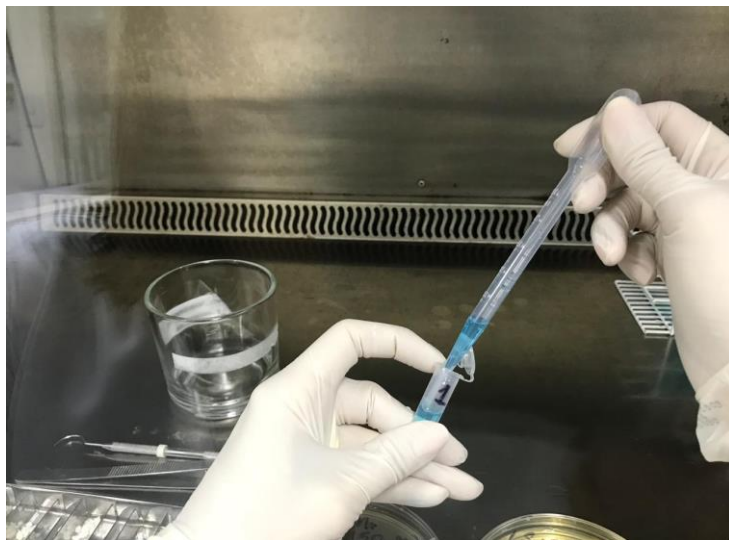


Figura 25 – coleta de 1ml do material após o vortex



Figura 26 – diluição nos tubos de ensaio

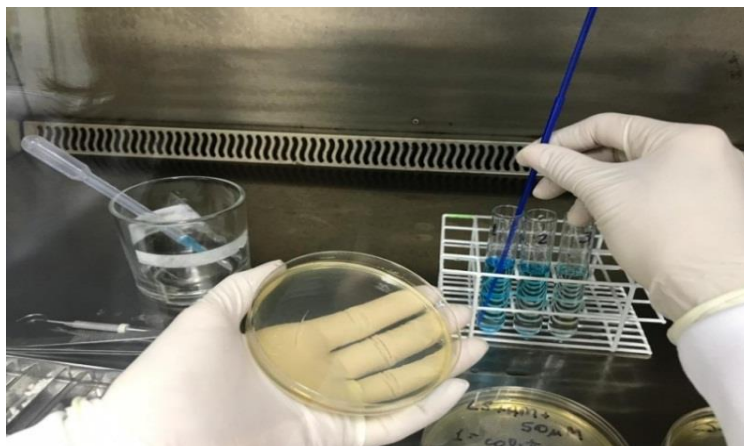


Figura 27 – coleta no tubo de ensaio para confecção da placa

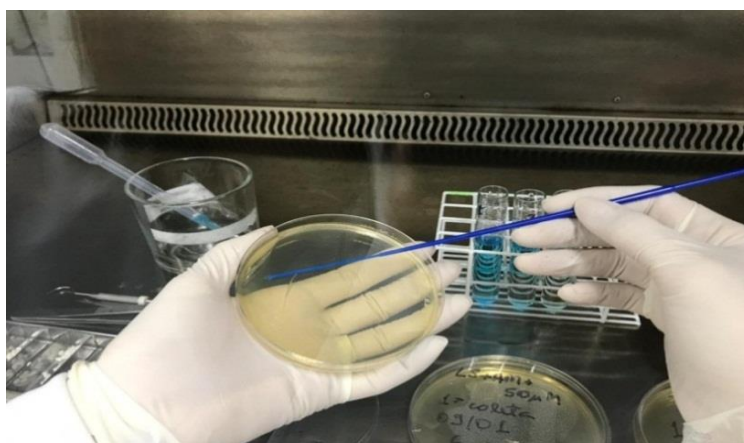


Figura 28 – deposição da cultura de *E. faecalis* na placa

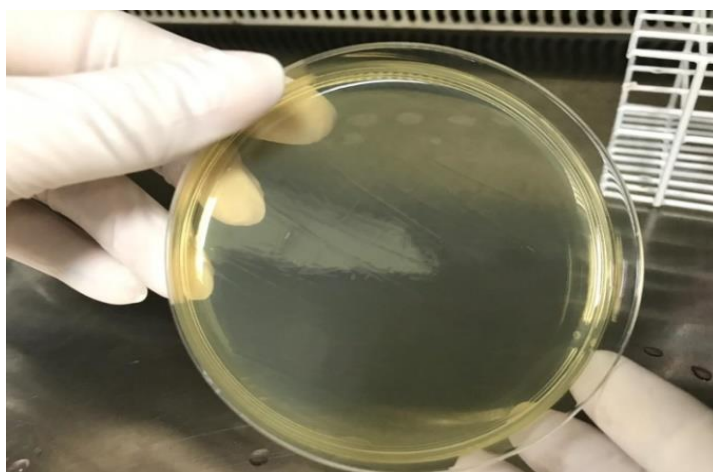


Figura 29 – desenho da placa.

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).

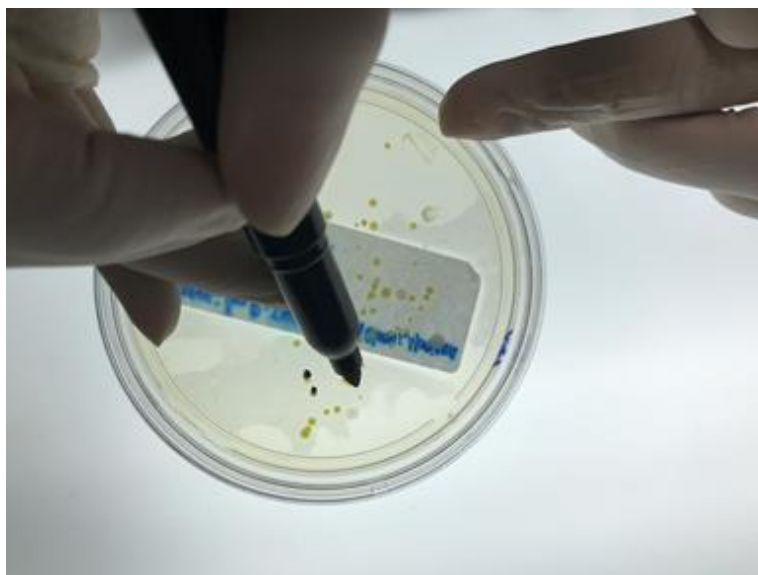


Figura 30 – contagem das UFCs.

1.9 Análise estatística

Após a constatação que os dados apresentavam distribuição normal (Shapiro wilk, $p > 0,01$), o teste T de Student para amostras pareadas foi empregado para testar se havia diferença significativa dentro dos grupos entre a contagem de microrganismo inicial e após o tratamento. O teste Anova one way foi utilizado para testar se houve diferença significativa das reduções entre os grupos.

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 de 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 unirradiculares 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 apenas 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

UF: MA

Telefones: (98)3214-4212

CEP: 65.075-120

Município: SÃO LUIS

E-mail: cep@ceuma.br



Continuação do Parecer: 1.088.373

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	P8_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_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



Continuação do Parecer: LBBB-372

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	15/08/2018 14:54:40	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito
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_da_TCLE.pdf	14/04/2018 23:58:31	SILVANA CRISTINA GAMA VAZ RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_da_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
Telefones: (98)3214-4313 E-mail: cep@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 specialities. 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. Kashaf, Tehran, Iran

H. Kostren, Innsbruck, Austria

S. Leclaire, 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. Waidelich, Munich, Germany

M. Wainwright, Liverpool, England, UK

X. Wang, Shanghai, China

A. Woeng-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 specialities. 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 **4USD 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. A1631510 , A1631511 , A1632198, 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. Oguro, 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.elsevier.com/profile/api/navigate/PDFDT>. 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](#).