

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA ÁGUA OZONIZADA ASSOCIADA A
TERAPIA FOTODINÂMICA COM ERITROSINA EM CANAIS
INFECTADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Isabel Alessandra Miranda Nunes

2020

Isabel Alessandra Miranda Nunes

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA ÁGUA OZONIZADA ASSOCIADA A
TERAPIA FOTODINÂMICA COM ERITROSINA EM CANAIS
INFECTADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

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

Área de Concentração: Odontologia
Integrada

Orientador: Prof. Dr. Etevaldo Matos
Maia Filho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ceci
Nunes Carvalho

São Luís

2020

N972a Nunes, Isabel Alessandra Miranda.

Ação antimicrobiana da água ozonizada associada a terapia fotodinâmica com eritrosina em canais infectados com enterococcus faecalis. /Isabel Alessandra Miranda Nunes. – São Luís: UNICEUMA, 2020.

69f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Odontologia. Universidade CEUMA, 2020.

1. Água ozonizada. 2. Terapia fotodinâmica .3 enterococcus faecalis I. Matos Filho, Etevaldo Matos (Orientador) II. Bandéca, Matheus Coelho. (Coordenador) III. Título.

CDU: 616.314

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Verônica Alves CRB13/621

Proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio eletrônico ou mecânico, inclusive através de processos xerográficos, sem permissão expressa do Autor. (Artigo 184 do Código Penal Brasileiro, com a nova redação dada pela Lei n.8.635, de 16-03-1993).

Nome: Isabel Alessandra Miranda Nunes

Título: Ação antimicrobiana da água ozonizada associada a terapia fotodinâmica com eritrosina em canais infectados com *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. Leily Macedo Firoozmand

Instituição: Universidade Federal do Maranhão

Assinatura: _____

Prof. Dr. Rudys Rodolfo De Jesus Tavares

Instituição: UNICEUMA

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Eusébio** e **Gedeilde** pelo amor incondicional e por não medirem esforços pela minha felicidade.

Aos meus irmãos, **Eusébio Júnior** e **Adriana** pelo apoio e carinho que me deram impulso para seguir sempre.

Aos meus filhos **João Gabriel** e **Alexandre Filho**, razão da minha existência, que compreendem com carinho as minhas ausências e para quem eu desejo ser sempre um exemplo. Ao meu marido **Alexandre Magno** pelo amor e companheirismo, me apoiando e diminuindo as dificuldades do dia-a-dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por estar sempre comigo e me dar forças nos momentos em que eu mais preciso.

Ao Prof. Dr. **Etevaldo Matos Maia Filho** por todo apoio, dedicação, ensinamento e pela sua conduta ética e profissional. Me ensinou a ver mais soluções do que dificuldades para os problemas que surgiam. Apenas muito obrigada, nunca será suficiente para expressar minha gratidão.

A minha co-orientadora Profa. Dra. **Ceci Nunes Carvalho** pelos ensinamentos repassados.

A todos os Professores do **Mestrado em Odontologia Integrada** por todos os conhecimentos compartilhados e pelos momentos vividos durante esses dois anos.

A Profa. Dra. **Tânia Maria Gaspar Novais**, do Departamento de Farmácia da UNICEUMA, uma pessoa que tem sempre a ensinar e não mede esforços para isso.

Ao Sr. **Marinaldo Maciel Leitão Filho**, técnico do Laboratório Multidisciplinar da UNICEUMA, sempre disponível a colaborar.

Aos colegas; **Patrick Pereira Garcia** e **Wallysson Sousa Silva** que foram exemplares no apoio para execução da etapa laboratorial desta pesquisa.

Aos amigos **Ana Cláudia, Camila, Dyele, Gustavo, Lays, Leticia, Luana, Osvaldo, Rossana, Samuel e Thaysa**, por toda amizade e companheirismo durante esses dois anos.

À todos os professores do programa de Pós-Graduação, obrigada pelos conhecimentos compartilhados.

À **Erymônica** e demais funcionários da Pós-Graduação pela ajuda nos momentos difíceis e sempre disponíveis para nos ajudar e atender nossas solicitações.

Aos professores e funcionários da Clínica da Graduação, em especial ao **Prof. Andres**, obrigada pela experiência prática obtida durante nosso estágio.

A UNICEUMA pela disponibilidade de suas instalações.

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

Meu muito obrigada a todos.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

(Marthin Luther King)

RESUMO

Nunes IAM. Ação antimicrobiana da água ozonizada associada a terapia fotodinâmica com eritrosina em canais infectados com *Enterococcus faecalis* [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2020.

RESUMO

O principal objetivo do tratamento endodôntico é erradicar ou reduzir substancialmente a carga microbiana no canal radicular. Portanto, novos protocolos são constantemente testados na busca da completa desinfecção dos canais radiculares. Este trabalho avaliou o efeito antimicrobiano da água ozonizada associada a terapia fotodinâmica (TFD), além da ação do Sonic, no combate de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares **Métodos:** 70 canais unirradiculares de dentes de humanos foram preparados e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. Os dentes foram divididos em seis grupos de tratamento experimentais (n=10): água ozonizada sem sonic (O+S-), água ozonizada com sonic (O+S+), TFD sem sonic (TFD+S-), TFD com sonic (TFD+S+), TFD + água ozonizada sem sonic (O+TFD+S-), TFD + água ozonizada com sonic (O+TFD+S+) e dois grupos controle: positivo (n=5) e negativo (n=5). Foram realizadas coletas microbianas antes e após o tratamento, contadas em log das unidades formadoras de colônias (log UFC mL⁻¹) e testado se havia diferença significativa entre essas contagens (teste T de Student). O teste Anova two way, com post hoc de Tukey, foi empregado para avaliar a redução

microbiana nos grupos tratados com Ozônio, TFD e na associação Ozônio+TFD e para determinar se o emprego do Sonic alterou a redução de microrganismos. **Resultado:** Em todos os protocolos houve redução microbiana considerável ($p=0,025$), sendo que nos grupos em que foram empregados o Sonic a redução microbiana foi significativamente maior ($p=0,001$). **Conclusão:** Os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de microrganismos nos canais radiculares. O emprego do Sonic ajudou a aumentar a redução microbiana de canais radiculares infectados.

Descritores: Água ozonizada. Terapia Fotodinâmica. *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

Nunes IAM. Antimicrobial action of ozonated water associated with photodynamic therapy with erythrosine in canals infected with *Enterococcus faecalis* [dissertation]. São Luís. CEUMA University; 2020.

ABSTRACT

The main objective of endodontic treatment is to eradicate or substantially reduce the microbial load in the root canal. Therefore, new protocols are constantly being tested in the search for complete disinfection of root canals. This work evaluated the antimicrobial effect of ozonized water associated with photodynamic therapy (PDT) on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. Methods: 70 uniradicular canals of human teeth were prepared and contaminated with *E. faecalis* for 21 days. The teeth were divided into six treatment groups (n = 10): ozonized water without sonic (O + S-), ozonized water with sonic (O + S +), TFD without sonic (TFD + S-), TFD with sonic (TFD + S +), TFD + ozonized water without sonic (O + TFD + S-), TFD + ozonized water with sonic (O + TFD + S +) and two positive (n = 5) and negative (n = 5) control groups. Microbial collections were performed before and after treatment, counted in the log of colony-forming units (log UFC mL⁻¹) and tested if there was a significant difference between the microorganism counts (Student's t-test). The two-way Anova test, with Tukey's post hoc, was used to evaluate the microbial reduction in the groups treated with Ozone, TFD and in the Ozone + TFD association and to determine whether the use of sonic

alters the reduction of microorganisms. Result: In all protocols there was a considerable microbial reduction ($p = 0.025$), and in the groups in which sonic was used, the microbial reduction was significantly greater ($p = 0.001$). Conclusion: The treatments were able to significantly reduce the amount of microorganisms in the root canals.

Keywords: Ozonated water. Photodynamic Therapy.
Enterococcus faecalis.

LISTA DE ABREVIATURAS

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CFU – *Colony Forming Units*

CRT – Comprimento Real de Trabalho

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

FDA – *Food and Drugs Association*

FS - Fotossensibilizador

LED – *Light Emitting Diodes*

Log - logaritmo

mL – milimolar

mm - milímetro

NaOCl – Hipoclorito de sódio

nm – Nanômetro

PDT- Photodynamic Therapy

ppm – parte por milhão

s - segundo

TFD – Terapia Fotodinâmica

TSa - *Tryptic Soy Agar*

TSb – *Tryptic Soy Broth* UNICEUMA – Universidade CEUMA

UFC – Unidade Formadora de Colônia

μM – Micromolar

% - Porcentagem

°C – graus Celsius

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão dos grupos de acordo com os grupos experimentais.....	28
Tabela 2. Valores médios (desvio padrão) de log UFC/mL nos diferentes grupos nos dois momentos de avaliação.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comportamento dos valores médios (intervalo de confiança de 95%) de redução microbiana expressa em log UFC/mL nos diversos grupos avaliados.....	33
Figura 2 - Máquina de precisão de corte Isomet.....	43
Figura 3 - Corte do dente na máquina.....	43
Figura 4 - Verificação da patência apical.....	44
Figura 5 - CRT.....	44
Figura 6 - Sistema Rotatório Reciproc® (VDW, Munich, Germany)....	44
Figura 7 - Calibração lima R40.....	44
Figura 8 - Instrumentação com rotatório.....	45
Figura 9 - Padrão de instrumentação.....	45
Figura 10 - Capela de lâmina de fluxo.....	46
Figura 11 - Coleta de <i>E. faecalis</i>	46
Figura 12 - Ajuste da densidade ótica.....	46
Figura 13 - Comparativo da densidade com Escala de Macfarland 0,5.....	46
Figura 14 - Bolinha de algodão.....	47
Figura 15 - Jarra utilizada para ambiente microaerófilo.....	47
Figura 16 - Estufa bacteriológica a 37°C.....	47

Figura 17 - Preenchimento do canal radicular com eritrosina.....	49
Figura 18 - Aplicação da fonte de luz.....	49
Figura 19 – Produção da água ozonizada.....	50
Figura 20 - Preenchimento do canal radicular com água ozonizada..	50
Figura 21 – Aplicação do sonic por 60s.....	50
Figura 22 - Coleta da cultura nos espécimes.....	51
Figura 23 - Colocação dos cones no tubo eppendorf.....	51
Figura 24 - Vortex Mixed.....	52
Figura 25 - Coleta de 1ml do material após o vortex.....	52
Figura 26 - Diluição nos tubos de ensaio.....	52
Figura 27 - Coleta no tubo de ensaio para confecção da placa.....	53
Figura 28 - Deposição da cultura de <i>E. faecalis</i> na placa.....	53
Figura 29 - Desenho da placa.....	53
Figura 30 - Contagem das UFCs.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1. SELEÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES UTILIZADOS.....	24
2.2. CULTURA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	26
2.3. METODOLOGIA PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	26
2.4. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	27
2.5. GRUPOS CONTROLE.....	27
2.6. METODOLOGIA DE APLICAÇÃO DO LED, TEMPO PRÉ- IRRADIAÇÃO E AGENTE FOTOSSENSIBILIZADOR.....	27
2.7. PRODUÇÃO DA ÁGUA OZONIZADA.....	28
2.8. APLICAÇÃO DO SONIC.....	28
2.9. COLETAS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	29
3.0. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
3.1. RESULTADOS.....	30
4. DISCUSSÃO.....	33
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	37
7. ANEXO.....	42
7.1. METODOLOGIA DETALHADA.....	43
7.2. PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	55
7.3. NORMAS DA REVISTA: <i>PHOTODIAGNOSIS AND</i>	

PHOTODYNAMIC THERAPY.....58

CAPÍTULO 1

Nunes IAM. Ação antimicrobiana da água ozonizada associada a terapia fotodinâmica com eritrosina em canais infectados com *Enterococcus faecalis* [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2020.

RESUMO

O principal objetivo do tratamento endodôntico é erradicar ou reduzir substancialmente a carga microbiana no canal radicular. Portanto, novos protocolos são constantemente testados na busca da completa desinfecção dos canais radiculares. Este trabalho avaliou o efeito antimicrobiano da água ozonizada associada a terapia fotodinâmica (TFD), além da ação do Sonic, no combate de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares **Métodos:** 70 canais unirradiculares de dentes de humanos foram preparados e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. Os dentes foram divididos em seis grupos de tratamento experimentais (n=10): água ozonizada sem sonic (O+S-), água ozonizada com sonic (O+S+), TFD sem sonic (TFD+S-), TFD com sonic (TFD+S+), TFD + água ozonizada sem sonic (O+TFD+S-), TFD + água ozonizada com sonic (O+TFD+S+) e dois grupos controle: positivo (n=5) e negativo (n=5). Foram realizadas coletas microbianas antes e após o tratamento, contadas em log das unidades formadoras de colônias (log UFC mL⁻¹) e testado se havia diferença significativa entre essas contagens (teste T de Student). O teste Anova two way, com post hoc de Tukey, foi empregado para avaliar a redução microbiana nos grupos tratados com Ozônio, TFD e na associação Ozônio+TFD e para determinar se o emprego do Sonic alterou a redução de microrganismos. **Resultado:** Em todos os protocolos

houve redução microbiana considerável ($p=0,025$), sendo que nos grupos em que foram empregados o Sonic a redução microbiana foi significativamente maior ($p=0,001$). **Conclusão:** Os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de microrganismos nos canais radiculares. O emprego do Sonic ajudou a aumentar a redução microbiana de canais radiculares infectados.

Descritores: Água ozonizada. Terapia Fotodinâmica. *Enterococcus faecalis*.

INTRODUÇÃO

O principal objetivo do tratamento endodôntico é erradicar ou reduzir substancialmente a carga microbiana no canal radicular (1-4), no entanto, a presença do biofilme bacteriano dentro dos canais radiculares é uma importante preocupação na endodontia e está diretamente relacionada ao índice de sucesso dos tratamentos endodônticos (5,6). Nesse sentido, o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) causa até 70% das falhas endodônticas devido à sua capacidade de formar biofilmes, bem como sua alta resistência aos irrigantes endodônticos (7-9).

Os irrigantes endodônticos devem exibir uma poderosa atividade antimicrobiana, fornecerem desinfecção suficiente do canal radicular, bem como um efeito de dissolver remanescentes dos tecidos orgânicos, e não terem nenhum efeito citotóxico nos tecidos perirradiculares (10,11). O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante de escolha devido aos seus grandes efeitos antibacterianos e à dissolução de tecidos (12,13), mas o NaOCl é tóxico em altas concentrações (14), além de enfraquecer a dentina, reduzindo sua resistência flexural e resiliência, tornando o dente mais suscetível à deformação e possivelmente fraturas (15-17). Assim, a procura por métodos alternativos que promovam a completa desinfecção dos canais radiculares sem diminuir a essa resistência é uma constante.

Há que se considerar que muitas vezes só o preparo químico-mecânico não parece ser eficiente na remoção de remanescentes orgânicos e inorgânicos dos canais radiculares. Dessa forma, durante a modelagem do canal radicular, a limpeza pode ser complementada por técnicas de agitação da solução irrigadora, como irrigação passiva ultrassônica e irrigação sônica (18). Segundo Ahmad et al. (1997) (19), uma maneira adequada de limpeza é a irrigação sônica, que opera numa frequência mais baixa (1-6 KHz) e produz menores tensões de cisalhamento numa alta amplitude.

A TFD tem se tornado um método alternativo para potencializar a desinfecção de canais radiculares (5,20,21). A TFD alcança resultados positivos utilizando um agente fotossensibilizador (FS) não-tóxico, sensível a um comprimento de luz específico, que produz oxigênio reativo citotóxico a algumas espécies de microrganismos, e promove eficiente redução microbiana (22,23). No entanto, para que a TFD seja efetiva, é imprescindível que a fonte de luz interaja com o agente FS. Por tanto, a escolha da fonte de luz depende especialmente do FS que será utilizado.

Nesse sentido a eritrosina é um agente FS bastante utilizado devido a sua baixa toxicidade, efetividade para inibir a atividade de microrganismos orais Gram-positivos e Gram-negativos, aprovada pela FDA (*Food e Drug Association*) para uso em produtos alimentícios e também aprovada para uso em odontologia, o que

facilita sua aplicação clínica (24,25). Além disso, apresenta um pico de absorção muito próximo da emissão das fontes de luz utilizadas em consultórios odontológicos (fontes de luz LED ou halogênio com comprimentos de onda entre 500-550 nm), permitindo inclusão dessa prática no contexto odontológico (26).

Por outro lado, o ozônio (O₃) é um poderoso agente oxidante (11) usado na indústria da água para eliminar bactérias. A terapia com ozônio baseia-se no pressuposto de que o ozônio (O₃) se dissocia rapidamente na água e libera uma forma reativa de oxigênio que pode oxidar as células, apresentando eficácia antimicrobiana sem induzir a resistência aos irrigantes (27).

Além disso, uma das propriedades cruciais do ozônio aquoso é a sua não toxicidade para células orais in vitro, e é menos tóxico do que todos os outros irrigantes conhecidos (28).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antimicrobiana da água ozonizada associada a terapia fotodinâmica com eritrosina em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis* utilizando ativação sônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e Padronização dos espécimes utilizados

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade CEUMA (UNICEUMA), sob Parecer de nº 2.868.372, foram utilizados 70 dentes unirradiculados extraídos de humanos (incisivos e caninos), obtidos através do termo de doação de dentes.

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

Com o objetivo de confirmar a patência apical, foi realizada a exploração do canal radicular com uma lima tipo K #10 (Dentsply-Sirona, Ballaigues, Suíça), até o comprimento real de trabalho (CRT), que foi padronizado em 12 mm para todos os dentes. A instrumentação dos canais radiculares foi realizada com o sistema Reciproc® (VDW, Munich, Germany) com instrumento R40. Para a irrigação foram utilizados 2 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%, e a aspiração realizada por meio de pontas NaviTip® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) utilizando Kit de irrigação-aspiração (Ultradent, South Jordan, UT, EUA). Terminada a instrumentação, os canais radiculares foram irrigados com 1 mL de EDTA 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) agitado com auxílio de uma lima manual por 3 minutos, e ao final do preparo, o canal foi novamente irrigado com 3 mL de soro fisiológico.

Após isso, todos os dentes foram mantidos em soro fisiológico estéril com trocas diárias durante 5 dias para remoção do hipoclorito de sódio residual. Após este período, os dentes foram vedados apicalmente com resina composta fotopolimerizável Opallis® (FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e impermeabilizados externamente com duas camadas de esmalte de unha (Procosa Produtos de Beleza Ltda., São Paulo/SP, Brasil). Os dentes foram novamente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Cultura de *Enterococcus faecalis*

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

Metodologia para formação de biofilme de *Enterococcus faecalis*

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

Distribuição dos grupos experimentais

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com as variáveis de interesse. Grupo de tratamento (Ozônio, TFD, Ozônio+TFD) e a utilização ou não do Sonic. A distribuição foi realizadas de acordo com a na tabela 1.

Tabela 1. Divisão dos grupos de acordo com os grupos experimentais.

	Ozônio		TFD		Ozônio+TFD	
	Sem Sonic	Com Sonic	Sem Sonic	Com Sonic	Sem Sonic	Com Sonic
n	10	10	10	10	10	10

Grupos controles

Para o controle positivo (n=5) foi utilizado 2,5 % de NaOCl, enquanto para o controle negativo (n=5) os espécimes receberam apenas a contaminação pela suspensão de *E. faecalis*.

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

Para a realização da TFD, um mesmo operador utilizou o LED de alta intensidade (Valo, Ultradent, UT, EUA), com comprimento de onda entre 500 e 550 nm, ajustado na potência *Xtra Power* (3200 mW/cm²), posicionado e acionado na entrada do canal, região cervical do dente, e foram realizadas 20 aplicações seguidas de 3 segundos cada, totalizando 1 minuto.

A eritrosina B (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA), na concentração de 200 µM, foi utilizada como agente fotossensibilizador, com tempo de pré-irradiação de 5 minutos.

Produção de água ozonizada

Foi utilizado um gerador de ozônio (Medplus MX, Philozon Eletroterapia, SC, Brasil). Para produção da água ozonizada, foi utilizada 250 mL de água destilada autoclavada em um sistema com tubo de vidro acoplado ao gerador de ozônio, no qual foi borbulhado o gás na água, produzindo assim 40 ppm de água ozonizada.

Aplicação do Sonic

Para a aplicação do Sonic, um mesmo operador utilizou o EndoActivator (Dentsply-Sirona, Ballaigues, Suíça), no modo High, com uma ponta 25/04 (medium). Após o preenchimento do canal radicular com solução aquosa de ozônio ou eritrosina estes eram agitados com vibração sônica com movimentos de vai-e-vem até 2 mm do comprimento de trabalho, sendo que foram realizadas duas aplicações de 30s cada, totalizando 60s de aplicação.

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 os tratamentos. Ambas foram realizadas utilizando dois cones de papel absorventes estéreis #40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) após os canais radiculares terem sido previamente preenchidos com solução salina estéril. Os cones utilizados foram transferidos para tubos eppendorf de polipropileno (Cral, São Paulo / SP, Brasil) com 1,5 mL de solução salina estéril e agitados (Vortex AP 56, Phoenix, EUA) durante 1 minuto, sendo, posteriormente, realizadas diluições decimais seriadas e semeadas em placas de petri com meio TSA em triplicata. As placas foram incubadas em microaerofilia a 37° C durante 48 horas. Os resultados foram obtidos por meio da contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹) e transformados em logaritmo (log₁₀ UFC/mL).

Análise estatística

Após a constatação que os dados apresentavam distribuição normal (Shapiro Wilk, $p > 0,05$), o teste T de Student foi empregado para testar se havia diferença significativa dentro dos grupos entre as contagens de microrganismos inicial e após o tratamento.

Os valores de redução microbiana foram calculados diminuindo os valores iniciais dos valores finais de contagem microbiana e o teste Anova two way, com post hoc de Tukey, foi empregado para avaliar se havia diferença significativa na redução microbiana entre os grupos (Ozônio, TFD e associação Ozônio+TFD) e para determinar se o emprego do Sonic alterava a redução de microrganismos.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS 26.0 (IBM, Armonk, NY, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

A Tabela 2 mostra os valores médios (desvio padrão) de log de UFC/mL dos grupos obtidos nos dois momentos de avaliação. Houve diferença significativa entre os valores iniciais e finais da quantidade de microrganismos nos canais radiculares (log UFC/mL) em todos os grupos.

A figura 1 representa um gráfico de linhas evidenciando os valores médios de redução microbiana, em log de UFC/mL, juntamente com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, de acordo com os grupos avaliados e o emprego ou não do Sonic.

O resultado da Anova Two way mostrou que houve diferença entre os grupos ($p=0,025$) e o emprego do Sonic fez com que os valores médios de redução microbiana aumentassem significativamente ($p=0,001$). No entanto, as interações (Grupo de tratamento e o emprego do Sonic) não foram significativas ($p=0,220$), ou seja, os fatores agiram de forma independentes sobre a redução dos microrganismos.

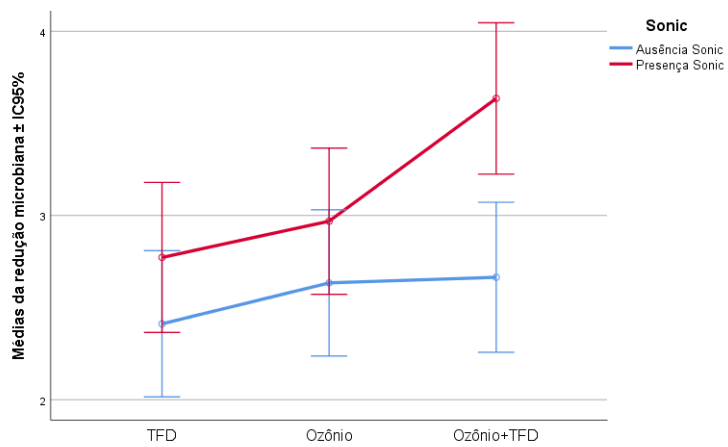
Na comparação dois a dois entre os grupos, constatou-se que, enquanto o grupo Ozônio+TFD foi diferente significativamente do grupo do TFD ($p<0,05$), este não apresentou diferença para o grupo de Ozônio ($p>0,05$).

Tabela 2. Valores médios (desvio padrão) de log UFC/mL nos diferentes grupos nos dois momentos de avaliação.

	O+S-	O+S+	TFD+S-	TFD+S+	O+TFD+S-	O+TFD+S+
Inicial	4,71 ($\pm 0,15$)	4,86 ($\pm 0,12$)	4,40 ($\pm 0,18$)	4,51 ($\pm 0,19$)	4,64 ($\pm 0,12$)	4,93 ($\pm 0,39$)
Pós-tratamento	2,57 ($\pm 0,52$)	2,39 ($\pm 0,54$)	2,48 ($\pm 0,29$)	2,16 ($\pm 0,33$)	2,62 ($\pm 0,80$)	2,01 ($\pm 0,85$)
<i>p</i> -valor	0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,036	0,031

O=Ozônio, TFD=Terapia Fotodinâmica, S= Sonic, + =Presença, - =Ausência.
 $P<0,05$ = diferença estatística significativa entre os valores médios iniciais e pós-tratamento dentro de cada grupo.

Figura 1 - Comportamento dos valores médios (intervalo de confiança de 95%) de redução microbiana expressa em log UFC/mL de acordo com os grupos avaliados e o emprego ou não do sonic.



DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a ação antimicrobiana da água ozonizada associada a terapia fotodinâmica com eritrosina em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis* utilizando ativação sônica. Todos os grupos conseguiram uma redução microbiana significativa, porém em nenhum dos grupos houve a completa eliminação.

Embora se saiba que a infecção de um canal radicular é muitas vezes caracterizada por um biofilme de múltiplas espécies, foi utilizado nesse estudo um biofilme de *E. faecalis*, principalmente, por ser o principal patógeno responsável pela falha do tratamento endodôntico (29) e pela sua capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e colonizar o sistema de canais radiculares e formar biofilme (30).

O período de 14 ou 21 dias, é um tempo suficiente para a formação de biofilme de *E. faecalis* no substrato dentinário (31), por esse motivo foi adotado um período de cultura de 21 dias, permitindo o crescimento bacteriano e garantindo que os protocolos de descontaminação pudessem ser testados.

A terapia endodôntica tradicional não é capaz de promover a esterilização do sistema radicular (32). Neste estudo, foram utilizadas duas terapias complementares na tentativa de encontrar um protocolo eficaz no combate a infecções endodônticas causadas pelo *E. faecalis*. A TFD foi realizada com a aplicação da eritrosina (200 µM),

como FS, sensibilizada com LED de alta intensidade com comprimento de onda entre 500 – 550 nm, faixa de maior absorção da eritrosina (33). O LED foi utilizado em sua potência máxima (3200 mW/cm²), durante 60 segundos. Apesar da TFD ter apresentado resultados significativos para redução bacteriana do canal radicular, esta não conseguiu zerar o crescimento microbiano. Diferentemente, Borba et al. (2017) (34) conseguiram uma redução de 100% do *E. faecalis* usando um LED de alta potência e eritrosina. Tal resultado discordante provavelmente deve-se as diferenças metodológicas entre os estudos. Enquanto Borba et al. (2017) (34), utilizou *E. faecalis* em forma planctônica e um tempo de exposição de 120 segundos, neste estudo foi utilizado o microrganismo em forma de biofilme e um menor tempo de exposição.

O ozônio foi sugerido para o tratamento endodôntico devido sua alta ação antimicrobiana (35,36) e por apresentar um decréscimo significativo na citotoxicidade para células de mucosa oral em comparação com soluções irrigantes de NaOCl a 2,25% e de clorexidina a 2% (37,38). Embora a redução bacteriana tenha alcançado níveis significativos com o ozônio, não foi capaz de produzir resultados semelhantes aos de Silva et al. (2020) (39), que utilizou uma concentração de 16 ppm de solução aquosa de ozônio ativada com técnica de irrigação ultrassônica, o qual alcançou uma redução de 100%. Possivelmente a diferença entre os resultados se deve ao

tempo de aplicação utilizado. Enquanto Silva et al. (2020) (39) utilizou o tempo de 180s, neste estudo foi utilizado 60s.

A associação TFD + ozonioterapia alcançou os maiores valores médios de redução apresentando-se superior a terapia de ozônio somente. No entanto, em nenhum grupo houve a redução completa do *E. faecalis*.

Quando foi empregado o Sonic, os grupos alcançaram maiores valores médios de redução microbiana. Esse resultado está de acordo com o estudo de Eggmann et al. (2020) (40) que constataram um impacto significativo da irrigação sônica sobre a redução microbiana em canais infectados com *E. faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii* e *Actinomyces oris*. Plotino et al. (2019) (41) avaliaram a eficácia dos sistemas sônico e ultrassônico e concluíram que o sistema ultrassônico foram mais eficazes na remoção de restos de tecido pulpar e dentina que o sistema sônico, porém, deformavam o canal radicular. Por esse motivo optou-se usar o método sônico, evitando o risco de deformação do canal radicular.

Embora diversos estudos mostraram a eficácia do uso da TFD (42,43) e da ozonioterapia (32), em nenhum foi avaliado o efeito da associação entre essas técnicas. O presente estudo mostrou que a associação TFD e ozonioterapia pode ser uma alternativa em um tratamento endodôntico.

Este estudo mostrou que os protocolos utilizados foram capazes de reduzir a contagem microbiana, no entanto recomenda-se que outros parâmetros em relação a propriedade da luz empregada, tempo de exposição, fotossensibilizadores, concentração de ozônio e da técnica de aplicação sejam testados para buscar resultados mais satisfatório tanto da TFD utilizando eritrosina quanto da água ozonizada.

CONCLUSÃO

Todos os tratamentos testados foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de microrganismos nos canais radiculares, especialmente quando utilizado o Sonic. A associação ozônio + terapia fotodinâmica com eritrosina a 200 μ M atingiu o maior valor médio de redução microbiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Feb;99(2):231-52.
2. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J.* 2008 41(3):227–39.
3. 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 Mar;39(3):4114.
4. Samiei M, Pakdel SM, Rikhtegaran S, Shakoei S, Ebrahimpour D, Taghavi P. Scanning electron microscopy comparison of the cleaning efficacy of a root canal system by Nd:YAG laser and rotary instruments. *Microsc Microanal.* 2014 Aug;20(4):1240-5.
5. Arneiro RA, Nakano RD, Antunes LA, Ferreira GB, Fontes K, Antunes LS. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Oral Sci.* 2014 Dec;56(4):277-85.
6. Estrela C, Holland R, Estrela CR, Alencar AH, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. *Braz Dent J.* 2014 Jan-Feb;25(1):3-11.
7. Ran S, Wang J, Jiang W, Zhu C, Liang J, Assessment of dentinal tubule invasion capacity of *Enterococcus faecalis* under stress conditions ex vivo. *Int Endod J.* 2015 Mai;48:362–372.
8. Pandey V, Choudhary I, Kumar V, Tripathi P, Misra A, Bagde H, Assessment of correlation between clinical parameters and pulp canal pathogens in endodontic pathologies: a microbiological study. *J Contemp Dent Pract.* 2016;17:654–658.
9. Pourhajbagher M, Kazemian H, Chiniforush N, Hosseini N, Pourakbari B, Azizollahi A, et al. SC. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms

of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy photodiagn. *Photodyn Ther.* 2018.

10. Harrison JW, Hand RE. The effect of dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 1981;(7): 128–32.

11. Zan R, Hubbezoglu I, Sumer Z, Tunc T, Tanalp J. Antibacterial effects of two different types of laser and aqueous ozone against *Enterococcus faecalis* in root canals. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(4):150–4.

12. Fidalgo TK da S, Barcelos R, Portela MB, Soares RM de A, Gleiser R, Silva-Filho FC. Inhibitory activity of root canal irrigants against *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Braz Oral Res.* 2010;24(4):406–12.

13. Nelakantan P, Herrera DR, Pecorari VGA, Gomes B. Endotoxin levels after chemomechanical preparation of root canals with sodium hypochlorite or chlorhexidine: a systematic review of clinical trials and meta-analysis. *Int Endod J.* 2019;52:19-27.

14. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, & Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-117.

15. Grigoratos D, Knowles J, Ng Y, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J.* 2001;34:113–119.

16. Sim TPC, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J.* 2001;34(2):120–132.

17. Souza EM, Quadros JRP, Silva EJNL, De-Deus G, Belladonna FG, Maia Filho EM. Volume and/or Time of NaOCl influences the fracture strength of endodontically treated bovine teeth. *Braz Dent J.* 2019;30(1):31–35.

18- Gu L, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod* 2009; 35(6):791-804.

- 19- Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: An insight into the mechanisms involved. *J Endod* 1987; 13:93-101.
20. Fonseca MB, Júnior OT, Pallota RC, Filho H F, Denardin OVP, Rapoport A, Ricardo ALF. Photodynamic therapy for root canals infected with enterococcus faecalis. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(3):209–213.
21. Pinheiro SL, Silva JN, Gonçalves RO, Villalpando KT. Manual and rotary instrumentation ability to reduce *Enterococcus faecalis* associated with photodynamic therapy in deciduous molars. *Braz Dent J*. 2014;25(6):502-507.
22. Rossoni RD, Junqueira JC, Santos ELS, Costa ACB, Jorge AOC. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against *Enterobacteriaceae*. *Lasers Med Sci*. 2010;25(4):581–6.
23. Junqueira JC, Ribeiro MA, Rossoni RD, Barbosa JO, Querido SMR, Jorge AOC. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Photodynamic antimicrobial effects of Malachite Green on *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, and *Candida*. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):67-72.
24. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007;39:59-66.
25. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. 2006;(February):680–4.
26. Paschoal MAB, Leite HLA, Gonçalves LM, Romão IQ, Branco-de-Almeida LS, Cavalcante SIA. Effect of combining Erythrosine with a High-Power Dental curing light appliance on the viability of a planktonic culture of *Streptococcus mutans*. *Photomed Laser Surg*. 2018;36(12):676–9.
27. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod*. 2012;38:523-6.

28. Huth KC, Jakob FM, Saugel B. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *European Journal of Oral Sciences*. 2006;114:435–40.
29. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. 2013 March;12(3):7257.
30. Souza AM, Dalla Lana D, Gabrielli E, Barbosa RM, Miyagaki DC, Cecchin D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017;17: 92–97.
31. Guerreiro TJM, Farias Júnior NB, Duarte MAH, Ordinola ZR, Graeff MSZ, Tanomaru Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod*. 2013;39(3):346–350.
32. Nogales CG, Ferreira MB, Montemor AF, Rodrigues MFA, Marques JL. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological – ex vivo study and cytotoxicity analyses. *Journal of Applied Oral Science*. 2016;24(6): 607–613.
33. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosin-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:190–192.
34. Borba, ASM, Silva PS M, Borba MCM, Paschoal MAB, de Jesus Tavares RR, de Castro RC, Maia Filho EM. Photodynamic therapy with high-power LED mediated by erythrosine eliminates *Enterococcus faecalis* in planktonic forms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017;19: 348–351.
35. Huth KC, Quirling M, Maier S. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J*. 2009; 42:3 –13.
36. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod*. 2004;30:778–81.
37. Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA Jr. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*. 1988; 263:1665–75.
38. Filippi A. The effects of ozonized water on epithelial wound healing (in German). *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*. 2001; 56:104–8.

39. Silva EJNL, Prado MC, Soares DN, Hecksher F, Martins JNR, Fidalgo TKS. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. *Int Endod J.* 2019.

40. Eggmann F, Vokac Y, Eick S, Neuhaus KW. Sonic irrigant activation for root canal disinfection: power modes matter! *BMC Oral Health.* 2020;20(1).

41- Plotino, G., Grande, N. M., Mercade, M., Cortese, T., Staffoli, S., Gambarini, G., & Testarelli, L.. *Efficacy of sonic and ultrasonic irrigation devices in the removal of debris from canal irregularities in artificial root canals. Journal of Applied Oral Science.*2019 27(0).

42. 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: 469-473.

43. Xhevdet A, Stubljär D, Kriznar I, Jukic T, Skvarc M, Veranic P. The disinfecting efficacy of root canals with laser photodynamic therapy. *J Lasers Med Sci.* 2014;5:19-26.

ANEXOS

ANEXO 1 - METODOLOGIA DETALHADA

1.1 - Seleção e Padronização dos espécimes utilizados

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

Após aprovação, foram selecionados 70 dentes humanos unirradiculares extraídos (incisivos e caninos superiores). Todos possuíam canais retos, sem obturação endodôntica, fratura ou reabsorções internas ou externas. Os dentes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Suas coroas foram seccionadas por máquina de precisão de corte Isomet 1000 (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), estabelecendo um comprimento de raiz padronizado em 13 mm.



Figura 2 - máquina de precisão de corte Isomet

Figura 3 – 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, Ballaiques, Suíça), até o comprimento real de trabalho (CRT), que ficou em 12 mm para todos os dentes.



Figura 4 – verificação da patência apical

Figura 5 – CRT

A instrumentação dos canais radiculares foi realizada com o sistema rotatório Reciproc® (VDW, Munich, Germany) com uso da lima R40.



Figura 6 - Sistema Rotatório Reciproc® (VDW, Munich, Germany)

Figura 7 – calibração lima R40



Figura 8 – instrumentação com rotatório



Figura 9 – padrão de instrumentação

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

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

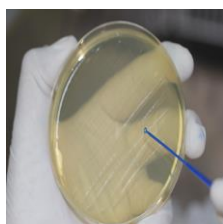


Figura 10 – Capela de lâmina de fluxo

Figura 11 – coleta de *E. faecalis*

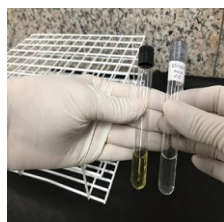
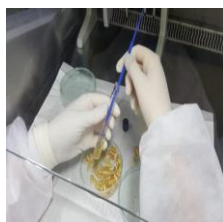


Figura 12 – ajuste da densidade óptica

Figura 13 – comparativo da densidade com Escala de Macfarland 0,5

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

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

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

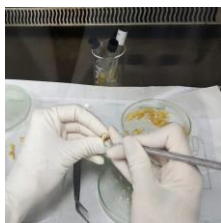


Figura 14 – bolinha de algodão



Figura 15 – jarra utilizada para ambiente microaerófilo



Figura 16 – estufa bacteriológica a 37°C

1.4 - Distribuição dos grupos experimentais

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Divisão dos grupos de acordo com os grupos experimentais.

	Ozônio		TFD		Ozônio+TFD	
	Sem Sonic	Com Sonic	Sem Sonic	Com Sonic	Sem Sonic	Com Sonic
n	10	10	10	10	10	10

1.5 - Grupos controles

Para o controle positivo (n=5) foi utilizado 2,5 % de NaOCl, enquanto para o controle negativo (n=5) os espécimes receberam apenas a contaminação pela suspensão de *E. faecalis*.

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

Para a realização da TFD, um mesmo operador utilizou o LED de alta intensidade (Valo, Ultradent, UT, EUA), com comprimento de onda entre 500 e 550 nm, ajustado na potência *Xtra Power* (3200 mW/cm²), posicionado e acionado na entrada do canal, região cervical do dente, e foram realizadas 20 aplicações seguidas de 3 segundos cada, totalizando 1 minuto.

A eritrosina B (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA), na concentração de 200 µM, foi utilizada como agente fotossensibilizador, com tempo de pré-irradiação de 5 minutos.



Figura 17– preenchimento do canal radicular com eritrosina.



Figura 18 – aplicação da fonte de luz

Produção de água ozonizada

Foi utilizado um gerador de ozônio (Medplus MX, Philozon Eletroterapia, SC, Brasil). Para produção da água ozonizada, foi utilizada 250 mL de água destilada autoclavada em um sistema com tubo de vidro acoplado ao gerador de ozônio, no qual foi borbulhado o gás na água, produzindo assim 40 ppm de água ozonizada (concentração do ozônio).



Figura 19 – produção da água ozonizada.

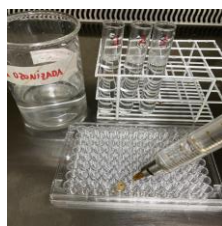


Figura 20 – preenchimento do canal radicular com água ozonizada.

Aplicação do Sonic

Para a aplicação do Sonic, um mesmo operador utilizou o EndoActivator (Dentsply-Sirona, Ballaigues, Suíça), no modo high, com uma ponta 25/04 (medium). Após o preenchimento do canal radicular com solução aquosa de ozônio e/ou eritrosina estes eram agitados com vibração sônica com movimentos de vai-e-vém até 2 mm do comprimento de trabalho com duração de 60 s, sendo que, após os 30 s iniciais o canal radicular era novamente preenchido com a solução aquosa de ozônio e/ou eritrosina.



Figura 21 – aplicação do sonic por 60s.

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 os tratamentos. 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.

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

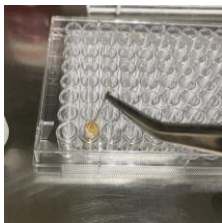


Figura 22 – coleta da cultura nos espécimes

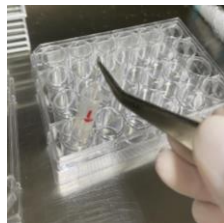


Figura 23 – colocação dos cones no tubo eppendorf



Figura 24 – Vortex Mixer

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

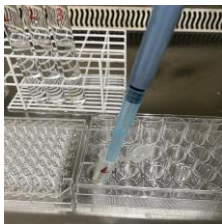


Figura 25 – coleta de 1ml do material após o vortex

Figura 26 – diluição nos tubos de ensaio

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} .

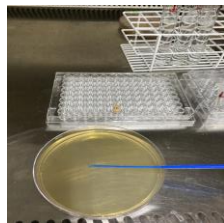
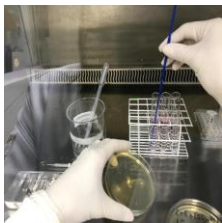


Figura 27 – coleta no tubo de ensaio para confecção da placa.

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

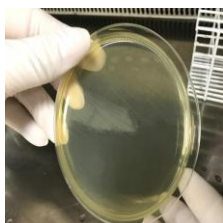


Figura 29 – desenho da placa.

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).

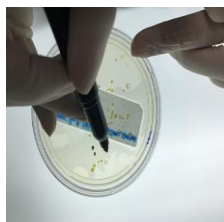


Figura 30 – contagem das UFCs.

1.9 - Análise estatística

Após a constatação que os dados apresentavam distribuição normal (Shapiro Wilk, $p > 0,05$), o teste T de Student foi empregado para testar se havia diferença significativa dentro dos grupos entre as contagens de microrganismos inicial e após o tratamento.

Os valores de redução microbiana foram calculados diminuindo os valores iniciais dos valores finais de contagem

microbiana e o teste Anova two way, com post hoc de Tukey, foi empregado para avaliar se a redução microbiana, nos grupos tratados com Ozônio, TFD e a associação Ozônio+TFD se diferenciaram significativamente, e para determinar se o emprego do Sonic foi um fator que alterou a redução de microrganismos.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS 26.0 (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 apesar com aplicação do LED, outro apenas com aplicação do Laser, outro com TFD (terapia fotodinâmica) com LED e eritrosina, outro com TFD com LED e azul de metileno, outro com TFD com Laser e eritrosina, outro com TFD com Laser e azul de metileno. Haverá dois grupos controle, um positivo (n=5) onde os espécimes receberão somente a contaminação pela suspensão de *E. faecalis*, e outro negativo (n=5) apenas com meio de cultura estéril. O Laser será

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



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA



Continuação do Parecer: 1.068.372

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá apresentar a este cep relatório final da pesquisa

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PI_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1109671.pdf	15/08/2018 15:41:29		Aceito

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



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA



Continuação do Parecer: 1.818.372

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 02 de Setembro de 2018

Assinado por:
RUDYS RODOLFO DE JESUS TAVAREZ
(Coordenador)

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

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

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

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

Emeritus Editor

K. Moghissi, Yorkshire Laser Centre, Goole, UK

Associate Editors

H. Barr, Gloucester, UK

R. Boyle, Hull, UK

K. Dixon, Goole, UK

M. Eljamel, Lanark, UK

L. Freitag, Hemer, Germany

K. Furukawa, Tokyo, Japan

R. Hamblin, Boston, Massachusetts, USA

C. Hopper, Bromley, UK

Z. Huang, Lakewood, Colorado, USA

H. Kato, Tokyo, Japan

T. Mang, Orchard Park, New York, USA

H. Moseley, Dundee, UK

L. Turnbull, Hull, UK

H. Walt, Zurich, Switzerland

H. Wolfson, Jacksonville, Florida, USA

Editorial Board

M. Adamek, Katowice, Poland

A. Akopov, St. Petersburg, Russian Federation

D. Allan, Manchester, UK

E. Allan, Knutsford, UK

P. Barber, Dundee, UK

A. Batlle, Buenos Aires, Brazil

K. Berg, Oslo, Norway

G. Downie, Mount Pleasant, Texas, USA

R. Fekrazad, Tehran, Iran

L. Gasparyan, Helsinki, Finland

G. Gasser, Zurich, Switzerland

P. Hillemanns, Hannover, Germany

T. Horvath, Brno, Czech Republic

S. Ibbotson, Dundee, UK

P. Jichlinski, Lausanne, Switzerland

A. Juzeniene, Oslo, Norway

N. Kashef, Tehran, Iran

H. Kostron, Innsbruck, Austria

S. Ledcire, Rouen, France

M. Leroy, Suresnes, France

L. Li, Guangzhou, China

A. Makela, Helsinki, Finland

S. Mordon, Loos, France

T. Nakamura, Tochigi, Japan

D. Robinson, Rotterdam, Netherlands

P. Ross, Columbus, Ohio, USA

A. Sieron, Bytom, Poland

W. Stummer, Munster, Germany

I.B. Tan, Amsterdam, Netherlands

A. Thorpe, Leeds, UK

R. Waideich, Munich, Germany

M. Wainwright, Liverpool, England, UK

X. Wang, Shanghai, China

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

P. Ziolkowski, Wroclaw, Poland

INTRODUCTION

Scope

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

Types of manuscript

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

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

Editorials

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

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

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

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

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

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

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

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

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

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

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Declaration of interest

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

Submission declaration and verification

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

Preprints

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

Use of inclusive language

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

Changes to authorship

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

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

Copyright

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

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

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

Author rights

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

Elsevier supports [responsible sharing](#)

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

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

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

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

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

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

• No open access publication fee payable by authors.

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

Gold open access

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

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

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

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

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

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

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

Green open access

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

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

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

Language (usage and editing services)

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

Submission

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

Referees

Referees

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

Revised version of the manuscript

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

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

PREPARATION

Style

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

References

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

Peer review

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

Open access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

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

2. Subscription

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

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

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

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

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

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

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

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

Layout of manuscript

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

Essential title page information

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gene Accession Numbers

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

Supplementary data

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

Highlights

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

Graphical abstract

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

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

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Electronic artwork

General points

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

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

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

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

Color artwork

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

Reference links

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

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

Data references

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

Reference management software

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

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

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

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

Reference formatting

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

Reference style

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

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a journal publication with an article number:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

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

Reference to a dataset:

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

Data visualization

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

Research data

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

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

Data linking

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

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

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

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

Mendeley Data

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

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

Data statement

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

Process of submission

Online submission

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

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

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

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

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

Offprints

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

AUTHOR INQUIRIES

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

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