



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**GABRIELLA DE VASCONCELOS NEVES**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA  
DESINFECÇÃO DOS CANAIS RADICULARES ASSOCIADA A DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO**

**Campina Grande-PB  
2018**

**GABRIELLA DE VASCONCELOS NEVES**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA  
DESINFECÇÃO DOS CANAIS RADICULARES ASSOCIADA A DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes

Co-orientadora: Profa. Dra. Kátia Simone Alves dos Santos

**Campina Grande-PB  
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

N511a Neves, Gabriella de Vasconcelos.  
Atividade antibacteriana da terapia fotodinâmica na desinfecção dos canais radiculares associada a diferentes protocolos de irrigação [manuscrito] / Gabriella de Vasconcelos Neves. - 2018.  
71 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.  
"Orientação : Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."  
"Coorientação: Profa. Dra. Kátia Simone Alves dos Santos, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."  
1. Fotoquimioterapia. 2. Enterococcus faecalis. 3. Endodontia. 4. Odontologia clínica. I. Título  
21. ed. CDD 617.6

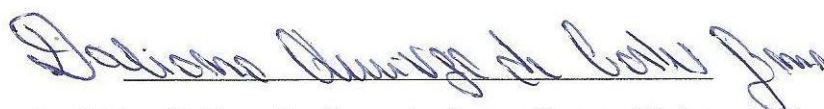
**GABRIELLA DE VASCONCELOS NEVES**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA  
DESINFECÇÃO DOS CANAIS RADICULARES ASSOCIADA A DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia da Universidade  
Estadual da Paraíba como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Odontologia**

**Aprovada em: 09/07/2018**

**BANCA EXAMINADORA**




Prof. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (1º Examinador)

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dra. Ana Marly Araújo Maia (2ª Examinadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

*À Deus, por ser a minha base e me rodear de amor todos os dias.*

## Agradecimentos

A Deus, por me dar força e saúde para a realização dos meus sonhos. Acredito que sem Ele, NADA disso seria possível. Agradeço pela família e amigos que Ele me deu, pelos erros e acertos que Ele permitiu que acontecesse na minha vida, tudo isso para me transformar em quem sou hoje.

Aos meus pais, Patrícia e Josidark, pelo cuidado, zelo e proteção todos os dias. Obrigada pelos valores transmitidos, pela educação que recebi, essenciais na minha formação. Eu reconheço todo o esforço e abdicção de vocês para a realização dos meus sonhos. Muito obrigada!!! Amo vocês, painho e mainha!!

À minha segunda mãe que Deus me deu aqui na terra, Veronilza (“Aia”). Você cuidou de mim até os meus 12 anos e, juntamente com meus pais, me educou, me deu amor e todo carinho que precisei. Sou eternamente grata por tudo que fez por mim e por minha família. Você tem parte em tudo que sou hoje. Que Deus te recompense e te proteja todos os dias da sua vida! Te amo, Aia!!!

Aos meus irmãos, Fernanda e Luiz, por terem dividido comigo os meus melhores momentos. Vocês são essenciais na minha vida e nas minhas conquistas. Neste momento passa um filme na minha cabeça de tudo que já vivemos juntos. Binha, você sempre quis ser minha mãe, tão responsável e dedicada, cuidava e cuida de mim como se eu fosse sua filha. Até hoje recorro a você quando preciso de um conselho, de um ombro amigo, pois você me entende e me ajuda como ninguém. Binho, você sempre foi meu companheiro. Temos tantas histórias pra contar, não é? Hoje, mesmo distante fisicamente, você está em meu coração. Queria cuidar de você todos os dias, mas sinto que nosso laço nunca se romperá. Amo vocês, Binha e Binho!!!

A toda minha família pelos momentos de alegria e por todo o apoio.

Ao meu amor, Maurício, por todo carinho e compreensão em todos os momentos em que mais precisei. Você é meu grande companheiro em todas as minhas realizações! Obrigada por cuidar tão bem de mim....Te amo muito!

À minha querida orientadora, Professora Daliana Queiroga, por ser o meu exemplo de amor à profissão e amor às pessoas. Além de uma excelente profissional e orientadora, é também um ser humano iluminado, de extrema bondade e dedicação no que faz. Alguém que eu posso contar em todos os momentos. Te agradeço por ter me dado tantas oportunidades, por ter acreditado em mim desde a graduação. Saiba que você foi uma das grandes responsáveis pelas minhas escolhas e conquistas. Amo você “Dali”!

A minha querida co-orientadora, Kátia dos Santos, por dentre tantos motivos, ter despertado o meu amor pela endodontia. Te admiro e me espelho em você desde a graduação. Obrigada por ter aceitado me orientar neste trabalho e por todo o apoio e amizade sempre que precisei! Gratidão!

A minha dupla de faculdade e melhor amigo, Pedro Tardelly, por todos os momentos vividos juntos e parceria de sempre. Ter sua amizade há tanto tempo é um presente de Deus! Te amo Pedrocão!!

Aos meus amigos que o mestrado me proporcionou, Waleska, Larissa, Elisa, Jussara, Robeci, Amanda, Ítalo, Adeilton, Gilderlânia, Thamires, Gal e Handerson, por todo companheirismo nestes dois anos.

Aos meus amigos de trabalho e da vida, em especial a Rodolpho, Larissa, Geisa, Amanda, Tomás, Danny, Érika, Dani e Neto. Vocês tornam os meus dias melhores! Amo vocês!

Aos alunos de iniciação científica, Rodrigo e Danylo, pela convivência e amizade durante a realização da pesquisa. As tardes e noites no laboratório ficaram mais leves porque eu tinha vocês perto de mim!

À Eveline por ter me apoiado desde o início na realização desta pesquisa. Muito obrigada pelos ensinamentos e paciência em me ensinar tudo que precisei no laboratório. Você foi essencial em todas as etapas!

À Professora Ana Cláudia Dantas, coordenadora do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM), por ter me cedido o mesmo para a realização desta pesquisa.

À Professora Dra. Luciana Gominho e a Professora Dra. Maria Helena Catão, componentes da banca examinadora do Exame de Qualificação, pelo tempo dispensado na avaliação deste trabalho com seriedade e critério.

Ao Professor Dr. Ricardo Castro e a Professora Dra. Ana Marly Maia por aceitarem o convite em participar da minha banca de dissertação. Sem dúvida, vocês tratam considerações que contribuirão para a melhoria do meu trabalho! Obrigada pela disponibilidade!!!

A todos os funcionários da Universidade Estadual da Paraíba, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Odontologia (PPGO), pela oportunidade de formação e pelo exercício de uma ciência transparente e responsável, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro aos alunos do Pibic que me ajudaram na realização desta pesquisa.

*....Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.*

*“Felicidade é um processo, não um objetivo. Desconstrua o conceito da chegada, e seja feliz no caminho.”*

*(Autor desconhecido)*



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana da terapia fotodinâmica associada a diferentes protocolos de irrigação no combate ao *Enterococcus faecalis* do sistema de canais radiculares. Tratou-se de um ensaio experimental, no qual um total de 80 pré-molares humanos unirradiculares foram preparados e contaminados com 0,1 mL de *E. faecalis* ( $3 \times 10^8$  cel/mL), por um período de quatro dias. Os dentes foram divididos aleatoriamente em cinco grupos com 15 dentes cada e um grupo controle negativo com 5 dentes: Grupo C+ (irrigação convencional com agulha); Grupo C – (controle negativo); Grupo TFD (terapia fotodinâmica); Grupo NaOCl + TFD (hipoclorito de sódio a 2,5% + terapia fotodinâmica); Grupo IUP + TFD (irrigação ultrassônica passiva + terapia fotodinâmica); Grupo XP Endo + TFD (XP Endo Finisher + terapia fotodinâmica). A fonte de luz utilizada foi um laser diodo de baixa intensidade, com comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW e uma energia de 9 J, por 90 segundos de irradiação. O corante utilizado foi o azul de metileno a 0,005 %. O conteúdo do canal foi coletado com pontas de papel absorvente estéreis em dois momentos: antes dos protocolos de descontaminação, e 24 horas após os protocolos. O número de unidades formadoras de colônias de *E. faecalis* (UFC) foi determinado para cada canal radicular. Os testes ANOVA e TUKEY foram utilizados, e o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). A porcentagem de inibição de crescimento variou de 10,72 (C-) a 100% (XP Endo + TFD), sendo os valores de UFC/mL diferentes entre todos os protocolos testados ( $p < 0,05$ ). Além disso, os diferentes protocolos testados influenciaram de modo significativo a inibição bacteriana ( $p < 0,05$ ). O protocolo que proporcionou maior percentual de inibição bacteriana foi o XP Endo + TFD (100,0%), seguido do NaOCl + TFD (65,85%) Após a realização deste estudo, concluiu-se que a TFD associada a diferentes protocolos de irrigação final foi mais eficaz na inibição de *E. faecalis* em relação ao seu uso isolado, sendo a XP Endo Finisher o melhor protocolo de irrigação no combate a este micro-organismo.

**Palavras-Chave:** Fotoquimioterapia, Biofilmes, *Enterococcus faecalis*, Endodontia.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate, in vitro, the antibacterial activity of photodynamic therapy associated with different irrigation protocols in the control of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) on the root canal system. It was an experimental trial in which a total of 80 unirradicular human premolars were prepared and contaminated with 0.1 ml of *E. faecalis* ( $3 \times 10^8$  cells / ml) for a four days period. The teeth were randomly divided into six groups: Group C + (conventional needle irrigation); Group C - (negative control); PDT group (photodynamic therapy); NaOCl + PDT group (2.5% sodium hypochlorite + photodynamic therapy); IUP + PDT group (passive ultrasonic irrigation + photodynamic therapy); XP Endo Group + PDT (XP Endo Finisher + photodynamic therapy). The light source used was a low-intensity diode laser with wavelength of 660 nm, power of 100 mW and energy of 9 J, for 90 seconds of irradiation. The dye used was 0.005% methylene blue. The contents of the root canal were collected with sterile absorbent paper tips in two moments: before the decontamination protocols and 24 hours after the protocols. The number of colony forming units of *E. faecalis* (CFU) was determined for each root canal. The ANOVA and TUKEY tests were used and the level of significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ). The percentage of inhibition ranged from 10.72 (C-) to 100% (XP Endo + TFD), and the values of CFU / mL were different among all the protocols tested ( $p < 0.05$ ). In addition, the different protocols tested significantly influenced bacterial inhibition ( $p < 0.05$ ). The protocol that provided the highest percentage of bacterial inhibition was XP Endo + PDT (100.0%), followed by NaOCl + PDT (65.85%). After this study, it was concluded that PDT associated with different protocols of final irrigation was more effective in inhibiting *E. faecalis* than in its isolated use, with XP Endo Finisher being the best irrigation protocol in the fight against this microorganism.

**Keywords:** Photochemotherapy, Biofilms, *Enterococcus faecalis*, Endodontics

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NaOCl	Hipoclorito de Sódio
LABDEM	Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
PQM	Preparo Químico-Mecânico
IUP	Irrigação Ultrassônica Passiva
TDF	Terapia Fotodinâmica
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
XP Endo	XP Endo Finisher

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Análise comparativa da quantidade de bactérias (UFC/mL) observadas nos diferentes tempos de avaliação de acordo com cada grupo experimental.

## LISTA DE FIGURAS

**Fig 1.** Etapas metodológicas do estudo.

**Fig 2.** Seleção e padronização dos espécimes.

**Fig 3.** Seção transversal dos espécimes na junção cimento-esmalte.

**Fig 4.** Banho ultrassônico prévio ao procedimento de contaminação

**Fig 5.** Culturas de *Enterococcus faecalis* em caldo de BHI

**Fig 6.** Câmara de fluxo laminar

**Fig 7.** Teste da bili-esculina/ formação do complexo negro.

**Fig 8.** A: Fotossensibilizador azul de metileno; B: Inserção do fotossensibilizador no interior do canal radicular.

**Fig 9.** Inserção da fibra óptica e ativação do fotossensibilizador pelo laser Diodo.

**Fig 10.** Agitação ultrassônica do hipoclorito de sódio.

**Fig 11.** A: Coleta microbiológica com cone de papel absorvente; B: Cones de papel transferidos para tubos de ensaio, C: Agitação dos cones de papel em vórtex.

## **LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1.** Grupos experimentais e controles do estudo.

**Quadro 2.** Parâmetros do Laser Diodo de Baixa Intensidade.

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>20</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Tipo e Local do Estudo.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Aspectos Éticos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Seleção e Padronização dos Espécimes.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Micro-organismos e Meio de Cultura.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Contaminação dos Espécimes com <i>Enterococcus faecalis</i>.....</b>	<b>23</b>
3.5.1 Prova da bili esculina.....	26
3.5.2 Prova de tolerância ao NaCl a 6,5% .....	26
<b>3.6 Distribuição dos Grupos.....</b>	<b>27</b>
<b>3.7 Coletas e Análise Microbiológicas.....</b>	<b>30</b>
<b>3.8 Análise Estatística.....</b>	<b>31</b>
<b>4 ARTIGO .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Apresentação.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Artigo a ser submetido.....</b>	<b>33</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>55</b>
	<b>57</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A infecção do sistema de canais radiculares é conhecida por conter bactérias e seus subprodutos, fluidos teciduais, dentina, matriz dentinária e remanescentes de tecido pulpar. Estes constituintes do canal radicular podem reduzir ou inibir completamente a atividade antibacteriana da solução irrigadora e da medicação intracanal (SIQUEIRA 2008, SILVA et al, 2010).

O objetivo principal do tratamento endodôntico, em dentes necrosados, é eliminar ou reduzir as populações bacterianas no interior do canal radicular a um nível que possa permitir a cicatrização do tecido perirradicular (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2008). No entanto, diversos fatores têm sido associados a falhas da terapia endodôntica, como a resistência dos micro-organismos ao tratamento e à medicação intracanal; complexidade anatômica do sistema de canais radiculares; alojamento de micro-organismos em túbulos dentinários e formação de biofilme (WALTIMO et al, 2004).

Enquanto o desbridamento mecânico e a irrigação química removem parte do aglomerado bacteriano, a contaminação bacteriana residual permanece em aproximadamente um quarto no sistema de canais radiculares após o preparo químico-mecânico (PQM) (BYSTRÖM, SUNDQVIST, 1983 RICUCCI; SIQUEIRA, 2010). Além de ser muito resistente aos irrigantes convencionais, o biofilme bacteriano protege a bactéria do sistema imunológico e fornece nutrientes, conseqüentemente, aumentando a resistência dos micro-organismos (STOJICIC et al, 2013).

A complexidade anatômica do sistema dos canais radiculares torna o desbridamento completo das bactérias quase impossível (PAGONIS et al, 2010), e mesmo que as técnicas convencionais sejam substituídas pelas técnicas modernas, que utilizam limas de níquel-titânio, mais de 35% da superfície do canal radicular pode não ser instrumentada após tratamento endodôntico não-cirúrgico (SHUPING et al, 2000, PETERS, SCHONENBERGER, 2001). Um estudo, realizado por Ricucci e Siqueira (2010), relatou que o PQM só conseguiu remover tecido necrótico e/ou vital das entradas dos canais laterais e paredes dentinárias em 75% dos dentes investigados.



As Bactérias remanescentes normalmente são encontradas em ramificações apicais, istmos e túbulos dentinários inacessíveis aos procedimentos de instrumentação e irrigação (VERA et al, 2012). Dentre as bactérias residuais, a *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) destaca-se por ser a espécie mais comumente encontrada em canais tratados e a sua capacidade de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis fizeram com que alguns estudos a apontassem como o principal patógeno envolvido no fracasso do tratamento endodôntico (PINHEIRO et al, 2003, SIDDIQUI; AWAN; JAVED, 2013). Em decorrência disso, uma série de pesquisas foi publicada tendo como foco esta espécie (BRITO et al, 2009, STOJICIC et al, 2013, KOMINE; TSUJIMOTO, 2013, AFKHAMI et al, 2017).

Em geral, nenhum protocolo terapêutico, técnica ou instrumento específico é capaz de moldar e eliminar completamente micro-organismos dentro do canal radicular. Para superar as limitações do tratamento endodôntico convencional, novas estratégias coadjuvantes podem ser mais eficazes na redução ou eliminação dos micro-organismos, aumentando a taxa de sucesso do tratamento endodôntico (SIQUEIRA JR, RÔÇAS, 2008). Dentre elas, o uso da terapia fotodinâmica - TFD (FIMPLE et al, 2008, AFKHAMI et al, 2017, HOEDKE et al, 2017), a irrigação ultrassônica passiva – IUP (BAO et al, 2017, LEONI et al, 2017) e o sistema de refinamento XP Endo Finisher (FKG, La Chaux-de-Fonds, Suíça) (AZIM et al, 2016, BAO et al, 2017, LEONI et al, 2017) têm sido associados a melhorias na limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares.

Neste sentido, a TFD, originada do termo em inglês *Photodynamic Therapy* (PDT), surge como uma terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional, com a finalidade de otimizar a eliminação bacteriana. É uma técnica de fácil e rápida aplicação clínica, não desenvolve resistência microbiana, podendo ser indicada em tratamentos endodônticos em única ou em múltiplas sessões (AMARAL et al, 2010).

A TFD caracteriza-se pela utilização de um fotossensibilizador não-tóxico, que é ativado pela luz de um comprimento de onda específico na presença de oxigênio. A transferência de energia do fotossensibilizador ativado para o oxigênio disponível resulta na formação de espécies tóxicas de oxigênio, conhecida como oxigênio singlete e radicais livres. (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Os principais agravos nas células microbianas ocorrem em nível de parede e membrana celulares com dano ao DNA (CASTANO et al, 2005).

Na endodontia, os fotossensibilizadores derivados das fenotiazinas têm sido amplamente empregados nas pesquisas envolvendo TFD, sendo o azul de metileno e o azul de toluidina os principais fotossensibilizadores utilizados como alvo para micro-organismos da microbiota endodôntica (GARCEZ et al, 2006, GARCEZ et al, 2008; SOUZA et al, 2010, BAGO et al, 2013).

Evidências científicas têm demonstrado que a TFD aplicada ao tratamento endodôntico convencional tem obtido uma maior redução da carga microbiana do sistema de canais radiculares (SOUKOS, 2006, FIMPLE et al, 2008, SILVA et al., 2010, ALFENAS et al, 2011, VAZIRI et al. 2012, LACERDA, ALFENAS, CAMPOS, 2014, HOEDKE et al, 2017).

Fimple et al (2008) investigaram os efeitos da TFD com o fotossensibilizador azul de metileno em canais radiculares com biofilmes múltiplos de dentes humanos extraídos *in vitro*. A microscopia eletrônica de varredura mostrou presença de biofilmes em canais radiculares antes da terapia. Os canais foram incubados com azul de metileno (25 µg/mL) durante dez minutos, seguido de exposição à luz vermelha a 665 nm com uma dose de energia de 30 J / cm<sup>2</sup>. A luz foi fornecida por um laser Diodo. A TFD conseguiu uma redução de até 80% das unidades formadoras de colônias. Concluiu-se que a TFD pode ser um coadjuvante antimicrobiano eficaz ao tratamento endodôntico padrão.

Brito et al (2009) objetivaram comparar a redução intracanal de *E. faecalis* promovida pelo PQM associado a três técnicas de irrigação diferentes. Uma amostra de 60 dentes foi contaminada com *E. faecalis* e depois os dentes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais de 20 dentes cada: Grupo 1, irrigação convencional com agulhas NaviTip inseridas a 3,0 mm do comprimento de trabalho; Grupo 2, igual ao Grupo 1, mas suplementado com ativação do irrigante pelo sistema EndoActivator; e o Grupo 3, irrigação com o sistema EndoVac. A redução das populações bacterianas foi muito significativa para todos os grupos, sem diferença estatisticamente significativa entre eles.

Garcez et al (2010) pesquisaram, *in vivo*, a ação antimicrobiana do TFD combinada com o retratamento endodôntico e à medicação intracanal, em dentes anteriores com lesões periapicais em pacientes submetidos a antibioticoterapia. A eliminação total da carga microbiana intracanal foi observado quando a TFD foi realizada sendo utilizado como

fotossensibilizador um conjugado entre polietilenimina e clorina em solução salina tamponada de fosfato a 60 mol/L, e irradiado com laser diodo no comprimento de onda de 660 nm e 40 mW de potência. O tempo de pré-irradiação foi de dois minutos e o tempo de irradiação foi de quatro minutos.

Upadya e Kishen, em 2010, avaliando por meio de microscopia eletrônica de varredura, a interação do fotossensibilizador com a bactéria *E. faecalis*, verificaram que, em tempos superiores a cinco minutos de exposição do micro-organismo ao corante, já seria suficiente para o mesmo aglomerar nas paredes bacterianas e invadir o citoplasma bacteriano ligando-se a organelas como a mitocôndria e ácidos nucleicos

Vaziri et al (2012) observaram que a combinação de hipoclorito de sódio a 2,5% e a TFD utilizando azul de toluidina a uma concentração de 15 ug / mL e, o laser de diodo com densidade de potência de 200 mW / cm<sup>2</sup> e um comprimento de onda de 625 nm, foi capaz de eliminar totalmente *Enterococcus faecalis* em canais unirradiculares de dentes recém-extraídos.

A relação entre a quantidade de oxigênio singleto gerada por diferentes concentrações de azul de metileno, bem como, o efeito bactericida da TFD em suspensões de *Enterococcus faecalis* foi avaliada por Komine e Tsujimoto (2013). Após o estudo, concluíram que o azul de metileno a uma concentração de 0,01%, quando ativado por laser de diodo com um comprimento de onda de 660 nm e 200 mW de potência, foi capaz de gerar a maior quantidade de oxigênio singleto e, conseqüentemente, resultar numa grande redução no número de unidades de colônia de micro-organismo formado.

Afkhami; Akbari; Chiniforush (2017) objetivaram comparar a eficácia das nanopartículas de prata, do laser diodo a 810 nm, da TFD convencional com o uso do fotossensibilizador indocianina verde e da TFD modificada com o uso das partículas de prata na desinfecção de canais radiculares inoculados com *Enterococcus faecalis*. As amostras foram obtidas a partir de lascas de dentina antes e após as intervenções. A redução na contagem de colônias foi avaliada, por meio da contagem das unidades formadoras de colônias. Os autores constataram que, em todos os grupos, ocorreu uma redução significativa das colônias de *E. faecalis*, tendo a TFD potencial para ser utilizada como coadjuvante da desinfecção do canal radicular.

Durante o PQM, as soluções irrigadoras atuam como desinfetante, lubrificante e agentes de limpeza, ajudando a eliminar restos de tecidos criados pela ação de corte de instrumentos na dentina, neutralizando micro-organismos e seus subprodutos (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2008). A irrigação com seringa convencional tem sido relatada como sendo ineficaz na limpeza das porções mais apicais do sistema radicular (THOMAS et al, 2014). Neste sentido, diferentes protocolos finais de irrigação foram introduzidos recentemente na endodontia, com a promessa de otimizar a desinfecção do canal radicular.

Técnicas de irrigação, baseadas em algum tipo de agitação, como o uso da IUP têm mostrado resultados superiores comparado à irrigação convencional por agulha (BAO et al, 2016, LEONI et al, 2017), por facilitarem a penetração de irrigantes e a remoção da *smear layer* (HAAPASALO et al, 2014). A eficiência da IUP tem sido explicada em decorrência da produção de ondas acústicas, cavitação e geração de calor, favorecendo a remoção de restos de tecidos e raspas dentinários (NUSSTEIN, 2015).

Harrison et al (2010) avaliaram o efeito da IUP na redução do *E. faecalis* em canais infectados experimentalmente. Um total de 130 dentes humanos extraídos foram contaminados com *E. faecalis* por quatro semanas e posteriormente divididos em dois grupos. Após o PQM, o G1 recebeu os procedimentos da IUP e irrigação com hipoclorito de sódio 1% durante um minuto e o G2 recebeu a medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio por uma semana. Baseado na penetração bacteriana no interior dos túbulos dentinários, os autores puderam concluir que o PQM convencional falhou na eliminação total das bactérias e, que a IUP com hipoclorito de sódio a 1% após o preparo é um passo suplementar efetivo no controle microbiano.

Leoni et al (2017) testaram a eficácia de quatro protocolos de irrigação sobre a redução de detritos dentro do sistema de canais radiculares mesiais nos primeiros molares inferiores utilizando análise de microtomografia computadorizada. Um total de quarenta dentes foi instrumentado pelo sistema rotatório *WaveOne* e divididos em quatro grupos de acordo com o protocolo final de irrigação: pressão apical positiva, irrigação ultrassônica passiva, *Self Adjusting File* (SAF) e XP-endo Finisher. A redução de detritos foi verificada em todos os grupos após os protocolos de irrigação. Em geral, os melhores resultados foram observados nos grupos da IUP e XP-endo Finisher, sem diferença estatística significativa entre os grupos.

Dentro desta abordagem, a XP-endo Finisher (XP Endo) (FKG, La Chaux-de-Fonds, Suíça) é um novo instrumento apresentado como um passo final no protocolo de irrigação dos canais radiculares. Caracteriza-se por ser um instrumento não cônico de tamanho 25, que respeita a anatomia original do canal radicular e limpa efetivamente as áreas irregulares, devido à sua elevada flexibilidade e à sua capacidade de se expandir para adaptar-se ao canal radicular de forma tridimensional (FKG 2015).

Bao et al (2016), em um estudo *in vitro*, avaliaram a eficácia da XP-endo finisher na remoção apical de biofilme em comparação com a irrigação por agulha convencional e a irrigação ultrassônica passiva. Cinquenta e quatro pré-molares unirradiculares foram selecionados e instrumentados. A seguir, foram randomizados em seis grupos (n = 8) de acordo com o protocolo final de irrigação. A microscopia eletrônica foi utilizada para avaliar o biofilme residual. A XP-endo Finisher obteve o melhor resultado, comparado aos outros grupos, removendo o biofilme de áreas de difícil acesso no sistema de canais radiculares.

Azim et al (2016) determinaram a eficácia de quatro sistemas de irrigação na eliminação de bactérias nos canais radiculares, particularmente nos túbulos dentinários. Um total de sessenta dentes foi contaminado com *E. faecalis* e divididos em quatro grupos: (1) irrigação com agulha padrão, (2) agitação sônica com EndoActivator, (3) sistema XP Endo Finisher, (4) erbio: laser Erbio-YAG. A redução bacteriana foi analisada por microscopia confocal. Todos os quatro protocolos de irrigação eliminaram significativamente as bactérias intracanal, e o grupo da XP Endo finisher teve uma maior redução bacteriana em comparação com as outras três técnicas.

A atividade antimicrobiana isolada da IUP, TFD e da XP Endo vem sendo discutida em recentes pesquisas, entretanto, a associação destes protocolos na redução de *E. faecalis* dos canais radiculares é inédita neste trabalho. Assim, para que se empregue a TFD com a eficácia máxima, é importante que novos estudos sejam realizados para validação de protocolos efetivos na redução microbiana em dentes infectados.

O estudo dos mecanismos de ação e dos efeitos de novos recursos técnicos aliados a TFD é bastante válido, tendo-se em vista o objetivo de se aumentar o índice de sucesso do tratamento endodôntico, pois apesar da evolução tecnológica, ainda existem falhas no sucesso dessa terapia, muitas vezes associada à persistência de micro-organismos no interior dos

canais. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* da terapia fotodinâmica associada a diferentes protocolos finais de irrigação na redução de *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares.

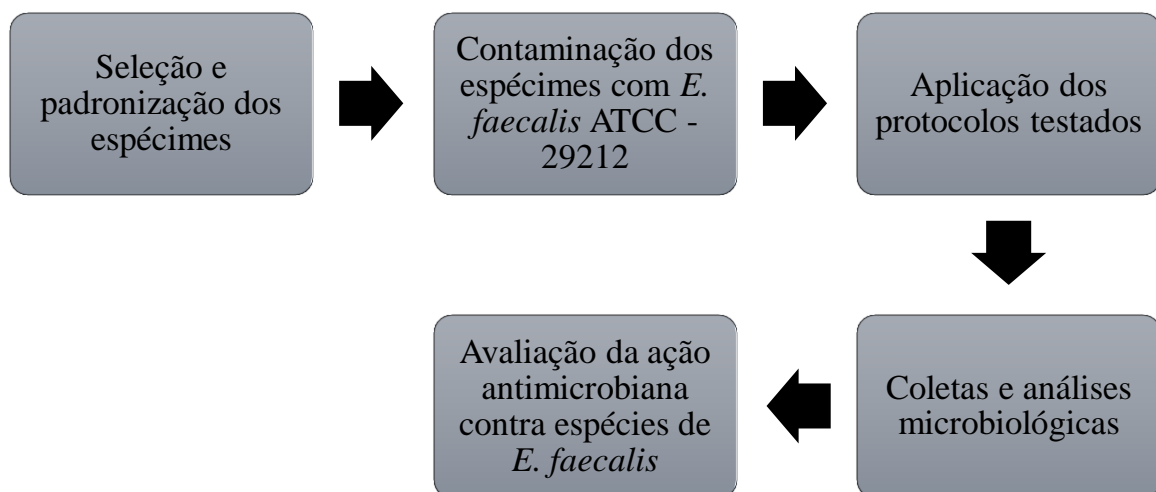
## 2 OBJETIVO

Avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana da TFD isolada ou associada a diferentes protocolos de irrigação final no combate à *E. faecalis* do sistema de canais radiculares.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Tipo e Local do Estudo

Esta pesquisa, do tipo experimental laboratorial *in vitro*, foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) em Campina Grande -PB, sob autorização institucional, conforme ANEXO A. As etapas metodológicas utilizadas neste processo estão descritas a seguir:



**Figura 1.** Etapas metodológicas do estudo.

#### 3.2 Considerações Éticas

O presente estudo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba sob protocolo de número 79027617.8.0000.5187, conforme ANEXO B.

#### 3.3 Seleção e Padronização dos Espécimes Utilizados

Foram utilizados 80 pré-molares unirradiculares inferiores doados do banco de dentes humanos da Universidade Estadual da Paraíba-Campus VIII, em Araruna-PB.

Realizou-se exame radiográfico periapical e visualização criteriosa dos dentes com o auxílio de uma lupa. Como critérios de inclusão, selecionaram-se dentes com canais retos,



ápices completamente formados e ausência de obturação endodôntica. Foram excluídos dentes com trincas, fraturas radiculares, reabsorções internas ou externas e com anomalias (Figura 2).



**Fig 2** – Seleção e padronização dos espécimes.

Com auxílio de um disco metálico (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), acionado em motor elétrico, baixa rotação, os dentes foram seccionados transversalmente na junção cimento-esmalte com a finalidade de estabelecer um comprimento único para todas as raízes de 15 mm (Figura 3).



**Fig 3** – Seção transversal dos espécimes na junção cimento-esmalte.

O canal radicular foi previamente irrigado com 5mL de soro fisiológico e explorado com uma lima K #20 (Dentsply-Maillefer<sup>®</sup>, Ballaigues, Suíça) até que esta fosse visualizada no forame apical, então, recuou-se 1,0 mm, obtendo-se assim o comprimento real de trabalho (CRT).

Os espécimes foram instrumentados, segundo as recomendações do fabricante, com o sistema rotatório Reciproc® (VDW, Munique, Alemanha) R40, cujo diâmetro da ponta corresponde a 0,40 mm. A cada troca de instrumento, foi realizada irrigação, aspiração e inundação com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (Asfer®, Santa Maria, SP) por meio das agulhas NaviTip® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) utilizando Kit de irrigação-aspiração Ultradent® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA), de modo que, em todos os grupos, foi utilizada a mesma quantidade final de NaOCl (10 mL).

Finalizada a instrumentação, a *smear layer* foi removida com 5 mL de ácido etilenodiamino tetracético dissódico (EDTA) (Biodinâmica, Paraná, Brasil) a 17% por três minutos, sendo, em seguida, realizada a irrigação final com 5 mL de NaOCl a 2,5% e 1 mL de solução salina estéril.

Concluída esta etapa, os espécimes tiveram seus ápices vedados com Ionômero de Vidro Restaurador Riva Light Cure® (SDI, Victoria, Austrália) e receberam dupla camada de esmalte de unha transparente (Colorama, SP, Brasil) para impermeabilizar a superfície externa, a fim de prevenir o extravasamento da cultura bacteriana após a sua contaminação. Em seguida, foram colocados em frascos contendo solução de Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid; Basinkstoke, UK) esterelizados e autoclavados a 120°C, 1 atm, por 20 min. Permaneceram incubados a 37°C por 24h para confirmação da esterilidade.

Ressalta-se que esta etapa foi comum a todos os grupos.

### **3.4 Micro-organismos e Meio de Cultura**

As culturas de *E. faecalis* usadas, neste estudo, foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC) - 29212. As colônias isoladas foram suspensas em tubos com tampas rosqueáveis contendo 5,0 mL de BHI. Esta suspensão foi agitada mecanicamente e ajustada em espectrofotômetro com absorvância de 800 nm, até obter-se a concentração equivalente a 1,0 da escala McFarland ( $3,0 \times 10^8$  bactérias/ mL).

### **3.5 Contaminação dos Espécimes com *E. faecalis***

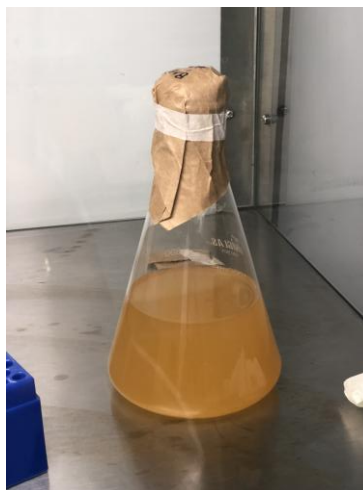
O protocolo de contaminação dos espécimes foi baseado na metodologia proposta por Andrade et al (2015). Previamente à contaminação, os dentes foram inseridos em microtubos individuais (Eppendorf, NY, USA) contendo 800 µl de BHI estéril e submetidos a um banho

ultrassônico durante 15 minutos para reidratar as amostras e possibilitar a penetração máxima do meio de cultura nos túbulos dentinários (Figura 4).



**Fig 4**– Banho ultrassônico prévio ao procedimento de contaminação.

O período total de contaminação foi de quatro dias, com ciclos de centrifugação em dias alternados. O primeiro dia de contaminação iniciou-se pela confecção do inóculo a uma concentração de  $3,0 \times 10^8$  bactérias/ mL (Figura 5). O ajuste da concentração do inóculo para a quantidade de meio suficiente para a contaminação, de acordo com a quantidade de amostra, foi realizado baseado na fórmula:  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ .



**Fig 5** – Culturas de *E. faecalis* em caldo de BHI.

O inóculo de *E.faecalis* foi armazenado em estufa bacteriológica a 37°C por sete horas, para que o micro-organismo estivesse na fase de crescimento exponencial durante a contaminação das amostras. Todos os procedimentos foram realizados dentro da câmara de fluxo laminar do Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos – LABDEM, UEPB (Figura 6).



**Fig 6** – Câmara de fluxo laminar.

Após as sete horas, o meio de cultura BHI, utilizado para o banho ultrassônico, foi removido e descartado. Foi despejado, sobre as amostras no interior dos microtubos, 1 mL do inóculo de *E.faecalis*. Os microtubos contendo as amostras foram levados à centrífuga seguindo o protocolo de centrifugação proposto por Andrade et al. (2014). Esse protocolo prevê a centrifugação em quatro velocidades (1.400g, 2.000g, 3.600g, 5.600g) por duas vezes em cada uma delas, por cinco minutos, na temperatura de 25°C.

O inóculo foi renovado a cada centrifugação. Após os oito ciclos de centrifugação, 1mL da solução de BHI estéril foi inserida nos microtubos contendo as amostras, que foram agitados em vórtex e armazenados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

No segundo dia (após 24 horas), as amostras foram agitadas em vórtex por dez segundos, e a solução turva dos micro-organismos removida. Foi inserido 1 mL de BHI estéril nos microtubos, seguido de centrifugação a 3.600g por cinco minutos a 25°C e estes foram novamente armazenados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

No terceiro dia, foi confeccionado um novo inóculo e, após sete horas na estufa, um novo protocolo de contaminação e centrifugação foi realizado de maneira idêntica ao 1º dia. Após 24 horas na estufa bacteriológica a 37°C, o meio de cultura foi renovado e as amostras foram novamente armazenadas, da mesma forma que no 2º dia.

A fim de analisar o crescimento de *E. faecalis* e comprovar a ausência de contaminação externa foram realizados os seguintes testes: Prova da bili-esculina e Prova de tolerância ao NaCl a 6,5%.

### 3.5.1 Prova da bili-esculina

Amostras do crescimento colonial das placas de ágar foram coletadas, semeadas no meio de Bile-Esculina (Merck, Darmstadt, Alemanha) e armazenadas a 37°C por 24 horas para verificação da presença do *Streptococcus* sp. O teste da Bile-Esculina é baseado na capacidade de algumas bactérias hidrolisarem esculina em presença de bílis. As bactérias que, nela conseguem crescer, formam um complexo negro, pois a esculetina reage com os íons férricos (Figura 7). A formação do complexo negro indicou a presença do *Streptococcus* sp, entre os quais pode haver amostras do *E. faecalis*.



**Fig 7** – Teste da bili-esculina/ formação do complexo negro.

### 3.5.2 Prova de tolerância ao NaCl a 6,5%

Esse teste é utilizado para a verificação da capacidade de micro-organismos crescerem na presença de NaCl a 6,5%, diferenciando o *Enterococcus* spp (que cresce na presença de NaCl) dos *Streptococcus* spp (que não crescem na presença de NaCl). Amostras do crescimento colonial das placas de ágar foram coletadas, inoculadas no meio líquido de NaCl a 6,5% e armazenadas a 37°C por 24 horas. A confirmação da presença do *E. faecalis* deu-se após 24 horas, com a turvação do BHI.

### 3.5 Distribuição dos Grupos

Após o término do protocolo de contaminação, os espécimes foram divididos aleatoriamente em seis grupos de acordo com o protocolo de irrigação final (Quadro 1).

**Quadro 1.** Grupos experimentais e controles do estudo.

GRUPO	PROTOCOLO
C+ (n=15)	(Controle positivo): Irrigação convencional com NaOCl 2,5%
C- (n=5)	(Controle negativo): Apenas contaminação
TFD (n=15)	Terapia fotodinâmica
NaOCl + TFD (n=15)	Irrigação convencional com NaOCl 2,5% + Terapia fotodinâmica
IUP +TFD (n=15)	Irrigação ultrassônica passiva + Terapia fotodinâmica
XP +TFD (n=15)	XP Endo finisher + Terapia fotodinâmica

✓ **Grupo C+ (controle positivo):** Irrigação convencional com agulha

O canal radicular foi inundado com 1,5 mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%, durante 60 segundos utilizando uma agulha de irrigação de calibre 30 (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) posicionada no comprimento de trabalho e movida com movimentos verticais.

✓ **Grupo C- (controle negativo)**

Após a contaminação dos espécimes com as Culturas de *Enterococcus faecalis*, estes não receberam qualquer tratamento.

✓ **Grupo TFD:** Terapia Fotodinâmica

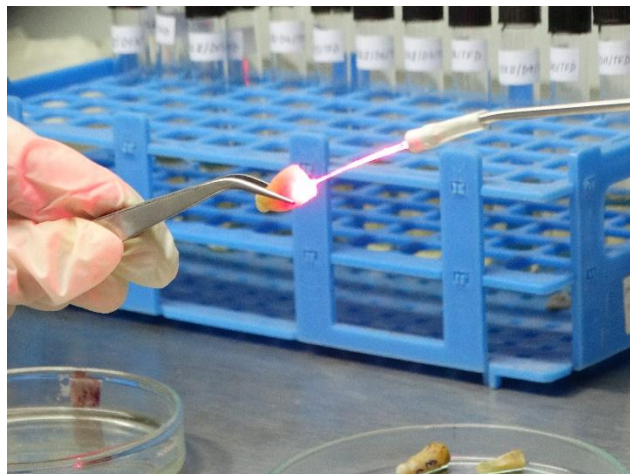
O canal foi preenchido com 0,5 mL do fotossensibilizador azul de metileno a 0,005% (Chimiolux – Aptivalux, MG, Brasil), o qual permaneceu por um período de pré-

irradiação de cinco minutos (Figura 8 A/B). A fibra óptica foi, então, inserida no canal radicular e o fotossensibilizador foi ativado pelo laser Diodo (Figura 9).

Como detalhado no quadro 2, o aparelho de laser Diodo (Therapy XT – DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado com fonte de luz vermelha, com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 660 nm, potência de 100 mW e uma energia de 9 J, por 90 segundos de irradiação. Neste equipamento, a forma de emissão da luz é contínua (CW) e a área da ponteira (spot) é de 0,028 cm<sup>2</sup>. A fibra óptica foi movida no interior do canal radicular com movimentos helicoidais ápico-cervicais. Posteriormente, o canal radicular foi novamente irrigado com 5 mL de solução salina estéril para a remoção do fotossensibilizador



**Fig 8** – A: Fotossensibilizador azul de metileno; B: Inserção do fotossensibilizador no interior do canal radicular.



**Fig 9** – Inserção da fibra óptica e ativação do fotossensibilizador pelo laser Diodo.



**Quadro 2.** Parâmetros do laser Diodo de Baixa Intensidade

<b>COMPOSIÇÃO</b>	InGaAIP
<b>ENERGIA</b>	9 J
<b>COMPRIMENTO DE ONDA</b>	660 nm
<b>POTÊNCIA</b>	100 mW
<b>TEMPO</b>	90 segundos
<b>MODO DE ENTREGA</b>	Fibra óptica de 600 µm em movimentos helicoidais ápico-cervicais

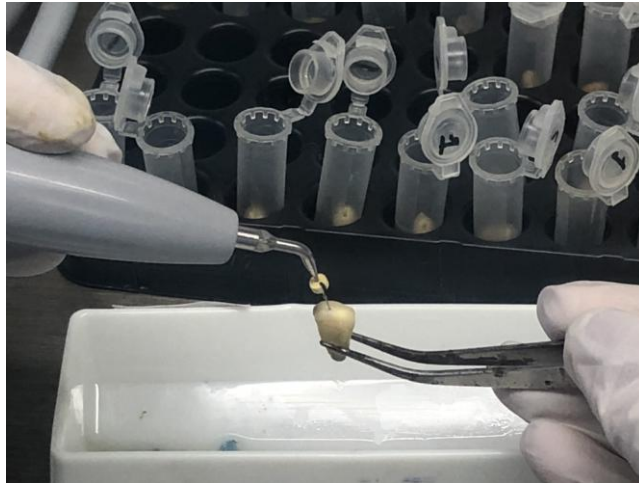
- ✓ **Grupo NaOCl + TFD** : Irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% + Terapia fotodinâmica

Neste grupo, os espécimes foram irrigados com 1,5 mL de NaOCl a 2,5% de forma idêntica ao grupo C+. Além disso, foram realizados os procedimentos da terapia fotodinâmica nos mesmos parâmetros do grupo TFD.

- ✓ **Grupo IUP + TFD:** Irrigação ultrassônica passiva + Terapia fotodinâmica

O canal radicular foi inundado com 1,5 mL de NaOCl a 2,5% seguido de agitação ultrassônica, por meio do inserto Irrisonic E1 (Helse Dental Technology<sup>®</sup>, SP, Brasil) acoplado em ultrassom (JetSonic BP, Gnatus<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com a ponta posicionada a 1,0 mm aquém do comprimento real de trabalho durante 60 segundos (Figura 10). Após este procedimento, foi realizada a terapia fotodinâmica, como descrito no Grupo TFD. Após este procedimento, foi realizada a terapia fotodinâmica, como descrito no Grupo TFD.





**Fig 10** – Agitação ultrassônica do hipoclorito de sódio.

✓ **Grupo XP Endo + TFD** : XP Endo Finisher + Terapia fotodinâmica

Após a introdução da XP Endo no comprimento de trabalho, o canal radicular foi inundado com 1,5 mL de NaOCl a 2,5%, utilizando agulha de calibre 30 -Ultradent. A XP Endo foi utilizada no interior do canal radicular a uma velocidade de 800 rpm, torque de 1 - Ncm, por 60 segundos. Em seguida, realizou-se a terapia fotodinâmica, como descrito no Grupo TFD.

### 3.5 Coletas e Análises Microbiológicas

Em todos os grupos, foram realizadas duas coletas dos espécimes para avaliação microbiológica. A primeira coleta foi feita antes da realização dos protocolos, para confirmar a contaminação dos espécimes. A segunda coleta ocorreu imediatamente após a realização dos protocolos, sendo a análise microbiológica feita após 24 horas da incubação em estufa a 37°C das pontas de papel em microtubos contendo BHI, para verificar a redução microbiana (Figura 11 A/B).

As coletas foram realizadas utilizando três pontas de papel absorvente estéreis de calibre 40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) após a irrigação dos canais radiculares com 5,0 mL de solução salina estéril. Os cones utilizados foram transferidos para tubos com 1,0 mL de BHI e agitados (Ika® Vortex 3 Genius, Wilmington, EUA) durante um minuto (Figura 11 C).

A turvação do meio de cultura foi avaliada no espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini-1240, Quioto, Japão ) no comprimento de onda de luz visível de 540 nm.

Posteriormente, foram calculadas quantas unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitros havia na cultura.



**Fig 11** – A: Coleta microbiológica com cone de papel absorvente; B: Cones de papel transferidos para tubos de ensaio, C: Agitação dos cones de papel em vórtex.

### 3.6 Análise Estatística

Os dados foram computados e analisados usando o software IBM SPSS Statistic versão 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). O protocolo utilizado para a desinfecção do canal radicular foi utilizado como variável independente. A quantidade de bactérias observadas foi considerada como variável dependente (resposta). O pressuposto de distribuição normal dos dados foi averiguado usando o teste de Shapiro-Wilk e, portanto, testes paramétricos foram empregados. Análise de Variância (ANOVA) mista foi realizada para detectar fatores estatisticamente significativos, ou interações entre eles, que interferiram na variável resposta. Comparações múltiplas de médias foram feitas usando o teste *post-hoc* de Tukey HSD (HANNIGAN; LYNCH, 2013; LARSON; FARBER, 2016). Em todas as análises, o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 ARTIGO

### 4.1 Apresentação

O projeto da presente pesquisa foi desenvolvido e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Como resultado da execução deste projeto, um artigo é apresentado nessa dissertação sob título “Atividade antibacteriana da terapia fotodinâmica na desinfecção dos canais radiculares associada a diferentes protocolos de irrigação”.

Após as devidas considerações da banca avaliadora sobre essa dissertação, o referido artigo será submetido ao periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (ISSN: 1572-1000; Fator de Impacto: 2.412; Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos encontram-se no Anexo C.

## 4.2 Artigo a ser submetido

### ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA DESINFECÇÃO DOS CANAIS RADICULARES ASSOCIADA A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO

Gabriella de Vasconcelos Neves<sup>a</sup>

a Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Autor Correspondente:

Gabriella de Vasconcelos Neves

Universidade Estadual da Paraíba. Rua das Baraúnas, 351. Bairro Universitário. Campina Grande, Paraíba, Brasil. CEP: 58429-500. Telefone: +5583999479708

E-mail: gabriellavneves@gmail.com

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana da terapia fotodinâmica associada a diferentes protocolos de irrigação no combate ao *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) do sistema de canais radiculares. Tratou-se de um ensaio experimental, no qual um total de 80 pré-molares humanos unirradiculares foram preparados e contaminados com 0,1 mL de *E. Faecalis* ( $3 \times 10^8$  cel/mL), por um período de quatro dias. Os dentes foram divididos aleatoriamente em seis grupos: Grupo C+ (irrigação convencional com agulha); Grupo C – (controle negativo); Grupo TFD (terapia fotodinâmica); Grupo NaOCl + TFD (hipoclorito de sódio a 2,5% + terapia fotodinâmica); Grupo IUP + TFD (irrigação ultrassônica passiva + terapia fotodinâmica); Grupo XP Endo + TFD (XP Endo Finisher + terapia fotodinâmica). A fonte de luz utilizada foi um laser diodo de baixa intensidade, com comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW e uma energia de 9 J, por 90 segundos de irradiação. O corante utilizado foi o azul de metileno a 0,005 %. O conteúdo do canal foi coletado com pontas de papel absorvente estéreis em dois momentos: antes dos protocolos de descontaminação, e 24 horas após os protocolos. O número de unidades formadoras de colônias de *E. faecalis* (UFC) foi determinado para cada canal radicular. Os testes ANOVA e TUKEY foram utilizados, e o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). A porcentagem de inibição variou de 10,72 (C-) a 100% (XP Endo + TFD), sendo os valores de UFC/mL diferentes entre todos os protocolos testados ( $p < 0,05$ ). Além disso, os diferentes protocolos testados influenciaram de modo significativo a inibição bacteriana ( $p < 0,05$ ). O protocolo que proporcionou maior percentual de inibição bacteriana foi o XP Endo + TFD (100,0%), seguido do NaOCl + TFD (65,85%) Após a realização deste estudo, concluiu-se que a TFD associada a diferentes protocolos de irrigação final foi mais eficaz na inibição do *E. faecalis* em relação ao seu uso isolado, sendo a XP Endo Finisher o melhor protocolo de irrigação no combate a este micro-organismo.

**Palavras-Chave:** Fotoquimioterapia, Biofilmes, *Enterococcus faecalis*, Endodontia.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate, *in vitro*, the antibacterial activity of photodynamic therapy associated with different irrigation protocols in the control of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) on the root canal system. It was an experimental trial in which a total of 80 unirradicular human premolars were prepared and contaminated with 0.1 mL of *E. faecalis* ( $3 \times 10^8$  cells / mL) for a four days period. The teeth were randomly divided into six groups: Group C + (conventional needle irrigation); Group C - (negative control); PDT group (photodynamic therapy); NaOCl + PDT group (2.5% sodium hypochlorite + photodynamic therapy); IUP + PDT group (passive ultrasonic irrigation + photodynamic therapy); XP Endo Group + PDT (XP Endo Finisher + photodynamic therapy). The light source used was a low-intensity diode laser with wavelength of 660 nm, power of 100 mW and energy of 9 J, for 90 seconds of irradiation. The dye used was 0.005% methylene blue. The contents of the root canal were collected with sterile absorbent paper tips in two moments: before the decontamination protocols and 24 hours after the protocols. The number of colony forming units of *E. faecalis* (CFU) was determined for each root canal. The ANOVA and TUKEY tests were used and the level of significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ). The percentage of inhibition ranged from 10.72 (C-) to 100% (XP Endo + TFD), and the values of CFU / mL were different among all the protocols tested ( $p < 0.05$ ). In addition, the different protocols tested significantly influenced bacterial inhibition ( $p < 0.05$ ). The protocol that provided the highest percentage of bacterial inhibition was XP Endo + PDT (100.0%), followed by NaOCl + PDT (65.85%). After this study, it was concluded that PDT associated with different protocols of final irrigation was more effective in inhibiting *E. faecalis* than in its isolated use, with XP Endo Finisher being the best irrigation protocol in the fight against this microorganism.

**Keywords:** Photochemotherapy, Biofilms, *Enterococcus faecalis*, Endodontics

## 1 Introdução

O objetivo principal do tratamento endodôntico em dentes necrosados é eliminar ou reduzir as populações bacterianas no interior do canal radicular a um nível que permita a cicatrização do tecido perirradicular [1].

A complexidade anatômica do sistema dos canais radiculares torna o desbridamento completo das bactérias quase impossível [2], e mesmo que as técnicas convencionais sejam substituídas pelas técnicas modernas, que utilizam limas de níquel-titânio, mais de 35% da superfície do canal radicular pode ser deixada sem instrumentação após tratamento endodôntico não-cirúrgico [3-5].

Dentre as bactérias residuais, o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) destaca-se por ser a espécie mais comumente encontrada em canais tratados, e a sua capacidade de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis fizeram com que alguns estudos o apontassem como o principal patógeno envolvido no fracasso do tratamento endodôntico [6-10].

Para superar as limitações do tratamento endodôntico convencional, novas estratégias coadjuvantes podem ser mais eficazes na redução ou eliminação dos micro-organismos, aumentando a taxa de sucesso do tratamento endodôntico [1]. Dentre elas, o uso da terapia fotodinâmica - TFD [10-19] a irrigação ultrassônica passiva – IUP [20,21] e o sistema de refinamento XP Endo Finisher (FKG, La Chaux-de-Fonds, Suíça) [20-22] têm sido associados a melhorias na limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares.

Neste sentido, a TFD, originada do termo em inglês *Photodynamic Therapy* (PDT), surge como uma terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional, com a finalidade de otimizar a eliminação bacteriana [23]. Esta técnica caracteriza-se pela utilização de um fotossensibilizador não-tóxico, o qual é ativado pela luz de um comprimento de onda específico na presença de oxigênio. A transferência de energia do fotossensibilizador ativado para o oxigênio disponível resulta na formação de espécies tóxicas de oxigênio, conhecida como oxigênio singlete e radicais livres [7,24]. Os principais danos nas células microbianas ocorrem em nível de parede e membrana celulares com lesão ao DNA [7,25].

Na endodontia, os fotossensibilizadores derivados das fenotiazinas são amplamente empregados nas pesquisas envolvendo TFD, sendo o azul de metileno um dos principais fotossensibilizadores utilizados como alvo para micro-organismos da microbiota endodôntica [26-29].

Durante o PQM, as soluções irrigadoras atuam como desinfetante, lubrificante e agentes de limpeza, ajudando a eliminar restos de tecidos criados pela ação de corte de instrumentos na dentina, neutralizando micro-organismos e seus subprodutos [1]. A irrigação com seringa convencional é relatada como sendo ineficaz na limpeza das porções mais apicais do sistema radicular [30]. Neste sentido, diferentes protocolos finais de irrigação foram introduzidos recentemente na endodontia, com a promessa de otimizar a desinfecção do canal radicular.

Técnicas de irrigação, baseadas em algum tipo de agitação, como o uso da IUP têm mostrado resultados superiores comparado à irrigação convencional por agulha [20,21] por facilitarem a penetração de irrigantes e a remoção da *smear layer* [31]. A eficiência da IUP é explicada devido à produção de ondas acústicas, cavitação e geração de calor, favorecendo a remoção de restos de tecidos e raspas dentinários [32].

Dentro desta abordagem, a XP-endo Finisher (XP Endo) (FKG, La Chaux-de-Fonds, Suíça) é um novo instrumento apresentado como um passo final no protocolo de irrigação dos canais radiculares. Caracteriza-se por ser um instrumento não cônico de tamanho 25, que respeita a anatomia original do canal radicular e limpa efetivamente as áreas irregulares, devido à sua elevada flexibilidade e à sua capacidade de se expandir para adaptar-se ao canal radicular de forma tridimensional [33].

A atividade antimicrobiana isolada da TFD, IUP e da XP Endo vem sendo discutida em recentes pesquisas, entretanto, a associação destes protocolos na redução do *E. faecalis* dos canais radiculares é inédita neste trabalho. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* da terapia fotodinâmica associada a diferentes protocolos finais de irrigação na redução do *E. faecalis* no sistema de canais radiculares.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Seleção e Padronização dos Espécimes**

Esta etapa, comum a todos os grupos, caracterizou-se pela seleção de 80 pré-molares humanos unirradiculares. Após exame radiográfico periapical e visualização criteriosa dos mesmos, foram selecionados dentes com canais retos, com ápices completamente formados, sem obturação endodôntica, sem trincas ou fraturas, reabsorções internas ou externas e sem anomalias. Com auxílio de um disco de carborundum (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), os

dentes foram seccionados transversalmente na junção cimento-esmalte com a finalidade de estabelecer um comprimento único para todas as raízes de 15 mm.

O comprimento de trabalho foi considerado a 1 mm aquém do forame apical. Os espécimes foram instrumentados, segundo as recomendações do fabricante, com o sistema rotatório Reciproc® (VDW, Munique, Alemanha) R40, cujo diâmetro da ponta corresponde a 0,40 mm. A cada troca de instrumento, foi realizada a irrigação, aspiração e inundação com hipoclorito de sódio a 2,5% por meio das agulhas NaviTip® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) utilizando Kit de irrigação-aspiração Ultradent® (Ultradent, South Jordan, UT, EUA).

Finalizada a instrumentação, a *smear layer* foi removida com 5 mL de ácido etilenodiamino tetracético dissódico (EDTA) (Biodinâmica, Paraná, Brasil) a 17% por três minutos, sendo em seguida realizada a irrigação final com 5 mL de NaOCl e 5 mL de solução salina estéril.

Concluída esta etapa, os espécimes tiveram seus ápices vedados com Ionômero de Vidro Restaurador Riva Light Cure® (SDI, Victoria, Austrália) e as superfícies radiculares receberam dupla camada de esmalte de unha transparente (Colorama, SP, Brasil). Em seguida, foram colocados em frascos contendo solução de Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid; Basinkstoke, UK) e autoclavados a 120°C, 1 atm, por 20 min. Permaneceram incubados a 37°C por 24h para confirmação da esterilidade.

## 2.2 Contaminação dos Espécimes com *Enterococcus faecalis*

O protocolo de contaminação dos espécimes foi baseado na metodologia proposta por Andrade [34]. Culturas puras de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram suspensas em tubos com tampas rosqueáveis contendo 5,0 mL de BHI. Esta suspensão foi agitada mecanicamente e ajustada em espectrofotômetro com absorbância de 800 nm, até obter-se a concentração equivalente a 1,0 da escala McFarland ( $3,0 \times 10^8$  bactérias/ mL).

O período total de contaminação foi de quatro dias, com ciclos de centrifugação em dias alternados. O procedimento iniciou-se com a execução de culturas sucessivas, a partir da amostra inicial congelada. O procedimento foi repetido por 24 horas por duas vezes.

O primeiro dia de contaminação iniciou-se pela confecção do inóculo a uma concentração de  $3,0 \times 10^8$  bactérias/ mL. O ajuste da concentração para a quantidade de meio suficiente para a contaminação, de acordo com a quantidade de amostra, foi realizado baseado na fórmula:  $C_1.V_1 = C_2.V_2$ .



No primeiro e terceiro dia, este protocolo prevê a centrifugação em quatro velocidades (1.400g, 2.000g, 3.600g, 5.600g) por duas vezes em cada uma delas, por cinco minutos, na temperatura de 25°C. No segundo e quarto dia, a centrifugação foi realizada a 3.600g por cinco minutos a 25°C.

A turvação era o indicativo de que o crescimento bacteriano tinha ocorrido devido à infiltração bacteriana, e esse conteúdo foi submetido a testes microbiológicos. Após o período de contaminação, os canais foram secos com cones de papel absorvente, os quais foram imersos em BHI por 24 horas a 37°C, para a realização de cultura microbiana e análise do material retirado do interior do canal.

A confirmação da contaminação por *E.faecalis* foi verificada pelos testes da bili-esculina e tolerância ao NaCl a 6,5%.

### 2.3 Distribuição dos Grupos

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=15), um grupo controle positivo (n=15) e um grupo controle negativo (n=5), como listados abaixo:

- **Grupo C+ (controle positivo):** Irrigação convencional com agulha. O canal radicular foi inundado com 1,5 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%, durante 60 segundos utilizando uma agulha de irrigação de calibre 30 (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) posicionada no comprimento de trabalho e movida com movimentos verticais.

- **Grupo C- (controle negativo):** Após a contaminação dos espécimes com as Culturas de *E. faecalis*, estes não receberam qualquer tratamento.

- **Grupo TFD: Terapia Fotodinâmica.** O canal foi preenchido com 0,5 mL do fotossensibilizador azul de metileno a 0,005% (Chimiolux – Aptivalux, MG, Brasil) que permaneceu por um período de pré-irradiação de cinco minutos. A fibra óptica foi, então, inserida no canal radicular. O aparelho de laser Diodo (Therapy XT – DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado com fonte de luz vermelha, com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 660 nm, potência de 100 mW e uma energia de 9 J, por 90 segundos de irradiação. Neste equipamento, a forma de emissão da luz é contínua (CW) e a área da ponteira (spot) é de 0,028 cm<sup>2</sup>. A fibra óptica foi movida no interior do canal radicular com movimentos helicoidais ápico-cervicais. Posteriormente, o canal radicular foi novamente irrigado com 5 mL de solução salina estéril para a remoção do fotossensibilizador.

- **Grupo NaOCl + TFD: Hipoclorito de sódio + Terapia fotodinâmica.** Neste grupo, os espécimes foram irrigados com 1, 5 mL de NaOCl a 2,5% de forma idêntica ao grupo C+.

Além disso, foram realizados os procedimentos da terapia fotodinâmica nos mesmos parâmetros do grupo TFD.

- **Grupo IUP + TFD: Irrigação ultrassônica passiva + Terapia fotodinâmica.** O canal radicular foi inundado com 1,5 mL de NaOCl a 2,5% seguido de agitação ultrassônica, por meio do inserto Irrisonic E1 (Helse Dental Technology<sup>®</sup>, SP, Brasil) acoplado em ultrassom (JetSonic BP, Gnatus<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com a ponta posicionada a 1,0 mm aquém do comprimento real de trabalho durante 60 segundos. Após este procedimento, foi realizada a terapia fotodinâmica, como descrito no Grupo TFD.

- **Grupo XP Endo + TFD : XP Endo Finisher + Terapia fotodinâmica.** Após a introdução da XP Endo no comprimento de trabalho, o canal radicular foi inundado com 1,5 mL de NaOCl a 2,5%, utilizando agulha de calibre 30 -Ultradent. A XP Endo foi utilizada no interior do canal radicular a uma velocidade de 800 rpm, torque de 1 -Ncm, por 60 segundos. Após este procedimento, foi realizada a terapia fotodinâmica, como descrito no Grupo TFD.

#### **2.4 Coletas e Análises Microbiológicas**

Em todos os grupos, foram realizadas duas coletas dos espécimes para avaliação microbiológica. A primeira coleta foi feita antes da realização dos protocolos, para confirmar a contaminação dos espécimes. A segunda coleta ocorreu imediatamente após a realização dos protocolos, sendo a análise microbiológica feita após 24 horas da incubação em estufa a 37°C das pontas de papel absorvente em microtubos contendo BHI, para verificar a redução microbiana.

As coletas foram realizadas utilizando três pontas de papel absorvente estéreis de calibre 40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) após a irrigação dos canais com 5,0 mL de solução salina estéril. Os cones utilizados foram transferidos para tubos com 1,0 mL de BHI e agitados (Ika<sup>®</sup> Vortex 3 Genius, Wilmington, EUA) durante um minuto.

A turvação do meio de cultura foi avaliada no espectrofotômetro (Shimadzu<sup>®</sup> UV mini-1240, Quioto, Japão ) no comprimento de onda de luz visível de 540 nm. Posteriormente, foram calculadas quantas unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitros havia na cultura.

## 2.5 Análise estatística

Os dados foram computados e analisados usando o software IBM SPSS Statistic versão 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). O protocolo utilizado para a desinfecção do canal radicular (Grupos testados) foi utilizado como variável independente. A quantidade de bactérias observadas foi considerada como variável dependente (resposta). O pressuposto de distribuição normal dos dados foi averiguado usando o teste de Shapiro-Wilk e, portanto, testes paramétricos foram empregados. Análise de Variância (ANOVA) mista foi realizada para detectar fatores estatisticamente significativos, ou interações entre eles, que interferiram na variável resposta. Comparações múltiplas de médias foram feitas usando o teste *post-hoc* de Tukey HSD [35,36]. Em todas as análises, o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 3 Resultados

A Tabela 1 mostra os resultados da análise comparativa da quantidade de bactérias (UFC/mL) observadas nos diferentes tempos de avaliação de acordo com cada grupo experimental.

A porcentagem de inibição variou de 10,72 (C-) a 100% (XP Endo + TFD), sendo os valores de UFC/mL diferentes entre todos os protocolos testados ( $p < 0,05$ ). Além disso, os diferentes protocolos testados influenciaram de modo significativo a inibição bacteriana ( $p < 0,05$ ). O protocolo que proporcionou maior percentual de inibição bacteriana foi o XP Endo + TFD (100,0%), seguido do NaOCl + TFD (65,85%) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise comparativa da quantidade de bactérias (UFC/mL) observadas nos diferentes tempos de avaliação de acordo com cada grupo experimental.

Grupos	UFC/mL – Inicial	UFC/mL – 24 horas	% Inibição
	Média ± DP	Média ± DP	
C+	52,07 ± 2,47 <sup>Ac</sup>	32,29 ± 2,16 <sup>Bd</sup>	38,00
C-	43,58 ± 2,37 <sup>Aa</sup>	38,91 ± 1,34 <sup>Be</sup>	10,72
TFD	51,47 ± 2,98 <sup>Ac</sup>	43,67 ± 1,05 <sup>Bf</sup>	15,15
NaOCl + TFD	47,76 ± 2,65 <sup>Ab</sup>	16,31 ± 1,61 <sup>Bb</sup>	65,85
IUP + TFD	47,89 ± 3,10 <sup>Ab</sup>	27,53 ± 1,88 <sup>Bc</sup>	42,51
XP Endo + TFD	44,16 ± 2,67 <sup>Aa</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>Ba</sup>	100,0

*Nota.* Letras diferentes denotam resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ); Letras maiúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intragrupo, T0 vs T1); Letras minúsculas comparam valores na vertical (avaliação intergrupo, C+ vs C- vs TFD vs NaOCl + TFD vs IUP + TDF vs XP Endo + TFD).

#### 4 Discussão

O interesse pela utilização da TFD na Endodontia está relacionado principalmente ao efeito antimicrobiano comprovadamente constatado desta terapia. O estudo dos mecanismos de ação e dos efeitos de novos recursos técnicos aliados a TFD é bastante válido, tendo-se em vista o objetivo de aumentar o índice de sucesso do tratamento endodôntico, pois, apesar da evolução tecnológica, ainda existem falhas no sucesso dessa terapia, muitas vezes associada à persistência de micro-organismos no interior dos canais.

*E. faecalis* foi utilizada neste estudo, porque é um dos micro-organismos mais resistentes encontrados em infecções endodônticas e tem uma maior prevalência em infecções secundárias em comparação com infecções primárias [37]. Como a maioria das falhas ou insucessos endodônticos está relacionada com a permanência de micro-organismos, que não foram removidos após o tratamento endodôntico convencional (PQM ou à medicação intracanal), faz-se necessário que novas estratégias sejam testadas para maximizar a eliminação desta espécie.

A escolha do protocolo de contaminação dos dentes, nesta pesquisa, foi baseada na metodologia proposta por Andrade [34], o qual proporciona uma proliferação maior e mais homogênea, em comparação com outros métodos. Esses aspectos são essenciais para estudos antimicrobianos utilizando modelos *in vitro* de infecções endodônticas, porque produzem resultados mais precisos e evitam falsos negativos. Apesar do estudo de Andrade [34] avaliar contaminação em túbulos dentinários de dentes bovinos, verificou-se, no presente estudo, que a contaminação foi satisfatória em luz de canal, utilizando dentes humanos.

O efeito do tamanho do preparo do canal radicular pode influenciar a eficácia dos procedimentos de irrigação [38]. No presente estudo, os dentes unirradiculares foram preparados com um instrumento de ponta 40 e conicidade 0,6. Este diâmetro apical é clinicamente relevante e permite uma irrigação eficaz da seringa [39]. Além disso, foram selecionados dentes unirradiculares com canais retos para alcançar uma carga bacteriana comparável em todos os grupos, reduzir a variação anatômica e permitir uma amostragem padronizada.

Os resultados da análise comparativa da quantidade de bactérias (UFC/mL) observadas nos diferentes tempos de avaliação, de acordo com cada grupo revelou que os protocolos de irrigação final associados à TFD mostraram uma redução relevante das populações bacterianas e foram significativamente mais eficazes do que o grupo controle. Estes achados confirmam o importante papel da irrigação na redução bacteriana.

A determinação das UFCs no interior do canal radicular é considerada como um método para avaliar a eficácia da desinfecção de vários métodos, sendo aplicada em diversos estudos *in vitro* [40]. Embora seja um método barato e fácil para analisar as contagens bacterianas, permanece questionável se as contagens de UFC refletem de forma real o crescimento bacteriano no interior do canal radicular.

Neste estudo, o grupo TFD sem associação com hipoclorito de sódio resultou em uma porcentagem de inibição bacteriana inferior (15,15% de inibição), quando comparado aos outros grupos, os quais utilizaram NaOCl a 2,5% como irrigante. Fica evidente que a TFD combinada com soro fisiológico é um protocolo insuficiente para reduzir a carga microbiana, e soluções irrigadoras com comprovada ação antimicrobiana, como o NaOCl, faz-se necessário. Este fato está de acordo com estudos anteriores [28, 41] sugerindo que a TFD pode ser um método adjuvante eficaz na desinfecção do canal radicular, mas não um tratamento isolado.

Alguns estudos relatam que a PDT reduz significativamente as contagens de *E. faecalis* em canais radiculares infectados em comparação com os protocolos tradicionais de instrumentação/ irrigação endodôntica [17,29]. No entanto, resultados controversos também foram relatados [28,42].

De forma semelhante ao presente estudo, a escolha do azul de metileno como fotossensibilizador e da luz vermelha a 665 nm foram utilizados em outros estudos visando a eliminação de *E. faecalis* nos canais radiculares de dentes extraídos, exibindo redução bacteriana de até 97% [11,43]. Os resultados de ambos os estudos sugeriram o potencial da TFD para ser usado como um procedimento antimicrobiano adjuvante após desbridamento quimiomecânico endodôntico, mas também demonstraram a importância da utilização de um protocolo de TFD adequado para a fotodestruição bacteriana nos canais radiculares.

Bumb et al [44] utilizaram um laser diodo de 910 nm, potência de 1 W, com tempo de pré-irradiação de 10 minutos e irradiação por três ciclos de 20 segundos. O grupo da TFD mostrou maior eficácia em comparação com o grupo controle, submetidos ao PQM convencional. Outro estudo [45] avaliou a eficácia da TFD com uma luz vermelha de comprimento de onda 665 nm, utilizando como fotossensibilizador o azul de metileno com

concentração de 50 mg/mL. O tempo de pré-irradiação foi de dois minutos, seguido por irradiação de dois ciclos de cinco minutos com intervalo de 2,5 minutos entre eles. A potência utilizada foi de 1W e a dose total de energia foi de 30 J/cm<sup>2</sup>. Os dentes foram divididos em dois grupos: limpeza convencional dos canais radiculares (LC) e TFD + LC. Os resultados do estudo relataram a eficácia superior do TFD + LC em comparação com a LC, corroborando com os resultados desta pesquisa.

Estudos diversos [11-13] mostraram que a TFD é mais eficaz na eliminação dos *E. faecalis* comparado à instrumentação convencional/irrigação. No entanto, esses estudos diferem quanto aos parâmetros do laser utilizados. Os comprimentos de onda do laser de Diodo (635 nm, 805 nm e 628 nm, respectivamente), a potência de saída (1 W, 1 W e 5 W) e o tipo de fotossensibilizador utilizados (azul de metileno, indocianina verde e azul de toluidina, respectivamente) foram variáveis. Além disso, o tempo de irradiação varia entre os estudos. Nos estudos de Bago [29] e Rios et al [46] o tempo de irradiação foi de 60 segundos e 30 segundos, respectivamente. No entanto, em outros estudos [2, 43], os canais radiculares foram irradiados por cinco minutos e dez minutos, respectivamente. Desta forma, não há um consenso na literatura quanto aos parâmetros da TFD que seriam mais eficazes na eliminação do *E. faecalis* dos canais radiculares.

A atividade antibacteriana da IUP em comparação com a irrigação convencional vem sendo pesquisada, mostrando resultados superiores da IUP [47,48] enquanto alguns estudos não encontraram diferença [49,50]. No presente estudo, os grupos IUP + TFD mostraram uma ação antimicrobiana superior ao grupo da irrigação convencional com agulha (C+). Os diferentes achados dos estudos supracitados podem ser atribuídas às diferenças no desenho metodológico, diferenças na anatomia do canal radicular, tipo de bactéria/biofilme incubado, protocolo de instrumentação, solução de irrigação, protocolo IUP e parâmetros da irrigação convencional com agulha. Também é possível que as áreas não tocadas pela irrigação não tenham sido coletadas para análise em microscopia [20].

Em relação à redução bacteriana na luz do canal principal, esta pesquisa obteve resultados semelhantes a um estudo prévio [22], o qual mostrou que a XP Endo proporcionou uma redução bacteriana significativamente maior (98,2%) em comparação com outras técnicas de irrigação. De forma semelhante, em outro estudo [20], a XP Endo, como protocolo de irrigação final, promoveu uma maior redução do biofilme em áreas de difícil alcance no sistema de canais radiculares, comparada à irrigação convencional e à IUP. As coletas em luz de canal também demonstraram que os grupos da XP Endo apresentaram os melhores resultados na redução bacteriana, com taxa de aproximadamente 99%.

A bactéria *E. faecalis* tem a capacidade de penetração nos túbulos dentinários e formar biofilmes [51], o que representa um desafio para a dispersão de agentes antibacterianos. Por isso, as limitações da coleta com pontas de papel absorvente caracterizam uma limitação do presente estudo, pois, por meio desta técnica apenas foi possível analisar a microbiota da luz do canal radicular. Consequentemente, as bactérias residentes em áreas inacessíveis ao desbridamento mecânico não foram coletadas. Mais estudos são necessários para determinar a eficiência dos protocolos de irrigação em diferentes anatomias do canal e em dentes multirradiculares. Além disso, a realização de estudos *in vivo* criará embasamento científico para que os protocolos testados sejam utilizados na prática clínica com segurança.

## 5 Conclusão

A TFD associada a diferentes protocolos de irrigação final foi mais eficaz na inibição de *E. faecalis*, em relação ao seu uso isolado. Além disso, a XP Endo Finisher constitui o melhor protocolo de irrigação no combate à *E. faecalis*.

## 6 Referências

- [1] J. F. Siqueira, I. Rôças. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures, J Endod. 34 (2008) 1291-1301.
- [2] T. C. Pagonis, J. Chen, C.R. Fontana, H. Devalapally, K. Ruggiero, X. Song, et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy, J Endod. 36 (2010) 322–328.
- [3] G. B. Shuping, D. Ørstavik, A. Sigurdsson, M. Trope. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications, J Endod. 26 (2000) 751-755.
- [4] O. A. Peters, K. Schonenberger, A. Laib. Effects of four ni-ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography, Int Endod J. 34 (2001) 221-230.
- [5] D. Ricucci, J. F. Jr. Siqueira. Fate of the tissue in lateral canal and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures, J Endod. 36 (2010) 1-15.
- [6] P. R. Brito, L.C. Souza, J. C. Machado de Oliveira, F. R. Alves, G. De-Deus, Lopes, J.F. Jr. Siqueira. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal Enterococcus faecalis populations: an in vitro study, J Endod. 35 (2009) 1422-1427.

- [7] S. H. Siddiqui, K. H. Awan, F. Javed. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature review, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 10 (2013) 632-643.
- [8] S. Stojicic, H. Amorim, Y. Shen, M. Haapasalo. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection, *Int Endod J.* 46 (2013) 649-659.
- [9] C. Komine, Y. A. Tsujimoto. Small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*, *J Endod.* 39 (2013) 411-414.
- [10] F. Afkhami, S. Akbari, N. Chiniforush. *Enterococcus faecalis* Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An In Vitro Stud, *J Endod.* 43 (2017) 279-282.
- [11] N. S. Soukos, P. S. Chen, J. T. Morris, K. Ruggiero, A. D. Abernethy, S. Som, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection, *J Endod* 32 (2006) 979-984.
- [12] M. Nagayoshi, T. Nishihara, K. Nakashima, S. Iwaki, K.K. Chen, M. Terashita, et al. Bactericidal effects of diode laser irradiation on *Enterococcus faecalis* using periapical lesion defect model, *ISRN Dentistry.* 2011 (2011) 1-6.
- [13] S. Schlafer, M. Vaeth, P. Horsted-Bindslev, E.V. Frandsen. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study, *Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. endod.* 109 (2010) 634-41.
- [14] J. L. Fimple, C. R. Fontana, F. Foschi, K. Ruggiero, X. Song, T. C. Pagonis, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro, *J Endod.* 34 (2008) 728-34.
- [15] F. C. Silva, L. R. P. Freitas, A. P. A. Lourenço, A. C. R. Braga Junior, A. O. C, Jorge, L. D. Oliveira, et al. Análise da efetividade da instrumentação associada à Terapia fotodinâmica antimicrobiana e a medicação intracanal na eliminação de biofilmes de *Enterococcus faecalis*, *Braz. Dent. Sci.* 13 (2010) 31-38.
- [16] C. F. Alfenas, M. F. L. Santos, G. N. M. Takehara, M. V. Q. de Paula. Terapia fotodinâmica na redução de microrganismos no sistema de canais radiculares, *Rev. bras. odontol.* 68 (2011) 68-71.
- [17] S. Vaziri, A. Kangarlou, R. Shahbazi, A. Nazari Nasab, M. Naseri. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an *in vitro* study, *Dent. res. j.* 9 (2012) 613-618.
- [18] M. F. Lacerda, C. F. Alfenas, C. N. Campos. Terapia fotodinâmica associada ao tratamento endodôntico - revisão de literatura, *Rev. facul. odontol.* 19 (2014) 115-120.
- [19] D. Hoedke, C. Enseleit, D. Gruner; H. Dommisch; S. Schlafer, I. Dige; K. Bitter. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo, *Int Endod J.* 51 (2017) 23-34.



- [20] P. Bao, Y. Shen, J. Lin, M. Haapasalo. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals, *J Endod* (43) 2017 321-325.
- [21] G. B. Leoni, M. A. Versiani, Y. T. Silva-Sousa, J. F. Bruniera, J. D. Pécora, M. D. Sousa-Neto. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars, *Int Endod J.* (50) 2017 398–406.
- [22] A. A. Azim, H. Aksel, T. Zhuang, T. Mashtare, J. P. Babu, G. T. Huang. Efficacy of 4 irrigation protocols in killing bacteria colonized in dentinal tubules examined by a novel confocal laser scanning microscope analysis, *J Endod.* (42) 2016 928–34.
- [23] R. R. Amaral, J. C. F. Amorim, E. Nunes, J. A. Soares, F. F. Silveira. Terapia fotodinâmica na endodontia - revisão de literatura, *Rev. facul. odontol.* 15 (2010) 207-211.
- [24] K. Konopka, T. Goslinski. Photodynamic therapy in dentistry, *J. dent. res.* 86, (2007) 694-707.
- [25] A. P. CASTANO, T. N. DEMIDOVA, M. R. HAMBLIN. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2 (2005) 279-293.
- [26] A. S. Garcez, S. C. Nuñez, M. R. Hamblin, M. S. Ribeiro Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion, *J Endod.* 34 (2008) 138-142.
- [27] A. S. Garcez, S. C. Nuñez, M. R. Hamblin, H. Susuki, M. S. Ribeiro. Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment in Patients with Antibiotic-resistant Microflora: A Preliminary Report, *J Endod.* 36 (2010) 1463-1466.
- [28] L. C. Souza, P. R. Brito, J. C. de Oliveira, F. R. Alves, E. J. Moreira, H. R. Sampaio-Filho. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/ irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus Faecalis*, *J Endod*, 36 (2010) 292-296.
- [29] I. Bago, V. Plečko, D. Gabrić Pandurić, Z. Schauerl, A. Baraba, I. Anić. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment, *Int Endod J.* 46 (2013) 339- 347.
- [30] A.R. Thomas, N. Velmurugan, S. Smita, S. Jothilatha. Comparative evaluation of canal isthmus debridement efficacy of modified EndoVac technique with different irrigation systems, *J Endod.* 40 (2014) 1676-1680.
- [31] M. Haapasalo, Z. Wang, Y. Shen, A. Curtis, P. Patel, M. Khakpour. Tissue dissolution by a novel multisonic ultracleaning system and sodium hypochlorite, *J Endod.* 40 (2014) 1178–81.
- [32] J. M. Nusstein. Sonic and ultrasonic irrigation. In: Bettina B, ed. *Endodontic Irrigation: Chemical Disinfection of the Root Canal System*. Switzerland: Springer, 2015, pp 173–98.

- [33] FKG Swiss Endo. XP-endo Finisher: 3d generation. [http://www.kkg.ch/sites/default/files/fkg\\_xp\\_endo\\_brochure\\_en\\_vb.pdf](http://www.kkg.ch/sites/default/files/fkg_xp_endo_brochure_en_vb.pdf), 2016 (Accessed 13 August 2017)
- [34] F. B. Andrade, M. P. Arias, A. G. Maliza, M. A. Duarte, M. S. Graeff, P. A. Amoroso-Silva, et al. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy, *J Appl Oral Sci.* 23 (2015) 591-598.
- [35] A. Hannigan, C. D. Lynch. Statistical methodology in oral and dental research: pitfalls and recommendations, *J. Dent.* 41 (2013) 385-392.
- [36] R. Larson, B. Farber. *Estatística Aplicada*. 6. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall 2016.
- [37] P. Neelakantan, C. Q. Cheng, R. Mohanraj, P. Sriraman, C. Subbarao, S. Sharma. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er:YAG laser in vitro, *Int Endod J.* 48 (2015) 602–610.
- [38] T.Y. Huang, K. Gulabivala, Y. L. Ng A bio-molecular film ex-vivo model to evaluate the influence of canal dimensions and irrigation variables on the efficacy of irrigation, *Int Endod J.* 41 (2008) 60–71.
- [39] K. W. Falk, C. M. Sedgley. The influence of preparation size on the mechanical efficacy of root canal irrigation in vitro, *J Endod.* 31 (2005) 742–5.
- [40] Y. Shen, Y. Gao, J. Lin, J. Ma, Z. Wang, M. Haapasalo. Methods and models to study irrigation, *Endodontic Topics.* 27 (2012) 3-34.
- [41] O. H. Muhammad, M. Chevalier, J. P. Rocca, N. Brulat-Bouchard, E. Medioni. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 11 (2014) 171-81.
- [42] S. Hecker, K. A. Hiller, K. M. Galler, S. Erb, T. Mader, G. Schmalz. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy, *Int Endod J.* 46 (2013) 4449-457.
- [43] F. Foschi, C. R. Fontana, K. Ruggiero, R. Riahi, A. Vera, A. G. Doukas, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals *in vitro*, *Lasers Surg Med.* 39 (2007) 782–787.
- [44] S. S. Bumb, D. J. Bhaskar, C. R. Agali, H. Punia, V. Gupta, V. Singh, et al. Assessment of photodynamic therapy (PDT) in disinfection of deeper dentinal tubules in a root canal system: an in vitro study, *J Clin Diagn Res.* 8 (2014) 67–71.
- [45] R. Ng, F. Singh, D. A. Papamanou, X. Song, C. Patel, C. Holewa, et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo, *J Endod.* 37 (2011) 217-222.
- [46] A. Rios, J. He, G. N. Glickman, R. Spears, E. D. Schneiderman, A. L. Honeyman. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth, *J Endod.* 37 (2011) 8546-859.

- [47] A. J. Harrison, P. Chivatxaranukul, P. Parashos, H. H. Messer. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals, *Int Endod J.* 43 (2010) 968–977.
- [48] G. Layton, W. I. Wu, P. R. Selvaganapathy, S. Friedman, A. Kishen. Fluid dynamics and biofilm removal generated by syringe-delivered and 2 ultrasonic-assisted irrigation methods: a novel experimental approach, *J Endod.* 41 (2015) 884–889.
- [49] B. Bhuvu, S. Patel, R. Wilson, S. Niazi, D. Beighton, F. Mannocci. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intra-radicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth, *Int Endod J.* 43 (2010) 241–50.
- [50] S. S. Paiva, J. F Jr. Siqueira, I. N. Roças, F. L. Carmo, D. C. Leite, D. C. Ferreira, et al. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study, *J Endod.* 39 (2013) 190-194.
- [51] T. Du, Z. Wang, Y. Shen, J. Ma, Y. Cao, M. Haapasalo. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals, *J Endod.* 40 (2014) 509-514.

## 5 CONSIDERAÇÃO FINAIS

- ✓ Este estudo forneceu uma visão sobre o potencial antibacteriano da TFD associada a diferentes protocolos de irrigação final no combate à *E. faecalis* do sistema de canais radiculares.
- ✓ A irrigação com agulha convencional apresentou uma menor porcentagem de inibição comparado ao grupo NaOCl + TFD, o que reforça o papel antimicrobiano coadjuvante da TFD durante a terapia endodôntica.
- ✓ O uso da TFD de forma isolada mostrou resultados inferiores em relação ao seu uso associado com NaOCl, o que demonstra a importância do uso de soluções irrigadoras antimicrobianas durante o tratamento endodôntico.
- ✓ Os resultados desta pesquisa ratificam que a TFD associada a diferentes protocolos de irrigação final foi mais eficaz na inibição de *E. faecalis*, em relação ao seu uso isolado.
- ✓ Dentre os protocolos testados, o grupo da XP Endo associado à TFD mostrou-se mais eficiente na inibição de *E. faecalis*.
- ✓ Considerando a importância da busca de novos métodos de limpeza e eliminação eficiente de micro-organismos dos canais radiculares, faz-se necessária a realização de novos estudos para determinar a eficiência dos protocolos de irrigação em diferentes anatomias do canal e em dentes multirradiculares.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, R. R. et al. Terapia fotodinâmica na endodontia - revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 15, n. 2, p. 207-211, 2010.

AFKHAMI, F.; AKBARI, S.; CHINIFORUSH, N. Entrococcus faecalis Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An In Vitro Study. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 2, 2017.

ALFENAS, C. F. et al. Terapia fotodinâmica na redução de microrganismos no sistema de canais radiculares. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 68, n. 1, p. 68-71, 2011.

AZIM, A. A. et al. Efficacy of 4 irrigation protocols in killing bacteria colonized in dentinal tubules examined by a novel confocal laser scanning microscope analysis. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 42, n. 6, p. 928–34, 2016.

BAGO, I. et al. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 339- 347, 2013.

BAO, P; SHEN, Y; LIN, J; HAAPASALO, M. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. **Journal of Endodontics**, v.43, n.2, 2017.

BRITO, P. R. et al. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal Enterococcus faecalis populations: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 35, n.1, p. 1422-1427, 2009.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 279-293, 2005.

FIMPLE, JL. et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **Journal of Endodontics**, v.34, n. 6, p. 728-34.

FKG Swiss Endo. XP-endo Finisher: 3d generation. Available at: [www.kkg.ch/sites/default/files/fkg\\_xp\\_endo\\_brochure\\_en\\_vb.pdf](http://www.kkg.ch/sites/default/files/fkg_xp_endo_brochure_en_vb.pdf), 2016. Accessed August 2016.

GARCEZ, A. et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 34, n. 2, p. 138-142, 2008.

GARCEZ, A. S. et al. Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment in Patients with Antibiotic-resistant Microflora: A Preliminary Report. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 36, n. 9, p. 1463-1466, 2010.

HANNIGAN A, LYNCH CD. Statistical methodology in oral and dental research: pitfalls and recommendations. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 5, p. 385-392, 2013.

HOEDKE, D.; ENSELEIT, C.; GRUNER D.; DOMMISCH H.; SCHLAFER, S.; DIGE I.; BITTER, K. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. **International Endodontic Journal**, v.51, n.1, p.23-34, 2017.

KOMINE, C.; TSUJIMOTO, Y. A. Small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 411-414, 2013.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

LACERDA, M. F.; ALFENAS, C. F.; CAMPOS, C. N. Terapia fotodinâmica associada ao tratamento endodôntico - revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia**, Passo Fundo, v. 19, n. 1, p. 115-120, 2014.

LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística Aplicada**. 6. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2016.

LEONI, G. B. et al. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. **International Endodontic Journal**, v.50, n. 1, p. 398–406, 2017.

NUSSTEIN, J.M. Sonic and ultrasonic irrigation. In: Bettina B, ed. Endodontic Irrigation: Chemical Disinfection of the Root Canal System. Switzerland: Springer, pp 173–98, 2015.

PAGONIS, T.C. et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 322–328, 2010.

PETERS, O. A; SCHONENBERGER, K.; LAIB, A. Effects of four ni-ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 221-230, 2001.

PINHEIRO, E. T. Microorganisms from canals of root –filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J.F Jr. Fate of the tissue in lateral canal and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. **Journal of Endodontics**, v. 36, n.1, 2010.

SHUPING, G.B; ØRSTAVIK, D; SIGURDSSON, A; TROPE, M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. **Journal of Endodontics**, v.26, n.12, 2000.

STOJICIC, S. et al. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 649-659, 2013.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.34, n.11, p. 1291-1301, 2008.

SILVA, F. C. et al. Análise da efetividade da instrumentação associada à Terapia fotodinâmica antimicrobiana e a medicação intracanal na eliminação de biofilmes de *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Dental Science**, São José dos Campos, v. 13, n. 5, p. 31-38, Jan/Jun. 2010.

SOUZA, L.C et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/ irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus Faecalis*. **Journal of Endodontics**, v.36, n.2, 2010.

SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 32, n. 10, p. 979-984, 2006.

SIDDIQUI, S. H.; AWAN, K. H.; JAVED, F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature review. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 632-643, 2013.

THOMAS, A.R.; VELMURUGAN, N.; SMITA, S.; JOTHILATHA, S. Comparative evaluation of canal isthmus debridement efficacy of modified EndoVac technique with different irrigation systems. **Journal of Endodontics**, v.40, n.10, 2014.

VAZIRI, S. et al. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an *in vitro* study. **Dental Research Journal**, Isfahan, v. 9, n. 5, p. 613-618, 2012.

VERA, J, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. **Journal of Endodontics**, v.38, n.8, 2012.

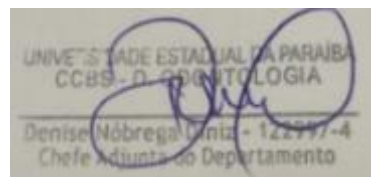
WALTIMO, T. M et al. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. **Endodontic Topics**, Oxford, v.9, n.1, p. 66-78, 2004.



**ANEXO A****TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL**

Estamos cientes da intenção da realização do projeto intitulado “**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA DESINFECÇÃO DOS CANAIS RADICULARES ASSOCIADA A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO**” desenvolvida pela aluna Gabriella de Vasconcelos Neves do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba e orientado pela Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes.

**Campina Grande, 18 de Outubro de 2017.**



Assinatura e carimbo do responsável institucional

**ANEXO B**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA DESINFECÇÃO DOS CANAIS RADICULARES ASSOCIADA A DIFERENTES PROTOCOLOS DE

**Pesquisador:** Daliana Queiroga de Castro

**Gomes Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 79027617.8.0000.5187

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**SITUAÇÃO DO PROJETO:** APROVADO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.452.883

**Apresentação do Projeto:**

Projeto intitulado: “AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO FINAL NO COMBATE AO ENTEROCOCCUS FAECALIS DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES” encaminhado para análise ao Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar, in vitro, o potencial antibacteriano da TFD associada a diferentes protocolos de irrigação final no combate ao Enterococcus faecalis do sistema de canais radiculares.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Ausência de riscos

**Benefícios:** Até o momento, existem poucos trabalhos que investigaram a ação conjunta da TFD associada aos protocolos finais de irrigação na redução de Enterococcus faecalis dos canais radiculares. Assim, para que se empregue a TFD e se observe uma boa atividade antibacteriana, é importante que novos estudos sejam realizados para validação de protocolos efetivos na redução microbiana em dentes infectados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Setenta e cinco pré-molares unirradiculares serão selecionados para a pesquisa. Em seguida, serão contaminados com 0,1 mL de E. Faecalis ( $3 \times 10^8$  cel/mL) e divididos aleatoriamente em cinco grupos de tratamento (n = 15): Grupo C+ (Preparo químico-mecânico + irrigação

convencional com agulha); Grupo C – (controle negativo); Grupo TFD (Preparo químico-mecânico + terapia fotodinâmica); Grupo IUP (Preparo químico-mecânico + Irrigação ultrassônica passiva + Terapia fotodinâmica); Grupo XP Endo (Preparo químico-mecânico + XP endo + Terapia fotodinâmica). O conteúdo do canal será coletado com pontas de papel estéreis em três momentos: antes do preparo químico-mecânico, imediatamente após o preparo e após sete dias do período de incubação. O número de unidades formadoras de colônias de *E. faecalis* (UFC) será determinado para cada canal radicular.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Sem pendências.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

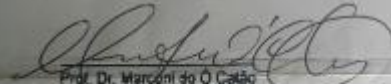
**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

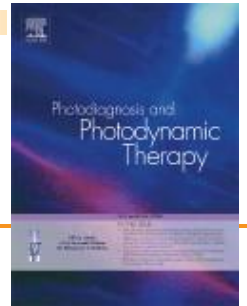


Prof. Dr. Marconi do O Catão  
Coordenador do Curso de Pós-graduação em  
Pesquisa em Saúde Bucal da  
Universidade Estadual de Paraíba  
Prof. Dr. Marconi do O Catão  
Coordenador CEP-UEPB



# PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY

**AUTHOR  
INFORMATION PACK**



## GUIDE FOR AUTHORS

### INTRODUCTION

#### Scope

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

#### Types of manuscript

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

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

#### *Editorials*

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

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

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

**Short Communications** should not exceed 1000 words and should consist of a background section (not to exceed 100 words), aims (not to exceed 50 words), methods (not to exceed 250 words), results (not to exceed 250 words) and conclusion (not to exceed 250 words). An abstract of 150-200 words should also be provided. The editorial team reserves the right to decide which tables/figures submitted are necessary. No abstract is 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).

### 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 throughout [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 peerreviewed 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 researchfunder 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 [green 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 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 (<http://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. <http://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 <http://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 lowercase 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>

### Graphical abstract

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

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

### 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.

### 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) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [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 encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. 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** and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor 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.](#)

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 plugins 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 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.

Reference to a book:



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

[3] 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] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### 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](#).