



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

THAYSE PITHON QUADROS RAVAZZI

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)
COM CURCUMINA NANOTECNOLÓGICA E LED AZUL
450nm SOBRE BIOFILMES MULTIESPÉCIES EM CANAIS
RADICULARES**

Vitória da Conquista, BA
2022

THAYSE PITHON QUADROS RAVAZZI

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)
COM CURCUMINA NANOTECNOLÓGICA E LED AZUL
450nm SOBRE BIOFILMES MULTIESPÉCIES EM CANAIS
RADICULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Francine Cristina Silva Rosa
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA
2022

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Ravazzi, Thayse Pithon Quadros

Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com curcumina nanotecnológica e led azul 450nm sobre biofilmes multiespécies em canais radiculares / Thayse Pithon Quadros Ravazzi. - 2022.

113 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francine Cristina Silva Rosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Biociências / Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2022.

1. Dente. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Curcumina. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Rosa, Francine Cristina Silva. III. Título

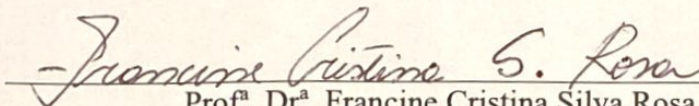
CDU: 616.314:615.831

THAYSE PITHON QUADROS RAVAZZI

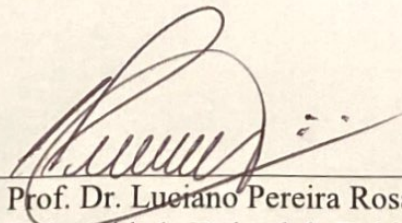
**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)
COM CURCUMINA NANOTECNOLÓGICA E LED AZUL
450nm SOBRE BIOFILMES MULTIESPÉCIES EM CANAIS
RADICULARES**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

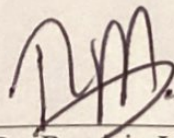
Vitória da Conquista – BA, 13/12/2022.



Prof.^a. Dr.^a. Francine Cristina Silva Rosa
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Luciano Pereira Rosa
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Rogério Vieira Silva
Faculdade Independente do Nordeste

Dedico este trabalho à minha mãe, Lia, por estar sempre presente, por todo o amor e dedicação que fizeram de mim uma pessoa de bem, e fonte de inspiração de uma vida inteira na docência. Ao meu pai Roney (in memoriam) e que tenho certeza que de onde estiver está sempre torcendo por mim. A todos os meus familiares, que estiveram de alguma forma presente em minha vida, contribuindo para o que eu sou hoje. Aos meus sobrinhos lindos, que me mostram a cada dia a beleza de se viver com um sorriso de criança. A meu esposo Rodrigo, pelo sentimento e todos os momentos, por estar ao meu lado sempre e pelas ajudas diretas e indiretas neste trabalho. Por me fazer acreditar que, sim, é possível amar e ser amado. A minha filha Carolina, que mesmo pequena, compreendeu todos os momentos dedicados para a realização desse sonho. Você é a razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua infinita bondade, traçou os meus caminhos e me permitiu estar aqui hoje. Agradeço ainda pelo dom da vida por Ele concedido, pelos obstáculos superados, objetivos alcançados e pela concretização deste sonho.

À Nossa Senhora das Graças, que sempre esteve a minha frente, desatando meus nós, e me iluminando a cada etapa deste estudo.

À minha orientadora Profa. Dra. Francine Cristina da Silva Rosa por possibilitar a realização deste estudo. Agradeço pela confiança depositada em mim e pela paciência em me ajudar a desenvolver esta dissertação. Você é um exemplo de pesquisadora a ser seguido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, coordenado pelo Prof. Dr. Luciano Rosa. Agradeço pelo conhecimento passado a mim e a ajuda para o desenvolvimento deste trabalho. Aos professores de todas as disciplinas do Mestrado em Biociências e aos colegas do Mestrado, obrigado pelos momentos juntos.

Obrigado aos alunos da iniciação científica, Gabriel, Thaís e Iasmym. Um agradecimento em especial para Iasmym, pela amizade, dedicação, compreensão e atenção. Obrigada por estarem todos os dias ao meu lado durante esse árduo projeto, por toda a ajuda, e principalmente, por vencer esse desafio comigo, sentirei falta de cada dia de laboratório. Mostraram que a soma é mais importante que a divisão.

À funcionária do laboratório de microbiologia da UFBA, Janeide, pela ajuda e atenção sempre que precisei.

Ao amigo e Prof Dr Rogério Vieira Silva, pela prontidão em aceitar fazer parte desta banca de defesa, juntamente com o Prof Dr Luciano Rosa.

À todos os meus amigos pessoais e da docência que estão presentes em minha vida. Podem ter certeza que tem uma parcela muito importante na conquista deste título.

A todos os familiares por todo apoio e carinho dado a mim durante toda a minha vida.

“Ninguém vale pelo que sabe, mas pelo que faz com aquilo que sabe.”
Autor: Leonardo Boff

RAVAZZI, Thayse Python Quadros. Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com curcumina nanotecnológica e LED azul 450nm sobre biofilmes multiespécies em canais radiculares. 115 f. il. 2022. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2022.

RESUMO

A erradicação dos microrganismos nos canais radiculares é um dos principais objetivos da terapia endodôntica e está relacionada com o sucesso do tratamento. A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (*antimicrobial Photodynamic Therapy* – aPDT) tem despontado como uma nova terapia que visa eliminar microrganismos persistentes ao preparo químico mecânico. O objetivo do estudo foi analisar a eficácia da utilização da aPDT mediada por curcumina nanotecnológica, ativada por LED azul (450nm), sobre a eliminação de microrganismos organizados em biofilme multiespécies, no interior de condutos radiculares de dentes humanos ex vivos. Foram utilizados 40 dentes humanos unirradiculares, que foram randomizados nos grupos experimentais (n=10): grupo controle – sem tratamento; grupo fotossensibilizador (FS) – curcumina nanotecnológica utilizada isoladamente; grupo Luz – LED azul utilizado isoladamente; e grupo aPDT – curcumina nanotecnológica ativada pelo LED azul. Para a realização dos testes, o interior dos condutos radiculares foram contaminados por técnica de transposição de biofilme multiespécie constituídos pelas espécies de *Candida albicans* (ATCC 90029), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Staphylococcus aureus metilino resistente* - MRSA (ATCC 43300). Após o período de incubação, os canais foram tratados conforme os grupos experimentais, sendo que no grupo controle não houve tratamento e sim a realização da coleta aspirando-se 1mL do conteúdo do conduto radicular que foi semeado nos meios seletivos ágar sabouraud dextrose com cloranfenicol, ágar mitis salivarius bacitracina sacarose, ágar Mac Conkey, ágar manitol e incubados em estufa B.O.D. por 24h a 36°C. Posteriormente, foram contadas as UFC/mL. No grupo FS foi adicionado ao conduto radicular 80µg de curcumina, esperou-se o tempo de pré-irradiação e os mesmos procedimentos da coleta, semeadura do conteúdo do conduto radicular e contagem de UFC/mL foram realizadas; no grupo luz foi realizada a irradiação da entrada dos condutos radiculares com LED azul por 5 min (450nm; 1000 mW/cm²; 300J/cm²) e após esta etapa foi realizada coleta, semeadura do conteúdo dos condutos e contagem de UFC/mL. No grupo aPDT os condutos foram preenchidos com o FS, esperou-se o tempo de pré-irradiação, e realizou-se a irradiação com LED azul por 5 min, e posteriormente o conteúdo do conduto foi coletado, semeado e foram contadas as UFC/mL. Os dados de redução do número de Log₁₀ UFC/mL dos microrganismos estudados foram comparados entre os grupos testados utilizando-se o teste estatístico ANOVA (5%) com Post hoc de Tukey.. Concluiu-se que, o tratamento com aPDT utilizando-se curcumina nanotecnológica apresentou efetividade estatística na redução de todos os microrganismos estudados na forma de biofilme multiespécie, sendo que a média de redução foi maior que 1,5 Log₁₀ para todos os microrganismos, exceto *Candida albicans*, embora esta última também tenha mostrado redução.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Endodontia; LED; Curcumina; Nanotecnologia; Biofilmes.

RAVAZZI, Thayse Pithon QuadrosBR Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) with nanotechnological curcumin and 450nm blue LED on multispecies biofilms in root canals. 115 f. il. 2022. Dissertation (Masters) – Multidisciplinary Institute in Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2022.

ABSTRACT

The eradication of microorganisms in the root canals is one of the main goals of endodontic therapy and is related to the success of the treatment. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) has emerged as a new therapy that aims to eliminate persistent microorganisms in the chemical-mechanical preparation. The aim of this study was to analyze the effectiveness of using aPDT with nanotechnological curcumin activated by blue LED (450nm) on the elimination of microorganisms organized in multispecies biofilm, inside the root canals of natural human teeth in vitro. Sectioned roots of 40 single-rooted human teeth were used, which were randomized into experimental groups (n=10): control group – no treatment; photosensitizer group (FS) – nanotechnological curcumin used alone; Light group – blue LED used alone; and aPDT group – nanotechnological curcumin activated by blue LED. For the tests, the inside of the root canals were contaminated by a multispecies biofilm transposition technique consisting of species of *Candida albicans* (90029), *Enterococcus faecalis* (29212), *Escherichia coli* (25922), and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA (43300). After the incubation period, the root canals were treated according to the experimental groups, and in the control group there was no treatment, but the collection was carried out by aspirating 1mL of the root canal content that was seeded in the selective media sabouraud dextrose agar with chloramphenicol, mitis salivarius bacitracin sucrose agar, Mac Conkey agar, mannitol agar and incubated in a B.O.D. for 24 hours at 36°C. Subsequently, the CFU/mL were counted. In the FS group, 80µg of curcumin was added to the root canal, the pre-irradiation time was waited and the same procedures for collection, seeding of the root canal content and CFU/mL count were performed; in the light group, the entrance of the channels was irradiated with blue LED for 5 min (450nm; 1000 mW/cm²; 300J/cm²) and after this step, collection, seeding of the content of the channels and counting of CFU/mL were performed. In the aPDT group, the conduits were filled with FS, the pre-irradiation time was waited, and the irradiation was performed with blue LED for 5min, and later the conduit contents were collected, seeded and the CFU/mL were counted. The data on the reduction in the number of Log₁₀ CFU/mL of the microorganisms studied were compared between the groups tested using the ANOVA statistical test (5%) with Tukey's post-hoc. It was concluded that the treatment with aPDT using nanotechnological curcumin was statistical effectiveness in reducing all microorganisms studied in the form of multispecies biofilm, and the average reduction was greater than 1.5 Log₁₀ for all microorganisms, except *Candida albicans*, although the latter also showed a reduction.

Keywords: Photodynamic therapy; Endodontics; LED; Curcumin; Nanotechnology; Biofilms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ilustração do espécime preparado, a partir da secção da coroa dentária.....	25
Figura 2	A: Foto do espécime preparado e isolado; B: Foto dos espécimes fixados em eppendorfs.....	26
Quadro 1	Comprimento de onda e densidade óptica utilizados para obtenção das suspensões contendo 1×10^6 céls./mL dos microrganismos.....	27
Figura 3	A: Transposição do biofilme; B: Espécimes contaminados com biofilme e selados com bolinha de algodão estéril.....	28
Quadro 2	Delineamento do screening de concentração e tempo ideal da aPDT.....	30
Figura 4	A: Confecção das diversas concentrações de curcumina; B: modelo do espécime para tratamento da aPDT nas diversas concentrações das curcuminas testadas; C: aPDT.....	30
Figura 5	A: aparelho de emissão de irradiação LED, VALLO; B: foto mostrando o preenchimento do conduto com corante curcumina; C: conduto preenchido com o fotossensibilizante; D: foto mostrando a irradiação na entrada do canal radicular do espécime do grupo LED e aPDT.....	31

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

aPDT	Antimicrobial Photodynamic Therapy
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilino resistente
FS	Fotossensibilizador
LPS	Lipopolissacarídeos
ME	Microemulsão
SCR	Sistema de Canais Radiculares
pH	Potencial hidrogeniônico
CUR	Curcumina
%	Porcentagem
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
mL	Mililitro
L	Litro
UFC	unidade formadora de colônia
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
Log ₁₀ UFC/mL	Logarítmo de 10 de unidade formadora de colônia por mililitro
m	Minutos
s	Segundos
mW/cm ²	Miliwatts por centímetro quadrado
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
ATCC	American Type Culture Collection
LED	Light Emitting Diode
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Características microbiológicas da infecção endodôntica.....	15
2.2	A relação da complexidade do sistema de canais radiculares (SCR) e a dificuldade de eliminação de microrganismos na Endodontia.....	18
2.3	Potencial da curcumina na Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em Endodontia.....	20
2.4	A nanotecnologia utilizada para melhorar as condições técnicas dos agentes fotossensibilizadores utilizados em aPDT.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	Preparo dos espécimes para execução dos testes.....	25
4.2	Desenvolvimento da técnica de “transposição de biofilme experimental” multiespécies.....	26
4.3	Testes para obtenção da concentração de curcumina, tempo de pré-irradiação e tempo de irradiação ideais para realização dos procedimentos experimentais.....	29
4.3.1	Preparo da curcumina nanotecnológica.....	29
4.3.2	Screening da concentração do fotossensibilizante.....	29
4.4	Procedimentos experimentais.....	30
4.4.1	Grupos experimentais e coleta do conteúdo intracanal.....	30
4.4.2	Processamento das amostras.....	32
4.5	Análise Estatística dos resultados.....	32
6	REFERÊNCIAS.....	33
7	CAPÍTULO 1.....	38
8	CHAPTER 1.....	56
	ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	71
	ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	72
	ANEXO C – NORMAS PARA SUBMISSÃO NA REVISTA LASER IN MEDICAL SCIENCE.....	73
	ANEXO D – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO.....	113

1. INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico convencional é realizado por meio do preparo mecânico do canal radicular acompanhado de limpeza química e irrigação do sistema de canais radiculares (SCR) com irrigantes como clorexidina (CHX) e hipoclorito de sódio (NaOCl), seguido da aplicação de medicamentos e selamento dos canais radiculares. Salienta-se que estas soluções irrigadoras têm propriedades antibacterianas e podem diminuir consideravelmente o número de bactérias (POURHAJIBAGHER et al., 2018).

Alguns microrganismos podem formar biofilmes difíceis de serem eliminados, além de suportar um pH mais alto. Ademais, as soluções irrigadoras por vezes não conseguem eliminá-los completamente devido à penetração insuficiente das mesmas nos túbulos dentinários e ramificações do SCR, de forma que os microrganismos conseguem adentrar muito mais profundamente nestes túbulos do que as soluções em questão (BUMB et al., 2014).

Com o objetivo de potencializar o efeito antimicrobiano, o tratamento local com terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) mostrou tendência de eliminação bacteriana significativa, que também se mostrou eficaz na ruptura de biofilmes. Esta terapia pode melhorar o resultado clínico, aumentando a taxa de sucesso em procedimentos endodônticos convencionais e cirúrgicos devido à sua eficiente eliminação de bactérias resistentes. Além disto, esta terapia se mostrou segura e previsível, e a literatura não relatou resistência ao seu uso até o momento (ABDELKARIM-ELAFIFI et al., 2021).

A aPDT causa a erradicação de bactérias mediada por agentes fotossensibilizadores como azul de metileno e verde de indocianina. Atualmente, pesquisas estão sendo direcionadas para a produção de materiais sensíveis à luz com propriedade de inibição seletiva para reduzir infecções oportunistas, o que engloba o uso da curcumina, conhecida também pelo nome científico de *Cúrcuma Longa*. Esta é uma erva de fortes características antioxidantes. Além disso, o ingrediente ativo da cúrcuma, ou seja, a curcumina (CUR) possui atributos anti-inflamatórios e analgésicos, semelhantes aos analgésicos convencionais, além de atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas (AZIZI et al., 2019).

A fim de melhorar a biodisponibilidade e a ligação das células microbianas a CUR, têm sido sugerido o uso de nanotecnologia para aPDT. Assim, relata-se que a nanotecnologia não

apenas fornece uma solução eficiente para melhorar a solubilidade em água do CUR, mas também pode acelerar a penetração e localização da mesma nas superfícies das células microbianas e aumentar sua biodisponibilidade. Além disso, também foi demonstrado previamente que a curcumina nanotecnológica associada a estratégias de uso eficazes pode melhorar a liberação de fármacos (POURHAJIBAGHER et al., 2020).

Neste contexto, uma abordagem não invasiva com alta eficácia e baixa citotoxicidade é necessária para a eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares. Portanto, o objetivo do estudo foi analisar a eficácia da utilização da aPDT mediada por curcumina nanotecnológica, ativada por LED azul (450nm), sobre a eliminação de microrganismos organizados em biofilme multiespécies, no interior de canais radiculares de dentes humanos ex-vivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características microbiológicas da infecção endodôntica

A terapia endodôntica ocorre, de uma perspectiva biomecânica, realizando-se a limpeza, modelagem e antissepsia dos canais radiculares, permitindo a obturação tridimensional do sistema de canais radiculares. No entanto, a complexidade anatômica do canal radicular apresenta desafios e dificuldades clínicas que muitas vezes comprometem o objetivo principal dessa terapia. Assim, como em qualquer procedimento cirúrgico, a terapia endodôntica deve ser precedida por um profundo conhecimento da câmara pulpar e da anatomia do canal radicular. Uma vez acessada essa anatomia complexa, o resultado está diretamente relacionado à eliminação e prevenção da contaminação microbiana (PABLO et al., 2010).

Atualmente, mais de 1.000 espécies bacterianas pertencentes a 13 filotipos já foram identificadas na cavidade oral. Essas espécies são capazes de atingir o SCR e são potenciais patógenos endodônticos. Dentre as mesmas, 486 foram encontradas em infecções endodônticas agudas, 265 em infecções crônicas e 165 em ambos os casos. Além disto, um número limitado de espécies tem sido consistentemente isolado de infecções endodônticas devido às limitações dos métodos dependentes de cultura, uma vez que aproximadamente 50% da microbiota oral ainda não pode ser cultivada pelos meios laboratoriais disponíveis (NÓBREGA et al., 2016).

Foi relatado previamente que a microbiota encontrada no SCR é polimicrobiana, com predominância de bactérias anaeróbias Gram-negativas, embora um número significativo de bactérias Gram-positivas também tenha sido detectado. A presença de bactérias Gram-negativas é importante, tanto em termos de resposta inflamatória do hospedeiro quanto de significância clínica, devido à presença de endotoxinas, como o lipopolissacarídeos(LPS) que estão envolvidas em muitas atividades biológicas, incluindo indução de febre, citotoxicidade, fibrinólise e estimulação da produção de bradicinina. Quanto às bactérias Gram-positivas, suas paredes celulares contêm peptidoglicanos e ácido lipoteicóico, que também são capazes de influenciar reações inflamatórias e aumentar a patogenicidade dessas espécies (NÓBREGA et al., 2016).

A invasão do espaço endodôntico se dá por uma sequência de eventos que culmina na seleção da composição da microbiota endodôntica. Desta forma, inicialmente ocorre a penetração de bactérias no interior do SCR, por processo carioso ou através dos túbulos dentinários, por exemplo, após traumas dentários sem exposição pulpar. Nestes casos, as primeiras bactérias a surgirem são geralmente anaeróbios facultativos ou aeróbios. Posteriormente, o ambiente endodôntico apresenta uma concentração reduzida de oxigênio, o que promove o desenvolvimento de uma estrutura bacteriana anaeróbica, levando também em conta que o consumo de oxigênio com a produção de derivados do metabolismo aeróbio produz um ambiente seletivo para bactérias anaeróbicas (DIOGUARDI et al., 2019).

Algumas espécies microbianas são particularmente importantes na colonização do SCR e representam desafios para o sucesso do tratamento endodôntico. Dentre as espécies, destaca-se *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) pela persistência pós tratamento e sua relação com casos refratários (ALGHAMDI e SHAKIR, 2020), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) por sua resistência aos antimicrobianos utilizados nas terapias convencionais (LIU et al., 2018), *Escherichia coli* (*E. coli*) por ser uma bactéria Gram-negativa comumente encontrada nos processos infecciosos que envolvem os canais radiculares e a dificuldade do tratamento em neutralizar a atividade agressiva dos LPS das espécies Gram-negativas (SANTEZI et al., 2018) e, por fim, as espécies de *Candida* que são fungos leveduriformes que relacionados às infecções endodônticas aumentam a dificuldade do tratamento e estão associados aos casos de insucesso dos mesmos (HSIEH et al., 2018).

Embora o preparo químico-mecânico do SCR adequada do canal e a irrigação adequada com hipoclorito de sódio possam diminuir o número de bactérias, ela não pode remover completamente *E. faecalis* do canal radicular. Este é um coco Gram-positivo anaeróbio que normalmente surge na cavidade oral humana, trato gastrointestinal e trato geniturinário, correlacionando-se a esses ambientes com ricos nutrientes e baixos níveis de oxigênio e ecologia complexa. A literatura ressalta que este microrganismo foi encontrado em muitos casos de falha no tratamento endodôntico, porém com menos frequência em infecções primárias. Assim, dentre os casos relatados com dor e infecção pós-terapia endodôntica, observou-se que *E. faecalis* é o mais comumente encontrado, com valores de prevalência chegando a 90% (ALGHAMDI e SHAKIR, 2020).

E. faecalis é um microrganismo amplamente avaliado, tendo sido testado previamente quando ao tratamento endodôntico, o que revelou alta resistência do mesmo a agentes antimicrobianos. Além disso, este microrganismo pode sobreviver em ambientes muito hostis,

com baixo fornecimento de nutrientes e pH alto de até 11,5. Ademais, ressalta-se que a capacidade do *E. faecalis* de crescer como um biofilme nas paredes do canal radicular e como uma mono-infecção em canais tratados a torna um patógeno de grande resistência ao tratamento endodôntico (ESTRELA et al., 2008; MURAD et al., 2012).

Acredita-se que esse tipo de bactéria possui maior resistência comparada às demais, sobretudo por possuir uma bomba de prótons, capaz de sobreviver a um pH alcalino, justificando a ineficácia do uso de medicamentos intracanaís a base de hidróxido de cálcio (EVANS et al., 2002).

S. aureus é um coco Gram positivo anaeróbio facultativo, imóvel, não esporulado, que é fonte de infecções periodontais, periapicais e endodônticas. É um componente da microbiota oral frequentemente presente na cavidade oral e região perioral. É um dos microrganismos resistentes e está frequentemente associado a tratamentos endodônticos com insucesso, desempenhando um papel relevante nas infecções primárias e secundárias do canal radicular. É responsável por uma variedade de infecções humanas, incluindo lesões superficiais na pele e abscessos localizados, infecções do sistema nervoso central, osteomielite, endocardite invasiva, artrite séptica, septicemia, pneumonia e infecções do trato urinário. Estima-se que a mortalidade por bacteremia por *S. aureus* está entre 13% e 26% (PARVEKAR et al., 2020).

Neste contexto, entende-se que muitas cepas de *S. aureus* apresentam resistência a antibióticos, sendo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) a espécie que causa a maioria das infecções hospitalares, o que traz uma dificuldade aos profissionais responsáveis (SCHUENCK-RODRIGUES et al., 2020). Aliado a este fato temos a facilidade com que a cavidade oral é comumente colonizada, com prevalências chegando a 19% dos pacientes institucionalizados investigados que carregavam MRSA em sua cavidade oral (KAREN et al., 2013).

Outros microrganismos envolvidos no estudo da Endodontia, os fungos, foram previamente isolados de aproximadamente 3 a 18% do SCR infectados, com predominância das espécies de *Candida*, sendo *Candida albicans* (*C. albicans*) o fungo mais comumente isolado. Este microrganismo se liga a superfícies bióticas e abióticas, como próteses dentárias e dentina dentária, além de ser dentinofílico e colonizar as paredes dentinárias do SCR, penetrando nos túbulos dentinários, ramificações em geral e formando biofilmes. Suas células aderem às superfícies dentinárias ao longo de 60 a 90 min e então proliferam para formar uma camada basal de biofilme que amadurece em 24h. Seus biofilmes maduros consistem em formas de hifas, pseudo-hifas e leveduras que são incorporadas em matrizes extracelulares, criando

estruturas espessas e fisioquimicamente duras. Estima-se que a *C. albicans* dentro de biofilmes seja 10 a 100 vezes mais resistente às respostas imunes do hospedeiro e ao tratamento antifúngico, porque o crescimento celular e o metabolismo são retardados e protegidos por substâncias poliméricas extracelulares e fatores protetores (YOO et al., 2020).

Dentre as bactérias Gram-negativas, *E. coli* é conhecida por seu papel epidemiológico, sendo particularmente perigosa para pessoas imunocomprometidas. Estes microrganismos foram detectados em cavidades orais de pacientes com doenças sistêmicas e, entre seus bastonetes, as cepas enteropatogênicas, enterotóxicas e enterohemorrágicas podem ser os agentes causadores de infecções hospitalares e sepse (ZAWADZKI et al., 2017). Além disto, ressalta-se que, dadas as condições nutricionais e ambientais adequadas, ela tem a capacidade de sobreviver e até mesmo dominar entre as espécies orais, quando mescladas em um biofilme polimicrobiano (THURNHEER e BELIBASAKIS, 2015).

A maioria das bactérias orais são comensais, mas dependendo da resposta imune do hospedeiro e das interações microbianas, elas contribuem para doenças bucais. Como as espécies bacterianas em geral, as bactérias orais possuem a capacidade de formar biofilmes em superfícies sólidas na presença de fluidos contendo nutrientes. Estes biofilmes protegem as células bacterianas dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos antibióticos e disseminam células bacterianas planctônicas que podem causar doenças. As infecções endodônticas correlacionam-se etiologicamente com biofilmes endodônticos existentes como biofilmes intracanal, radicular externo e periapical. Assim, os microrganismos podem penetrar nos túbulos dentinários e, devido à presença de colágeno não mineralizado na superfície dos túbulos, os colonizadores iniciais podem aderir a estes, construir o biofilme e persistir mesmo em canais radiculares tratados. O biofilme endodôntico relacionado à pulpíte é composto principalmente por bactérias relacionadas à cárie, enquanto a invasão de microrganismos através dos túbulos dentinários resulta em alterações na composição do biofilme, que é caracterizada pelo domínio de bastonetes anaeróbios Gram-negativos e bactérias proteolíticas (LUKIC et al., 2020).

2.2 A relação da complexidade do sistema de canais radiculares (SCR) e a dificuldade de eliminação de microrganismos na Endodontia

A chave para o sucesso do tratamento endodôntico seria o debridamento completo do sistema de canais radiculares, removendo tecidos pulparem necróticos ou infectados, microrganismos e realizando o selamento completo do espaço do canal radicular. Isso evitará a persistência da infecção e a reinfecção do espaço do canal radicular. Neste quesito, o insucesso do tratamento endodôntico pode ser determinado com base nos sinais e sintomas clínicos e achados radiográficos do dente tratado endodonticamente. Dentre os causadores deste insucesso, está a complexidade anatômica do canal radicular. Assim, a falha em localizar e tratar todos os canais do sistema de canais radiculares é considerada uma das principais causas dos insucessos no tratamento endodôntico (IQBAL, 2016).

As causas de falha endodôntica podem ser classificadas em fatores biológicos e técnicos. As falhas também podem ser causadas por erros de procedimento, como perfuração da raiz, instrumentos fraturados ou canais perdidos. As falhas relacionadas aos microrganismos podem ser causadas por dificuldades anatômicas como istmo, ramificação apical e outras irregularidades morfológicas, que geram uma complexidade que os torna difíceis de limpar, moldar e obturar de forma eficaz (KIM et al., 2018).

Outros fatores também que influenciam a presença de bactérias residuais que podem influenciar o resultado final do tratamento endodôntico seriam quando: elas conseguem resistir a períodos de escassez nutricional, assumindo um estado de dormência ou um estado de baixa atividade metabólica, e quando a fonte de nutrientes é restabelecida, podem voltar a sua atividade normal (PAZ et al., 2008); se organizam e atingem densidade populacional necessária para causar dano ao hospedeiro e produzem fatores de virulência que atingem concentrações suficientes para induzir dano aos tecidos perirradiculares (JHAJHARIA et al., 2015); possuem acesso aos tecidos perirradiculares através de perfurações, provocando uma resposta inflamatória que resulta em fístulas, incluindo processos de reabsorção óssea (KAKANI et al., 2015).

Ademais, curvaturas e variações anatômicas internas complexas do sistema de canais radiculares podem representar um alto grau de dificuldade para atingir os objetivos de tratamento. Em dentes infectados, as bactérias podem persistir em áreas de difícil acesso, como istmos, ramificações, túbulos dentinários e canais em forma de C ou oval (SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2018).

Várias soluções irrigantes e medicamentos estão à disposição para eliminar os patógenos endodônticos, entretanto ainda não é possível uma eliminação completa destes microrganismos no SCR. Os agentes irrigantes e antimicrobianos/medicamentos podem ainda serem responsáveis pelo surgimento de cepas resistentes que torna o tratamento ainda mais difícil representando um obstáculo relacionado à efetividade dos materiais em Endodontia na atualidade (IBRAHIM et al., 2017).

Os antibióticos utilizados na terapia endodôntica podem atuar de três formas distintas: local, sistêmica ou profilática. No entanto, o tratamento endodôntico convencional comumente não necessita de terapia antibiótica sistêmica concomitante, o que está possivelmente relacionado à ausência de circulação sanguínea no local alvo. Já a utilização tópica pode alcançar a redução significativa do número de bactérias (ATHANASSIADIS et al., 2007) possibilitando que o próprio sistema imunológico do indivíduo atue efetivamente na eliminação dos microrganismos residuais. Ainda assim, a terapia antibiótica sistêmica deve ser considerada, pois a mesma é capaz de impedir o desenvolvimento de infecções secundárias em pacientes imunologicamente comprometidos (SIQUEIRA JÚNIOR, 2002).

Conforme salientado anteriormente por Estrela et al. (1995), os antibióticos podem inibir o crescimento, a reprodução ou causar a morte de bactérias, e isto se dará pela sua ação na parede celular ou alteração na permeabilidade da membrana destes microrganismos. Apesar disso, algumas combinações podem não afetar todo o conjunto de microrganismos do SCR (ATHANASSIADIS et al., 2007).

2.3 Potencial da curcumina na Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) em Endodontia

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) foi definida anteriormente como "a inativação induzida pela luz a células, microrganismos ou moléculas". Desde a sua introdução, vários termos para aPDT foram sugeridos, como quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica e desinfecção fotodinâmica. A ciência por trás da aPDT segue os princípios de que uma luz é capaz de excitar um agente fotossensibilizador não tóxico (FS) em seu local alvo com efeitos

mínimos no tecido circundante, sendo que este FS é um fotossensibilizador com capacidade de absorver energia de uma fonte de luz e transferir essa energia para outra molécula (PLOTINO et al., 2019).

A atividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana baseia-se na combinação de um fotossensibilizador não tóxico e um comprimento de onda adequado de luz visível que, na presença de oxigênio ambiente, é ativado e pode promover uma resposta fototóxica. As espécies reativas de oxigênio que são produzidas podem causar danos às biomoléculas e causar oxidação de estruturas celulares levando à morte de microrganismos. Cada um desses fatores (fotossensibilizador, luz, oxigênio) é inofensivo por si só, mas quando combinados podem produzir espécies reativas de oxigênio citotóxicas letais que podem destruir células seletivamente (CARRERA et al., 2016).

Conforme relatado, a aPDT ocorre por interação do FS com a irradiação de uma fonte de luz complementar. Essa interação aumenta a energia molecular do FS para um estado tripleto excitado, produzindo radicais livres (reação tipo I) ou espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete (reação tipo II). Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente, causando morte e/ou danos às células e/ou afetando a membrana celular, mitocôndrias, lisossomos ou DNA celular (MENDEZ et al., 2019).

A aPDT é uma abordagem promissora no tratamento endodôntico e tem se mostrado eficaz em estudos *in vitro* e *in vivo*. Esta terapêutica é eficaz contra muitos microrganismos que podem estar presentes no canal radicular calcificado e túbulos dentinários que, conseqüentemente, podem levar à inflamação periapical. Assim, a aPDT resulta em danos e morte de células bacterianas e fúngicas e demonstrou ser minimamente invasiva, não resistente, reprodutível e com bom custo-benefício para uso em pacientes comprometidos endodonticamente (TAVARES et al., 2020).

Diversas substâncias fotossensíveis ativadas por uma fonte de luz têm sido eficazes na redução de microrganismos, como o ácido 5-aminolevulínico, azul de metileno e azul de toluidina. No entanto, a curcumina CUR é um composto fenólico de origem natural (oriunda da *Curcuma longa* L.), que é comumente encontrada no açafrão e utilizada como especiaria pela indústria alimentícia, possui propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas. Além disso, os custos da curcumina em relação a outros fotossensibilizadores são baixos, e os seus efeitos antimicrobianos positivos têm sido estudados, utilizando o mesmo associado a diferentes substâncias ou ao LED azul (ARAÚJO et al., 2018).

Estudos prévios já demonstraram a ação da curcumina sobre bactérias de interesse endodôntico, conforme relataram Mandroli e Bhat (2013) quando investigaram o potencial antibacteriano deste rizoma (usado de forma isolada) contra diversos microrganismos. Outros estudos a utilizaram de forma complementar à aPDT com sucesso (ARAÚJO et al., 2018; POURHAJIBAGHER et al., 2020).

2.4 A nanotecnologia utilizada para melhorar as condições técnicas dos agentes fotossensibilizadores utilizados em aPDT

A nanotecnologia é a arte e a ciência da engenharia de materiais, sendo aplicada de forma a aperfeiçoar as áreas médica e odontológica ao melhorar propriedades mecânicas e físicas dos materiais, ajudando a introduzir novas modalidades de diagnóstico e sistemas de nano-entrega. Suas aplicações atualmente envolvem praticamente todas as áreas odontológicas, incluindo o diagnóstico, Dentística, Prótese Dentária, Prevenção, Implantodontia, Periodontia e a Endodontia (ALKAHTANI et al., 2018).

Especificamente na Endodontia, pode-se notar que a nanotecnologia está presente em diversas etapas do tratamento e de formas variadas, como na utilização de soluções irrigadoras com nanopartículas antibacterianas, cimentos endodônticos melhorados por nanotecnologia, avaliação nanométrica de instrumentais visando melhoras das suas propriedades tecnológicas e também a aPDT sobre nanopartículas (AKBARIANRAD et al., 2018).

No que concerne à aPDT, foi relatado que uma maneira simples de resolver os fatores limitantes do FS é melhorar sua biodisponibilidade, protegê-la da degradação e do metabolismo e aumentar sua capacidade de direcionamento para os seus devidos locais de atuação. Para isto, a nanotecnologia pode ser utilizada, e a mesma dispõe de vários meios para a entrega de um ativo conforme o objetivo almejado (YALLAPU et al., 2012).

Embora a curcumina seja um agente antimicrobiano eficiente e livre de toxicidade (quando utilizada até 10g), seu uso é limitado devido à sua coloração e outras características como falta de solubilidade na água, baixa absorção e biodisponibilidade (MISHRA et al., 2005; CAO et al., 2014). Além disso, um esforço tem sido feito para o desenvolvimento de drogas

mais eficientes e toleradas pelo organismo humano. Desta forma, modificações químicas têm promovido o desenho de novos compostos a partir de fitoterápicos com potente atividade antibacteriana e mínimos efeitos tóxicos (GUO, 2017).

A fim de melhorar a biodisponibilidade e a ligação a células microbianas, estudos sugeriram o desenvolvimento de nano-fotossensibilizadores para aPDT. Desta forma, foi demonstrado recentemente que a nanotecnologia não apenas fornece uma solução eficiente para melhorar a solubilidade em água da curcumina, como também pode acelerar a penetração e localização da mesma nas superfícies das células microbianas e aumentar sua biodisponibilidade. Além disso, foi relatado também que a nanocurcumina quando utilizada com estratégias de conjugação eficazes pode melhorar o sistema de entrega de medicações (POURHAJIBAGHER et al., 2020).

Neste contexto, a microemulsão (ME) surge como um veículo interessante. As microemulsões são sistemas transparentes, isotrópicos e termodinamicamente estáveis compostos por água, óleo e anfifílico. Elas têm propriedades solventes favoráveis devido ao potencial de solubilizar e liberar drogas hidrofílicas e lipofílicas e, devido a essas propriedades, têm aplicações potenciais em formulações para uso oral (ROCHA et al., 2020).

A nanotecnologia, sobretudo as microemulsões, tem progredido no campo da pesquisa e desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e cosméticos, melhorando seu desempenho através do aperfeiçoamento da permeabilidade dos fármacos adentro das barreiras biológicas, ou promovendo sua disseminação em mucosas, o que facilita o contato com as áreas a serem submetidas à aPDT (KAUL et al, 2018).

3. OBJETIVOS

(a) Objetivo Geral

O objetivo do estudo foi analisar a efetividade da aPDT utilizando-se curcumina nanotecnológica, ativada por LED azul (450nm), sobre a eliminação de microrganismos organizados em biofilme multiespécies de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* metilino resistente – MRSA (ATCC 43300) e *Candida albicans* (ATCC 90029), no interior de condutos radiculares de dentes humanos naturais *in vitro*.

(b) Objetivos Específicos

- Selecionar a melhor concentração de curcumina, tempo de pré-irradiação e de irradiação para realizar a aPDT para os procedimentos experimentais propostos;
- Testar a metodologia para padronização dos biofilmes dentro do SCR através de ensaio pensado em forma de “transposição de biofilme”;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo dos espécimes para execução dos testes

O projeto deste estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob o protocolo nº 060/2005 - **PH/CEP (Anexo A e B)**. Para a realização do estudo foram utilizados 40 dentes humanos unirradiculares oriundos do banco de dentes do grupo de pesquisa Biofotônica Aplicada à Saúde e Biotecnologia do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (BAS-BIOTEC - IMS/UFBA).

Todos os dentes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 min e posteriormente foram radiografados em sentido **vestíbulo-lingual** e **mésio-distal**, **incluídos canais retos com 5°** de curvatura ou menos, **dimensões aproximadas**, analisados através da técnica de Schneider (1971).

Após remoção dos debris orgânicos remanescentes com Cureta Gracey 3-4 (Golgran, São Caetano do Sul - SP), foram excluídos dentes com complexidade anatômica do canal radicular, grau de curvatura moderado e severo, presença de cavidades decorrentes de lesões cariosas ou fraturas na porção radicular. Para a preparação dos espécimes, os dentes selecionados foram seccionados transversalmente na região do limite amelocementário com auxílio de instrumentos rotatórios broca diamantada cilíndrica nº 3216 (KG Sorensen, Cotia - SP) e discos de carborundum (Dentorium-Labordental, São Paulo-SP), obtendo espécimes radiculares padronizados em 16mm conforme demonstrado na figura 1.

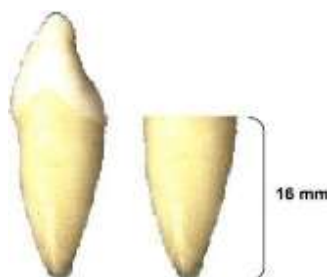


Figura 1 – Ilustração do espécime preparado, a partir da secção da coroa dentária

Depois de seccionados, os espécimes foram submetidos ao procedimento de instrumentação dos canais radiculares utilizando-se o instrumento Reciproc Blue 40.06 (VDW, Munique, Alemanha), acoplado a um motor endodôntico X-Smart Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), ajustado na função Reciproc, em movimento recíprocante, seguindo as orientações do fabricante, com irrigação de 3mL de solução fisiológica. Foi utilizado também o instrumento manual, C-Pilot #10 (VDW, Munique, Alemanha) para patência foraminal, por meio de inspeção visual pela saída forame. Após a patência, foi diminuído 1mm para obtenção do comprimento real de trabalho. Em todos os espécimes foi realizado vedamento apical com resina fotopolimerizável Z-100 (3M, Dental Products, St Paul, USA) e impermeabilização externa com duas camadas de adesivo epóxi ARALDITE (Brascola, São Paulo, Brasil). Na figura 2, pode-se observar o resultado final da preparação dos espécimes.

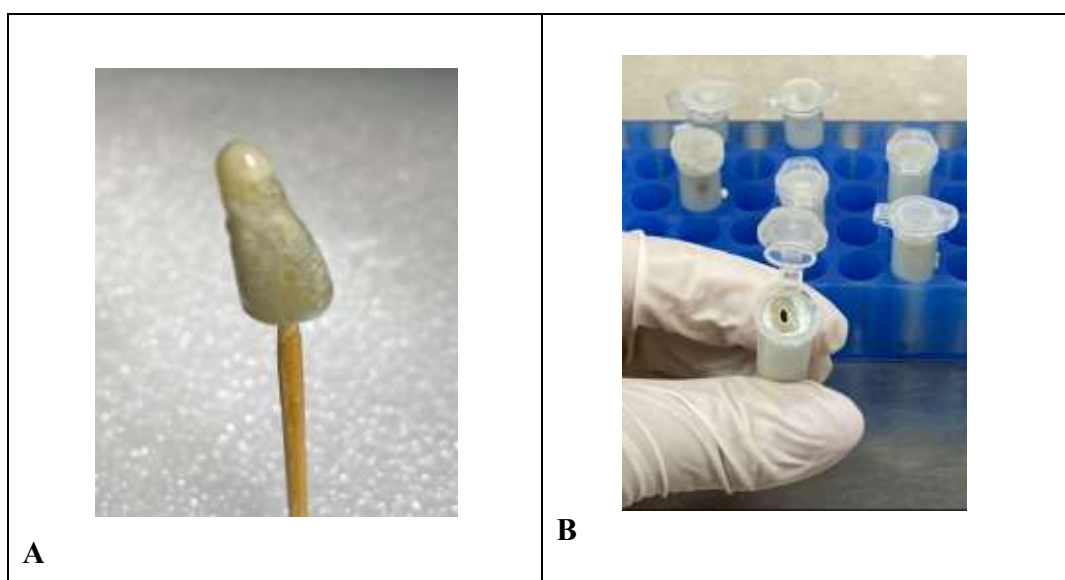


Figura 2 – A: Foto do espécime preparado e isolado; B: Foto dos espécimes fixados em eppendorfs.

Após o período de endurecimento final do adesivo, os espécimes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15min. Em seguida os espécimes foram fixados em eppendorf estéril, em fluxo laminar com silicona de condensação densa (Vigodente coltene, Rio de Janeiro), conforme pode ser observado na figura 2.

4.2 Desenvolvimento da técnica de “transposição de biofilme experimental” multiespécies

Para a realização do experimento foi necessário desenvolver uma metodologia que foi denominada pela equipe de “transposição de biofilme experimental”, uma técnica que possibilitou que vários grupos experimentais pudessem ser contaminados com o mesmo biofilme maduro permitindo uma maior fidedignidade dos resultados em relação à técnica convencionalmente utilizada pelo grupo em que os biofilmes formavam-se de maneira individual dentro dos espécimes. Para formação do biofilme multiespécie, foram utilizadas cepas ATCC de *Candida albicans* (ATCC 90029), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Staphylococcus aureus* metilino resistente - MRSA (ATCC 43300). Primeiramente, foram obtidas suspensões de 1×10^6 cél./mL dos microrganismos citados que foram padronizadas por espectrofotometria (Shinadzu modelo UV-1203, Kyoto - Japan), cujos valores de densidade óptica (D.O.) e comprimento de onda (λ) para a quantidade de 1×10^6 cél./mL foram previamente estabelecidos e estão demonstrados no quadro 1.

Quadro 1– Comprimento de onda e densidade óptica utilizados para obtenção das suspensões contendo 1×10^6 cél./mL dos microrganismos.

Microrganismo	Comprimento de onda	Densidade óptica
<i>Candida albicans</i>	530 nm	0,284
<i>Escherichia coli</i>	590 nm	0,324
MRSA	490 nm	0,374
<i>Enterococcus faecalis</i>	760 nm	0,298

Para que os microrganismos conseguissem se desenvolver juntos no mesmo biofilme, primeiramente foi adicionada uma alíquota de 10 μ L da suspensão padronizada de *E. Coli* à quantidade de 2mL do meio de cultura caldo BHI (Difco, Detroit – USA) em 1 tubo de polipropileno tipo eppendorf e, em seguida, o tubo foi incubado em estufa B.O.D. (Biothec – Piracicaba, SP) por 24h a 36°C. Após o período de incubação inicial, foi acrescido ao eppendorf 5 μ L de suspensão padronizada de *E. faecalis* e de *C. albicans*, com reforço nutricional de 0,5mL de caldo BHI (Difco, Detroit – USA) e de caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit – USA) e o conjunto foi incubado novamente nas mesmas condições por 24h. Passado este período foi

acrescido ao biofilme 5µL de suspensão padronizada de *Staphylococcus aureus metilino resistente* – MRSA juntamente com 0,5mL de caldo BHI, sendo este conjunto incubado novamente nas mesmas condições por mais 24h, totalizando ao final do procedimento 3 dias de formação do biofilme multiespécie.

Passado o período final de incubação, 50µL do biofilme foi semeado em cada um dos meios de cultura seletivos: ágar sabouraud dextrose com cloranfenicol (*Candida albicans*; Difco, Detroit – USA), ágar mitis salivarius bacitracina sacarose (*Enterococcus faecalis*; Difco, Detroit – USA), ágar manitol (MRSA - Difco, Detroit – USA) e ágar Mac conkey (*Escherichia coli* - Difco, Detroit – USA) e as placas foram incubadas em estufa B.O.D. (Biotec, Piracicaba - SP) por 24h a 36°C, e após incubação, houve crescimento positivo nos meios de cultura, onde foram observadas as características de colônia e foram realizadas coloração de Gram e microscopia para constatação da presença do microrganismo de interesse na composição do biofilme multiespécie.

Assim os canais radiculares dos espécimes devidamente preparados e fixados em eppendorfs estéreis, foram inoculados com a suspensão do biofilme padronizada por escala de Mac farland com turbidez equivalente a 1×10^6 cél./mL, até o preenchimento completo do canal.. Após contaminação do canal radicular, foi posicionada uma bolinha de algodão estéril, e o eppendorf contendo os espécimes contaminados foram fechados e o conjunto foi incubado a 36°C durante 24h, vide figura 3. Após esse período para manutenção do seu crescimento foi adicionado ao canal radicular 10µL de meio de cultura (caldo BHI) dando as condições nutricionais ao biofilme incubado por mais 24h a 36°C.

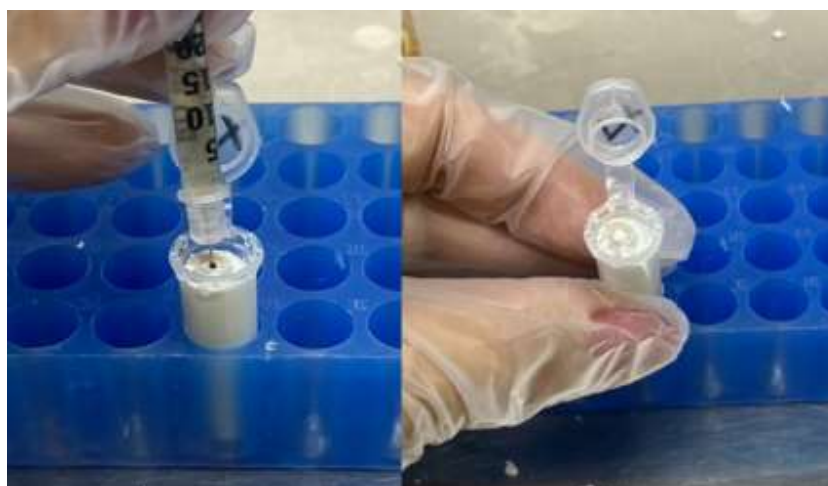


Figura 3 – A: Transposição do biofilme; B: Espécimes contaminados com biofilme e selados com bolinha de algodão estéril

4.3 Testes para obtenção da concentração de curcumina, tempo de pré-irradiação e tempo de irradiação ideais para realização dos procedimentos experimentais

4.3.1 Preparo da curcumina nanotecnológica

Para esta etapa do experimento, foi utilizada a técnica de formulação da curcumina nanotecnológica (microemulsão) desenvolvida de acordo com o trabalho de Rocha e colaboradores (2020) no laboratório de farmacotécnica do IMS/UFBA pelo grupo de pesquisa BAS-BIOTEC/ IMS-UFBA e parceiros (PATENTE PUBLICADA INPI BR 102020009664-8 A2).

4.3.2 Screener da concentração do fotossensibilizante

O objetivo deste teste foi reconhecer qual a melhor concentração do fotossensibilizante para ser utilizado no estudo. Para isso, alíquotas da suspensão padronizada de 1×10^6 cél./ml (escala de Mac farland) do biofilme multiespécie de 3 dias (descrição no item 2) foi adicionada à ependorfs, envolvidos em fita isolante preta, quadro 29 100µL do fotossensibilizador curcumina nanotecnológica nas concentrações de 20µg, 40µg, 60µg, 80µg, e 100µg. Os ependorfs foram agitados por 1min e, em seguida, foram deixadas em ambiente escuro por 9min (tempo de pré-irradiação). Após esse período, foi realizada a Apdt utilizando-se o LED azul 450nm (Vallo, Ultradent, Indaiatuba-SP) pelos tempos de 5 e 10min e, na sequência, alíquotas de 100 µL da suspensão testada foi semeada nos meios de cultura seletivos (vide quadro 2).

Quadro 2 – Delineamento do screening de concentração e tempo ideal da aPDT.

Tempo de pré-irradiação	Concentração do FS				
	20µg	40µg	60µg	80µg	100µg
5 minutos	5	5	5	5	5
10 minutos	5	5	5	5	5
Total	10	10	10	10	10
Total de testes	50				

As placas foram incubadas em estufa B.O.D. por 24h a 36°C e as colônias foram contadas obtendo-se o número de unidades formadoras de colônias por ml (UFC/mL). Após comparação dos resultados (UFC/mL) observou-se que a melhor concentração e tempo de irradiação da aPDT foram respectivamente, 80µg e 5min (figura 4).

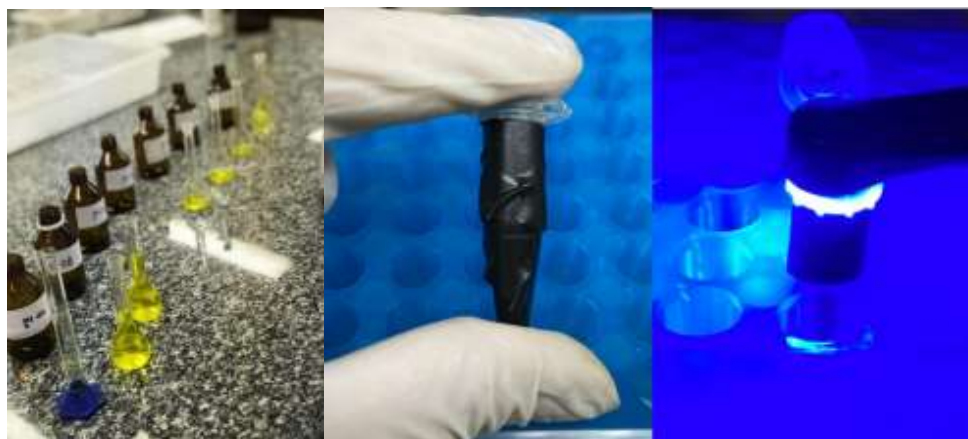


Figura 4 – A: Confeção das diversas concentrações de curcumina; B: modelo do espécime para tratamento da aPDT nas diversas concentrações das curcuminas testadas; C: aPDT

4.4 Procedimentos experimentais

4.4.1 Grupos experimentais e coleta do conteúdo intracanal

Após período de incubação de 24 horas após a transposição do biofilme multiespécie, no interior do fluxo laminar, os 40 espécimes foram randomizados de forma aleatória ($n = 10$) entre os grupos experimentais: (a) grupo controle: sem tratamento; (b) grupo fotossensibilizador (PS): curcumina nanotecnológica utilizada isoladamente; (c) grupo Luz: LED azul utilizado isoladamente; e (d) grupo aPDT: curcumina nanotecnológica ativada pelo LED azul.

Para o grupo controle foi utilizado 1mL de solução fisiológica estéril em seringa de insulina que foi introduzida no interior do canal, até a abertura do conduto, e foi agitada com agulha acoplada à seringa de 1mL por 30 segundos. Alíquota de 1mL do conteúdo foi aspirado com a agulha acoplada à seringa de 1mL e foi inserido em eppendorf esterilizado. Imediatamente após a coleta, 100 μ L do conteúdo foi semeado nos meios seletivos (ágar manitol, ágar Mac Conkey, ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e ágar Mitis salivarius bacitracina sacarose) e as placas foram incubadas a 36°C por 24h. No grupo LED, os canais radiculares foram irradiados com luz LED por 5 minutos, em seguida, foi realizado o mesmo procedimento descrito para o grupo controle. No grupo curcumina, toda a extensão do conduto foi preenchido com preparação de 80 μ g de curcumina e passado o tempo de 9min em ambiente escuro, houve a remoção da mesma com cones de papel absorvente esterilizados e os mesmos procedimentos descritos para o grupo controle foram realizados. No grupo aPDT, os canais foram primeiramente preenchidos com curcumina em toda sua extensão, esperou-se o tempo de pré-irradiação de 9min e na entrada dos canais foi realizada a irradiação com LED pelo tempo de 5min (potência: 1000 mW, fluência: 300J/cm², comprimento de onda: 450nm). Imediatamente após, a curcumina foi removida com cones de papel absorvente esterilizados e os mesmos procedimentos descritos no grupo controle foram realizados.

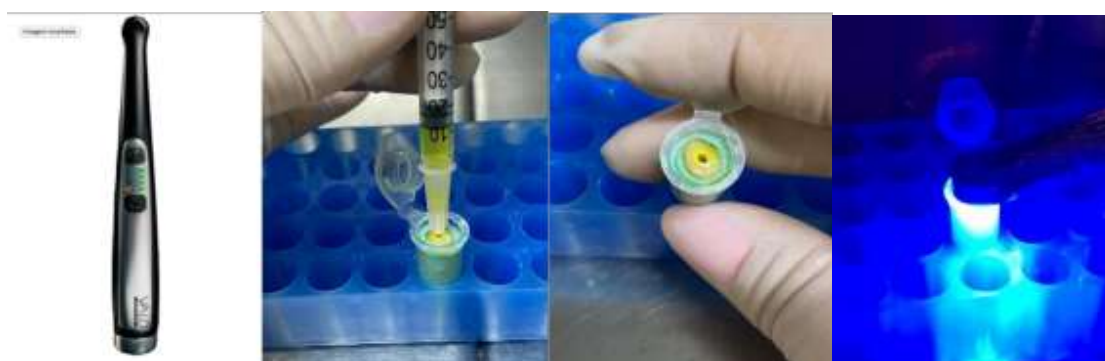


Figura 5 – A: aparelho de emissão de irradiação LED, VALLO; B: foto mostrando o preenchimento do conduto com corante curcumina; C: conduto preenchido com o fotossensibilizante; D: foto mostrando a irradiação na entrada do canal radicular do espécime do grupo LED e aPDT.

4.4.2 Processamento das amostras

Para o processamento das amostras, em fluxo laminar, os eppendorfs foram agitados por 1 min em aparelho tipo vórtex e o conteúdo proveniente da agitação foi diluído em diluições seriadas na base de 10 (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) sendo que, a suspensão inicial e as diluições foram semeadas em duplicata nos meios de cultura seletivos: ágar Mitis Salivarius para crescimento de *Enterococcus faecalis*, ágar Mac Conkey para *Escherichia coli*, ágar Manitol para *MRSA* e ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol para *Candida albicans*. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. por 24h a 36°C e as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC/mL.

4.5 Análise Estatística dos resultados

A partir do software GraphPad Prism versão 9.0, 2020 os dados foram primeiramente analisados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e mantiveram-se dentro dos preceitos da normalidade. Para observação da efetividade da redução do número de Log10 de unidades formadoras de colônias por mL (Log10 UFC/mL) dos microrganismos oriundos do biofilme multiespécies (*Staphylococcus aureus* metilino resistente – *MRSA*; *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*) obtidas a partir dos tratamentos propostos (controle: control, fotossensibilizador: PS, Luz: light e terapia fotodinâmica: aPDT) as médias em Log10 foram comparadas utilizando-se o teste estatístico ANOVA com nível de significância de 95% com Post hoc de Tukey.

REFERÊNCIAS

ABDELKARIM-ELAFIFI, Haitham; PARADA-AVENDAÑO, Isabel; ARNABAT-DOMINGUEZ, Josep. Photodynamic Therapy in Endodontics: A Helpful Tool to Combat Antibiotic Resistance? A Literature Review. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1106, 2021.

AKBARIANRAD, Nazila et al. Applications of nanotechnology in endodontic: A Review. **Nanomedicine Journal**, v. 5, n. 3, p. 121-126, 2018.

ALGHAMDI, Faisal; SHAKIR, Marwa. The influence of Enterococcus faecalis as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. **Cureus**, v. 12, n. 3, p. e7257-e7266, 2020.

ALKAHTANI, Rawan N. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. **The Saudi dental journal**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2018.

ARAÚJO, Thalita Santos Dantas et al. Reduced methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 21, p. 219-223, mar. 2018.

ATHANASSIADIS, B.; ABBOTT, P. V.; WALSH, Laurence J. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. **Australian dental journal**, v. 52, supl. 1, p. S64-S82, 2007.

AZIZI, Arash et al. Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene Blue on streptococcus mutans bacterial colonies. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 27, p. 203-209, set. 2019.

BUMB, Swapnil Sunil et al. Assessment of photodynamic therapy (aPDT) in disinfection of deeper dentinal tubules in a root canal system: an in vitro study. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 11, p. ZC67-ZC71, nov. 2014.

CAO, Yu; XU, Ronald X.; LIU, Zhongfa. A high-throughput quantification method of curcuminoids and curcumin metabolites in human plasma via high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 949, p. 70-78, 2014.

CARRERA, E. T. et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aaPDT) in dentistry: a critical review. **Laser physics**, v. 26, n. 12, p. 1-14, dez. 2016.

DIOGUARDI, Mario et al. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. **Dentistry Journal**, v. 7, n. 2, p. 47-61, 2019.

ESTRELA, Carlos et al. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. **Journal of Applied oral science**, v. 16, n.6, p. 364-368, 2008.

ESTRELA, Carlos et al. Mechanism of the action of calcium and hydroxy ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz Dent J**, v. 6, n. 2, p. 95-90, 1995.

EVANS, M. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, v. 35, n. 3, p. 221-228, mar. 20

GUO, Zongru. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119-136, 2017.

HOEDKE, Daniela et al. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. **International endodontic journal**, v. 51, suppl. 1, p. e23-e34, jan. 2018.

HSIEH, Yi-Hsuan et al. An in vitro study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 337-347, jan. 2018.

IBRAHIM, A. I. O. et al. Use of antibacterial nanoparticles in Endodontics. *S. Afr. tooth. j.*, Johannesburg, v. 72, no. 3, pg. 105-112, Apr. 2017.

IQBAL, Azhar. The factors responsible for endodontic treatment failure in the permanent dentitions of the patients reported to the college of dentistry, the University of Aljouf, Kingdom of Saudi Arabia. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 10, n. 5, p. ZC146-ZC148, 2016.

JHAJHARIA, Kapil et al. Biofilm in endodontics: a review. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.

KAKANI, Abhijeet Kamalkishor et al. A review on perforation repair materials. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 9, p. ZE09-ZE13, 2015.

MANDROLI, Praveenkumar S.; BHAT, Kishor. An in-vitro evaluation of antibacterial activity of curcumin against common endodontic bacteria. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 10, p. 106-108, 2013.

KAUL, Shreya et al. Role of nanotechnology in cosmeceuticals: a review of recent advances. **Journal of pharmaceutics**, v. 2018, p. 1-19, 2018.

KIM, Yemi et al. Analysis of cause of endodontic failure of C-shaped root canals. **Scanning**, v. 2018, p. 1-7, 2018.

LIU, Jiangjun et al. Dual antibacterial behavior of a curcumin–upconversion photodynamic nanosystem for efficient eradication of drug-resistant bacteria in a deep joint infection. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 47, p. 7854-7861, dez. 2018.

LUKIC, Dejana et al. Endodontic-like oral biofilms as models for multispecies interactions in endodontic diseases. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 674-696, 2020.

MENDEZ, Daniela Alejandra Cusicanqui et al. Could a chelant improve the effect of curcumin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy against dental intact biofilms?. **Lasers in medical science**, v. 34, n. 6, p. 1185-1192, ago. 2019.

MISHRA, Satyendra et al. Differential apoptotic and redox regulatory activities of curcumin and its derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 10, p. 1353-1360, 2005.

MURAD, Cristiana Francescutti et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine and MTAD® against *Enterococcus faecalis* biofilm on human dentin matrix in vitro. **RSBO**, v. 9, n. 2, p. 143-50, 2012.

NÓBREGA, Leticia Maria Menezes et al. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. **Brazilian oral research**, v. 30, n.1, p. e103-e111, 2016.

ODA, D. F. et al. Antimicrobial action of photodynamic therapy in root canals using LED curing light, curcumin and carbopol gel. **International endodontic journal**, v. 52, n. 7, p. 1010-1019, jul. 2019.

PABLO, Óliver Valencia et al. Root anatomy and canal configuration of the permanent mandibular first molar: a systematic review. **Journal of endodontics**, v. 36, n. 12, p. 1919-1931, 2010.

PARVEKAR, Prashik et al. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Biomaterial investigations in dentistry**, v. 7, n. 1, p. 105-109, 2020.

PAZ, Luis E. Chavez de; HAMILTON, Ian R.; SVENSÄTER, Gunnel. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. **Microbiology**, v. 154, n. 7, p. 1927-1938, 2008.

PLOTINO, Gianluca; GRANDE, N. M.; MERCADE, Montserrat. Photodynamic therapy in endodontics. **International endodontic journal**, v. 52, n. 6, p. 760-774, 2019.

POURHAJIBAGHER, Maryam et al. Antibacterial and antibiofilm efficacy of antimicrobial photodynamic therapy against intracanal *Enterococcus faecalis*: an in vitro comparative study with traditional endodontic irrigation solutions. **Journal of Dentistry (Tehran, Iran)**, v. 15, n. 4, p. 197-204, 2018.

POURHAJIBAGHER, Maryam et al. Dual wavelength irradiation antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and metformin doped with nano-curcumin as an efficient adjunctive endodontic treatment modality. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101628-101635, 2020.

ROCHA, Marisol P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, p. 1-28, dez. 2020.

SANTEZI, Carolina; REINA, Bárbara Donadon; DOVIGO, Livia Nordi. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections - A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 409-415, mar. 2018.

SCHNEIDER, Sam W. A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. **Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology**, v. 32, n. 2, p. 271-275, 1971.

SCHUENCK-RODRIGUES, Raphaela Aparecida et al. Development, characterization and photobiological activity of nanoemulsion containing zinc phthalocyanine for oral infections treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 211, p. 1-11, 2020.

SIQUEIRA JÚNIOR, José F. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 94, n. 3, p. 281-293, 2002.

SIQUEIRA JUNIOR, José Freitas et al. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. **Brazilian oral research**, v. 32, p. e65-82, 2018.

TAVARES, Warley Luciano Fonseca et al. Antimicrobial photodynamic therapy and guided endodontics: a case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 1-3, 2020.

THURNHEER, Thomas; BELIBASAKIS, Georgios N. Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 258-264, 2015.

YALLAPU, Murali M.; JAGGI, Meena; CHAUHAN, Subhash C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug discovery today**, v. 17, n. 1-2, p. 71-80, 2012.

YOO, Yeon-Jee et al. Candida albicans virulence factors and pathogenicity for endodontic infections. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1300-1319, 2020.

ZAWADZKI, Paweł J. et al. Examination of oral microbiota diversity in adults and older adults as an approach to prevent spread of risk factors for human infections. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-7, 2017.

CAPÍTULO I

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT) COM CURCUMINA NANOTECNOLÓGICA E LED AZUL 450nm SOBRE BIOFILMES MULTIESPÉCIES EM CONDUTOS RADICULARES

Thayse Pithon Quadros Ravazzi¹, Iasmym Mendes de Jesus^a, Gabriel Pinto de Oliveira Santos^a, Luciano Pereira Rosa^a, Francine Cristina Silva Rosa^a

^a Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil.

RESUMO

Objetivo: analisar a eficácia da utilização da aPDT mediada por curcumina nanotecnológica, ativada por LED azul (450nm), sobre a eliminação de microrganismos organizados em biofilme multiespécies, no interior de condutos radiculares de dentes humanos ex vivos. **Desenho:** Foram utilizados 40 dentes humanos unirradiculares, que foram randomizados nos grupos experimentais (n=10): grupo controle – sem tratamento; grupo fotossensibilizador (PS) – curcumina nanotecnológica utilizada isoladamente; grupo Luz – LED azul utilizado isoladamente; e grupo aPDT – curcumina nanotecnológica ativada pelo LED azul. Para a realização dos testes, o interior dos condutos radiculares foram contaminados pelas espécies de *Candida albicans* (ATCC 90029), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Staphylococcus aureus metilicilino resistente* - MRSA (ATCC 43300), compondo um biofilme multiespécie. Após o período de incubação, os canais foram tratados conforme os grupos experimentais, sendo que no grupo controle não houve tratamento. **Resultados:** no que concerne à efetividade dos grupos aPDT frente aos microrganismos estudados, pôde-se observar que a maior redução dentre as aPDTs foi alcançada frente a MRSA (média de Log10 de redução = 2,48), seguido pela *Escherichia coli* (média de Log10 de redução = 1,72), *Enterococcus faecalis* (média de Log10 de redução = 1,65), uma redução maior que 1,5 Log10 UFC/mL mostrando efetividade relevante da aPDT para esses microrganismos, embora a aPDT também tenha mostrado considerável efetividade frente a *Candida albicans* (média de Log10 de redução = 0,71) com diferença estatística na redução entre os grupos. **Conclusão:** a aPDT estudada apresentou efetividade na redução de todos os microrganismos investigados, sendo que a média de redução foi maior que 1,5 Log10 para todos os microrganismos, exceto *Candida albicans*.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Endodontia; LED; Curcumina; Nanotecnologia; Biofilmes.

¹ * **Endereço correspondente:**

Thayse Pithon Quadros Ravazzi, Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar de Saúde. Rua Rio de Contas, 58. Candeias, 450029-094, Vitória da Conquista, BA, Brasil. E-mail: thayse.pithon@gmail.com e thayse.ravazzi@ufba.br

INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica ocorre, de uma perspectiva biomecânica, realizando-se a limpeza, modelagem e antissepsia dos canais radiculares, permitindo a obturação tridimensional do sistema de canais radiculares. No entanto, a complexidade anatômica apresenta desafios e dificuldades clínicas que muitas vezes comprometem o objetivo principal dessa terapia [1]. Atualmente, mais de 1.000 espécies bacterianas pertencentes a 13 filotipos já foram identificadas na cavidade oral. Essas espécies são capazes de atingir o sistema de canais radiculares e são potenciais patógenos endodônticos [2].

Dentre as espécies, destaca-se *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) pela persistência pós tratamento e sua relação com casos refratários [3], *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) por sua resistência aos antimicrobianos utilizados nas terapias convencionais [4], *Escherichia coli* (*E. coli*) por ser uma bactéria Gram-negativa comumente encontrada nos processos infecciosos que envolvem os canais radiculares e a dificuldade do tratamento em neutralizar a atividade agressiva dos lipopolissacarídeos (LPS) das espécies Gram-negativas [5] e, por fim, as espécies de *Candida* que são fungos leveduriformes que relacionados às infecções endodônticas aumentam a dificuldade do tratamento [6].

A chave para o sucesso do tratamento endodôntico seria o debridamento completo do sistema de canais radiculares, removendo tecidos pulparem necróticos ou infectados, microrganismos e realizando o selamento completo do espaço do canal radicular. Dentre os causadores deste insucesso, está a complexidade anatômica dos canais radiculares. Assim, a falha em localizar e tratar todos os canais do sistema de canais radiculares é considerada uma das principais causas dos insucessos no tratamento endodôntico [7].

Várias soluções irrigantes e medicamentos estão à disposição para eliminar os patógenos endodônticos, entretanto ainda não é possível uma eliminação completa destes microrganismos no SCR, além de estimularem cepas resistentes que torna o tratamento ainda mais difícil [8]. Os antibióticos utilizados na terapia endodôntica podem atuar de três formas distintas: local, sistêmica ou profilática. No entanto, o tratamento endodôntico convencional comumente não necessita de terapia antibiótica sistêmica concomitante, o que está possivelmente relacionado à ausência de circulação sanguínea no local alvo. Já a utilização tópica pode alcançar a redução significativa do número de bactérias [9].

A aPDT é uma abordagem promissora no tratamento endodôntico e tem se mostrado eficaz em estudos *in vitro* e *in vivo*. Esta terapêutica é eficaz contra muitos microrganismos que

podem estar presentes no canal radicular infectado, calcificado e túbulos dentinários que, conseqüentemente, podem levar à inflamação periapical. Assim, a aPDT resulta em danos e morte de células bacterianas e fúngicas e demonstrou ser minimamente invasiva, não resistente, reprodutível e com bom custo-benefício para uso em pacientes comprometidos endodonticamente [10].

Atualmente, pesquisas estão sendo direcionadas para a produção de materiais sensíveis à luz com propriedade de inibição seletiva para reduzir infecções oportunistas, o que engloba o uso da cúrcuma, conhecida também pelo nome científico de *Cúrcuma Longa*. Esta é uma erva de fortes propriedades antioxidantes. Além disso, o ingrediente ativo da cúrcuma, ou seja, a curcumina (CUR) possui atributos anti-inflamatórios e analgésicos, semelhantes aos analgésicos convencionais, além de atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas [11].

A fim de melhorar a biodisponibilidade e a ligação a células microbianas, estudos sugeriram o desenvolvimento de nano-fotossensibilizadores para aPDT. Desta forma, foi demonstrado recentemente que a nanotecnologia não apenas fornece uma solução eficiente para melhorar a solubilidade em água da curcumina, como também pode acelerar a penetração e localização da mesma nas superfícies das células microbianas e aumentar sua biodisponibilidade. Além disso, foi relatado também que a nanocurcumina quando utilizada com estratégias de conjugação eficazes pode melhorar o sistema de entrega de medicações [12].

Tendo em vista o contexto apresentado, o objetivo do estudo foi analisar a eficácia da utilização da aPDT mediada por curcumina nanotecnológica, ativada por LED azul (450nm), sobre a eliminação de microrganismos organizados em biofilme multiespécies de cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* metilino resistente - MRSA e *Candida albicans*, no interior de condutos radiculares de dentes humanos naturais in vitro.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto deste estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob o protocolo nº 060/2005 - PH/CEP.

Preparo dos espécimes para execução dos testes

Foram utilizados 40 dentes humanos unirradiculares oriundos do banco de dentes do grupo de pesquisa Biofotônica Aplicada à Saúde e Biotecnologia do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (BAS-BIOTEC - IMS/UFBA).

Todos os dentes foram autoclavados a 121°C durante 15 min , radiografados em sentido vestibulo-lingual e méso-distal, incluídos canais retos com 5° de curvatura ou menos e dimensões aproximadas, analisados através da técnica de Schneider (1971) [13].

Após remoção dos debris orgânicos remanescentes com Cureta Gracey 3-4, foram excluídos dentes com complexidade anatômica do canal radicular, grau de curvatura moderado e severo, presença de cavidades decorrentes de lesões cariosas ou fraturas na porção radicular. Para a preparação dos espécimes, os dentes selecionados foram seccionados transversalmente na região do limite amelocementário com auxílio de instrumentos rotatórios broca diamantada cilíndrica nº 3216 e discos de carborundum, obtendo espécimes radiculares padronizados em 16mm.

Depois de seccionados, os espécimes foram submetidos ao procedimento de instrumentação dos canais radiculares em movimento recíprocante utilizando-se o instrumento Reciproc Blue 40.06, com irrigação de 3mL de solução fisiológica. Foi utilizado também o instrumento manual, C-Pilot #10 para patência foraminal, por meio de inspeção visual pela saída forame. Após a patência, foi diminuído 1mm para obtenção do comprimento real de trabalho. Em todos os espécimes foi realizado vedamento apical com resina fotopolimerizável e impermeabilização externa com duas camadas de adesivo epóxi. Os espécimes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15min. e fixados em eppendorf estéril, em fluxo laminar com silicona de condensação densa conforme a figura 1.

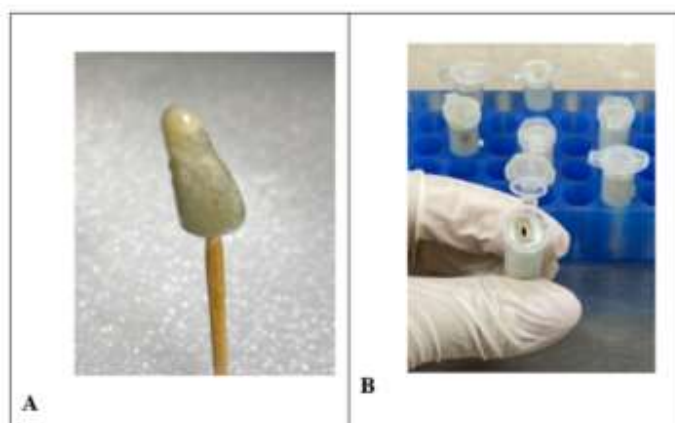


Fig. 1 – A: Foto do espécime preparado e isolado; **B:** Foto dos espécimes fixados em eppendorfs.

Desenvolvimento da técnica de “transposição de biofilme experimental” multiespécies

Desenvolveu-se uma metodologia denominada pela equipe de “transposição de biofilme experimental”. Para a formação do biofilme multiespécie, foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90029), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Staphylococcus aureus metilino resistente - MRSA* (ATCC 43300). Primeiramente, foram obtidas suspensões de 1×10^6 cél./mL dos microrganismos citados que foram padronizadas por espectrofotometria, cujos valores de densidade óptica (D.O.) e comprimento de onda (λ) foram estabelecidos e estão demonstrados no quadro 1.

Quadro 1– Comprimento de onda e densidade óptica utilizados para obtenção das suspensões contendo 1×10^6 cél./mL dos microrganismos.

Microrganismo	Comprimento de onda	Densidade óptica
<i>Candida albicans</i>	530 nm	0,284
<i>Escherichia coli</i>	590 nm	0,324
<i>MRSA</i>	490 nm	0,374
<i>Enterococcus faecalis</i>	760 nm	0,298

Para confecção do biofilme multiespécie, foi adicionada uma alíquota de 10 μ L da suspensão padronizada de *E. Coli* à quantidade de 2mL do meio de cultura caldo BHI em 1 tubo de polipropileno e, em seguida, o tubo foi incubado em estufa B.O.D. por 24h a 36°C. Após o período de incubação inicial, foi acrescido ao tubo 5 μ L de suspensão padronizada de *E. faecalis* e de *C.albicans*, com reforço nutricional de 0,5mL de caldo BHI e de caldo Sabouraud dextrose, com incubação nas mesmas condições por 24h. Passado este período foi acrescido ao biofilme 5 μ L de suspensão padronizada de MRSA juntamente com 0,5mL de caldo BHI e de caldo Sabouraud dextrose, incubado mais uma vez por 24h, finalizando o procedimento com 3 dias de formação do biofilme multiespécie.

Passado o período final de incubação, 50 μ L do biofilme foi semeado em cada um dos meios de cultura seletivos: ágar sabouraud dextrose com cloranfenicol, ágar mitis salivarius bacitracina sacarose, ágar manitol e ágar Mac conkey e as placas foram incubadas em estufa B.O.D. por 24h a 36°C, e após incubação, houve crescimento positivo nos meios de cultura, onde foram observadas as características de colônia com realização da coloração de Gram e

microscopia para constatação da presença do microrganismo de interesse na composição do biofilme multiespécie.

Assim, os canais radiculares dos espécimes devidamente preparados e fixados, foram inoculados com a suspensão do biofilme padronizada por escala de Mac Farland com turbidez equivalente a 1×10^6 cél./mL, até o preenchimento completo do canal e vedados com uma bolinha de algodão estéril. Após 24h de incubação, para manutenção do seu crescimento foi adicionado ao canal radicular 10 μ L de meio de cultura (BHI) dando as condições nutricionais ao biofilme, por fim, o conjunto foi incubado a 36°C durante 24h, vide figura 2.

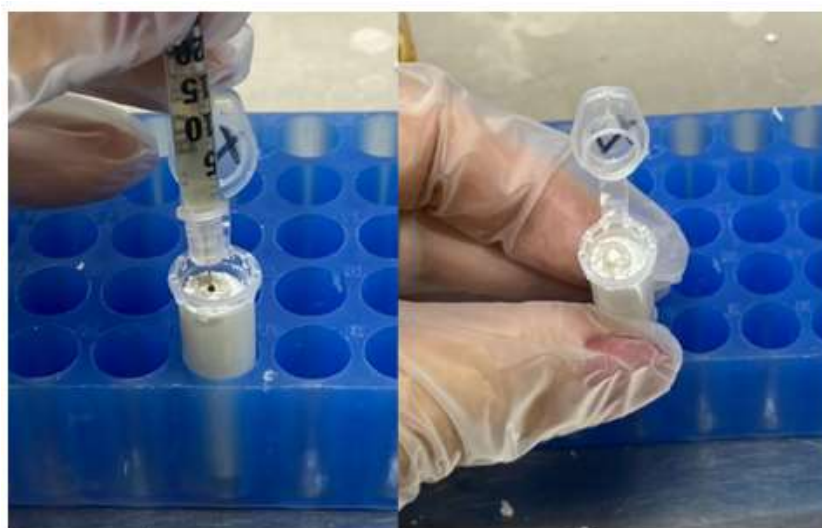


Fig. 2 – A: Transposição do biofilme; **B:** Espécimes contaminadas com biofilme e selados com bolinha de algodão estéril

Preparo da curcumina nanotecnológica

Para esta etapa do experimento, foi utilizada a técnica de formulação da curcumina nanotecnológica (microemulsão) desenvolvida de acordo com o trabalho de Rocha e colaboradores (2020) [14] no laboratório de farmacotécnica do IMS/UFBA pelo grupo de pesquisa BAS-BIOTEC/ IMS-UFBA e parceiros (PATENTE PUBLICADA INPI BR 102020009664-8 A2). Foi realizada a pesagem do composto inicial para obter diversas soluções com as concentrações de: 20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 60 μ g/ml, 80 μ g/ml e 100 μ g/ml. As soluções de curcumina foram preparadas e filtradas através de filtros de membrana com poros de 0,22 μ m e armazenadas em recipientes estéreis na cor âmbar.

Screening da concentração do fotossensibilizante

Foi realizado ainda teste screener para reconhecer qual a melhor concentração do fotossensibilizante para ser utilizado no estudo. Para isso, alíquotas do biofilme multiespécie foram submetidas à curcumina nanotecnológica nas concentrações de 20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 60 μ g/ml, 80 μ g/ml, e 100 μ g/ml e, em seguida, foram deixadas em ambiente escuro por 9min (pré-irradiação). Após esse período, foi realizada a aPDT utilizando-se o LED azul 450nm em 2 tempos de irradiação, 5 e 10 min. Após comparação dos resultados (UFC/mL) observou-se que a melhor concentração e tempo de irradiação da aPDT foram respectivamente, 80 μ g e 5min.

Grupos experimentais e coleta do conteúdo intracanal

Após o período de incubação de 24h posterior a transposição do biofilme multiespécie, os 40 espécimes foram randomizados de forma aleatória (n = 10) entre os grupos experimentais: (a) grupo controle: sem tratamento; (b) grupo fotossensibilizador (PS): curcumina nanotecnológica utilizada isoladamente; (c) grupo Luz: LED azul utilizado isoladamente; e (d) grupo aPDT: curcumina nanotecnológica ativada pelo LED azul (figura 4). As amostras foram posteriormente processadas em aparelho tipo vórtex e o conteúdo proveniente da agitação foi utilizado em diluições seriadas, sendo que a suspensão inicial e as diluições foram semeadas em duplicata nos meios de cultura seletivos. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. por 24h a 36°C e as colônias foram contadas com os resultados expressos em UFC/mL.

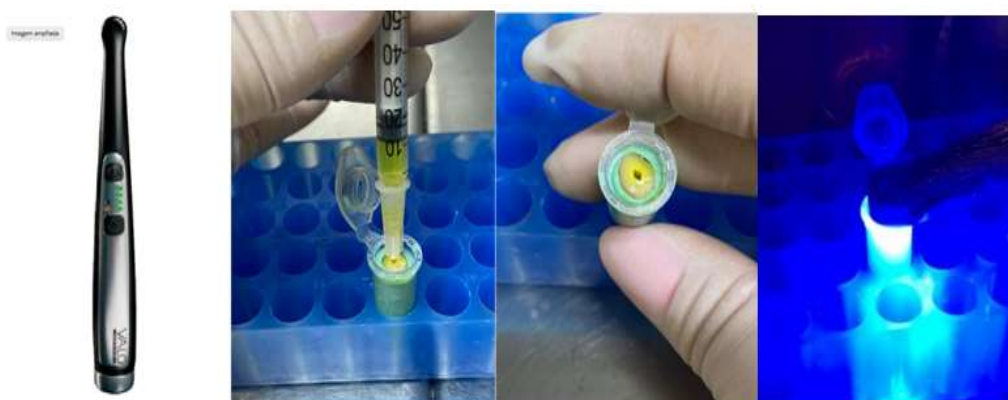


Fig. 3 – A: aparelho de emissão de irradiação LED, VALLO; B: foto mostrando o preenchimento do conduto com corante curcumina; C: conduto preenchido com o fotossensibilizante; D: foto mostrando a irradiação na entrada do canal radicular do espécime do grupo LED e aPDT.

Análise Estatística dos resultados

A partir do software GraphPad Prism versão 9.0, 2020 os dados foram primeiramente analisados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e mantiveram-se dentro dos preceitos da normalidade. As médias em Log10 foram comparadas utilizando-se o teste estatístico ANOVA com nível de significância de 95% com Post hoc de Tukey

RESULTADOS

Com relação aos resultados da efetividade dos tratamentos frente à MRSA foi possível observar que houve diferença estatística da média de Log10 UFC/mL em relação ao grupo controle em todos os grupos (luz, PS e PDT = $p \leq 0,05$), sendo que, em todos os casos, as médias de Log10 UFC/mL foi menor que a do grupo controle, indicando que os tratamentos reduziram o número de Log10 UFC/mL, como demonstrado na figura 4A. As médias de Log10 UFC/mL de MRSA não apresentaram diferença estatística comparando os grupos tratamento entre si ($p \geq 0,05$).

Com relação aos resultados da efetividade dos tratamentos frente à *Escherichia coli* foi possível observar que houve diferença estatística significativa da média de Log10 UFC/mL com relação ao grupo controle somente nos grupos aPDT ($p \leq 0,01$) e luz ($p \leq 0,05$) sendo observada, em ambos casos, a redução da média de Log10 UFC/mL mostrando efetividade relevante da aPDT. A média de Log10 UFC/mL de *Escherichia coli* no grupo aPDT e luz não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$), como demonstrado na figura 4B.

Com relação aos resultados da efetividade dos tratamentos frente à *Candida albicans* foi possível observar que houve diferença estatística da média de Log10 UFC/mL com relação ao grupo controle somente nos grupos aPDT ($p \leq 0,05$) e luz ($p \leq 0,05$) sendo observada, em ambos casos, a redução da média de Log10 UFC/mL mostrando efetividade relevante da aPDT e da luz. A média de Log10 UFC/mL de *Candida albicans* no grupo aPDT e luz não apresentaram diferença significativa (vide figura 4C).

Com relação aos resultados da efetividade dos tratamentos frente à *Enterococcus faecalis* foi possível observar que houve diferença estatística da média de Log10 UFC/mL com relação ao grupo controle apenas no grupo aPDT ($p \leq 0,01$), sendo denotada redução da média de Log10 UFC/mL de *Enterococcus faecalis* nesse grupo mostrando efetividade relevante da aPDT. A média de log10 UFC/mL de *Enterococcus faecalis* do grupo aPDT foi diferente estatisticamente em relação aos demais grupos mostrando a superioridade do grupo aPDT na redução desse microrganismo em relação aos demais tratamentos estudados, conforme a figura 4D.

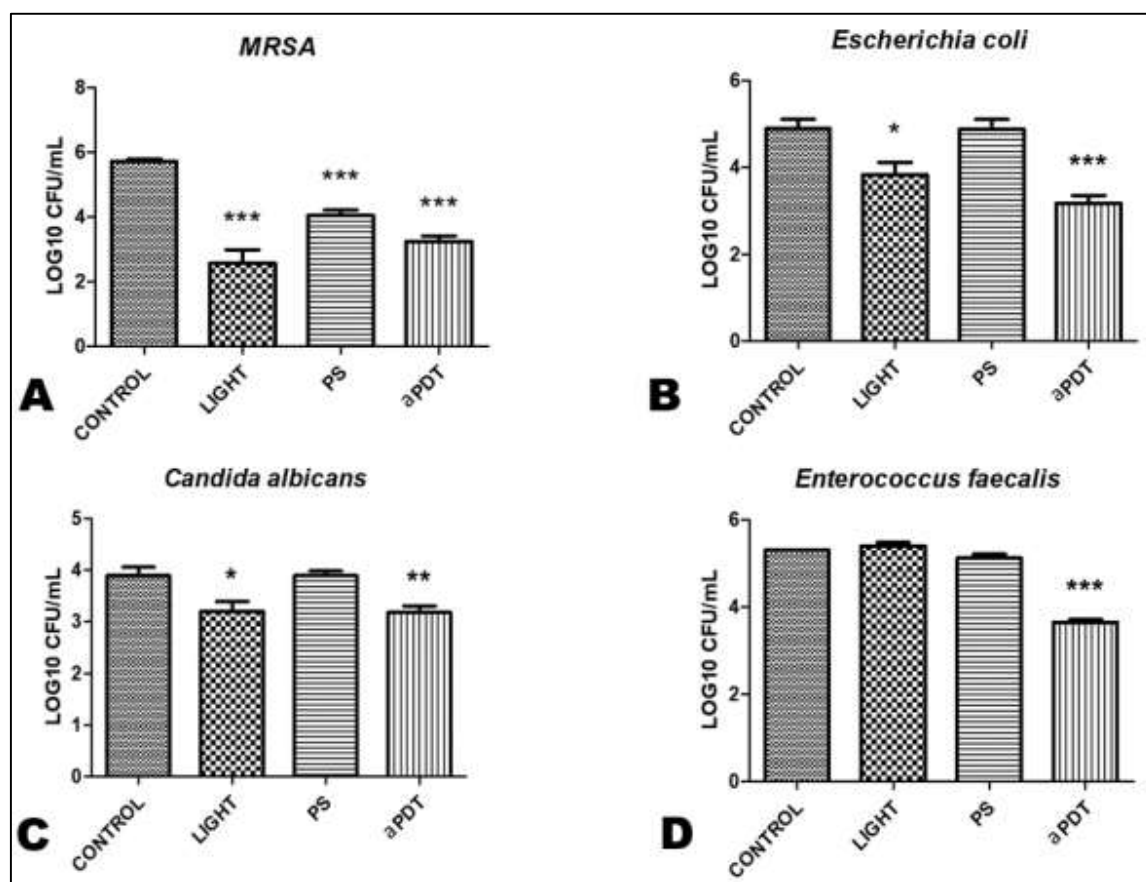


Fig. 4 – A: Comparação das médias de Log₁₀ UFC/mL de MRSA entre os grupos controle, luz, fotossensibilizador e aPDT. **B:** Comparação das médias de Log₁₀ UFC/mL de *Escherichia coli* entre os grupos controle, luz, fotossensibilizador e aPDT. **C:** Comparação das médias de Log₁₀ UFC/mL de *Candida albicans* entre os grupos controle, luz, fotossensibilizador e aPDT. **D:** Comparação das médias de Log₁₀ UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre os grupos controle, luz, fotossensibilizador e aPDT.

Já na comparação da efetividade dos grupos aPDT frente aos microrganismos estudados, pôde-se observar que a maior redução dentre as aPDTs foi alcançada frente a MRSA (média de redução = 2,48), seguido pela *Escherichia coli* (média de redução = 1,72), *Enterococcus faecalis* (média de redução = 1,65), uma redução maior que 1,5 Log₁₀ UFC/mL mostrando efetividade relevante da aPDT para esses microrganismos, embora a aPDT também tenha mostrado considerável efetividade frente a *Candida albicans* (média de redução = 0,71). Observou-se diferença estatística na redução entre MRSA e *Candida albicans* ($p \leq 0,01$), entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* ($p \leq 0,05$) e entre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* ($p \leq 0,05$), de acordo com a figura 5.

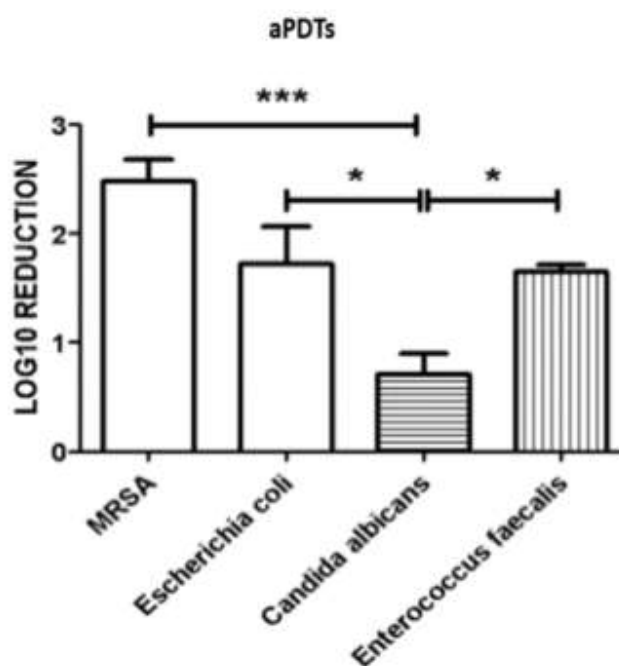


Fig. 5 - Comparação das reduções das médias de Log10 UFC/mL entre os grupos aPDTs frente aos microrganismos estudados.

DISCUSSÃO

Enterococcus faecalis é considerado um dos principais causadores da periodontite apical recorrente após tratamento endodôntico e está envolvido com lesões que ocorrem mesmo após o retratamento, sendo então um dos microrganismos mais estudados pelas pesquisas que se dedicam a avaliar a efetividade antimicrobiana de procedimentos, medicamentos e técnicas no tratamento endodôntico [15-17], o que justificou a utilização de tal microrganismo neste experimento. Além de observar a efetividade da aPDT sobre *Enterococcus faecalis*, foi importante observar a efetividade da técnica nos parâmetros propostos frente a outros microrganismos de importância na Endodontia. No presente estudo construiu-se um desafio extremo com a formação de biofilme maduro de 4 dias com crescimento estabelecido de multi-organismos de diferentes características celulares, fisiológicas e fatores de virulência (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente – MRSA e *Candida albicans*) para que a técnica proposta fosse analisada de um ponto de vista mais desafiador que aquele que poderíamos encontrar em uma situação clínica a fim de que os resultados sejam realmente passíveis de serem transpostos até na pior condição clínica que possa existir.

Assim foi possível observar que a aPDT utilizando curcumina nanotecnológica ativada por LED 450nm por 5 minutos tem relevante efetividade sobre esse desafio extremo já que a técnica proposta conseguiu reduzir uma média acima de 1,5 de número de Log₁₀/CFU/mL para *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e MRSA quando estão organizados na condição de biofilme maduro de multi-organismos (multiespécies) e sem utilização de solução irrigante com propriedades antimicrobianas. Não foram encontrados estudos na literatura que realizassem testes sobre as condições extremas de biofilmes maduros, multiespécies e com espécies resistentes como nosso estudo.

O estudo de Hoedke e colaboradores (2018) [18] analisou a efetividade da aPDT em condutos radiculares associada a irrigação com hipoclorito de sódio 1% e clorexidina 2% sobre biofilme multiespécie maduro de 5 dias com *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis* e *Prevotella intermedia* e observaram também a efetividade antimicrobiana da técnica sobre esse tipo de condição de biofilme, embora nesse caso os pesquisadores tenham utilizado soluções desinfetantes na irrigação. Freitas e colaboradores em 2017 [19] realizaram a análise de diferentes estudos que investigaram a efetividade da aPDT sobre biofilmes cariogênicos mono e multiespécies e constataram que sob diferentes condições, a aPDT é eficaz na redução da contagem de *S. mutans* em biofilmes monoespécies e também observou que os biofilmes multiespécies foram mais resistentes à ação antimicrobiana da terapia, possivelmente devido à sua espessura e complexidade, confirmando que o desafio do nosso estudo no parâmetro proposto é realmente maior e que, mesmo assim, foi transposto com êxito, fato observado pela efetividade alcançada nos resultados do estudo.

É comum os estudos em Endodontia que analisam a atividade antimicrobiana da aPDT sejam realizados *in vitro* porém em desafios de menor complexidade que o presente estudo, como o desafio sobre células planctônicas e biofilmes de 24-48h monoespécie. Moradi e colaboradores (2022) [20] estudaram o efeito da aPDT com curcumina e riboflavina no biofilme de *Enterococcus faecalis* e observaram a formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura e a ação antimicrobiana da aPDT. Os resultados dos pesquisadores mostraram que a aPDT com curcumina e com riboflavina apresentaram redução significativa na contagem de *Enterococcus faecalis* em qualquer região do canal. Outro estudo também realizado utilizando-se microscopia eletrônica para observar a penetração dos microrganismos nos túbulos dentinários mais profundos e a efetividade a aPDT observou que as bactérias penetram até 1000 µm nos túbulos dentinários o que é muito difícil para um irrigante normal como o hipoclorito de sódio alcançar, já que o mesmo chega a atingir de 60-150 µm de profundidade nos túbulos

dentinários, diferente da aPDT que mostrou eliminar as bactérias até 890-900 µm adentro dos túbulos dentinários. O estudo citado, mostra a superioridade da aPDT de conseguir eliminar microrganismos durante o tratamento endodôntico por conseguir uma ampla penetração nos túbulos dentinários, além de ser favorecida em relação aos irrigantes tradicionais por ser seletiva, já que na técnica o pronunciado catiônico formado se liga e penetra rapidamente nas células bacterianas de forma seletiva em relação a ligação com células de mamíferos hospedeiros [15].

É possível observar que os estudos referentes à atividade antimicrobiana da aPDT na Endodontia tem passado por grandes transformações desde a utilização do consagrado azul de metileno ativado por laser. Tem aumentado o número de pesquisas utilizando a curcumina mediada pelo LED azul para aPDT na Endodontia ou com microrganismos de interesse, assim como este estudo, e observa-se também que os resultados são promissores embora poucos desses estudos tenham observado a atividade antimicrobiana sobre biofilmes multiespécies [12,17].

Os estudos mais atuais relacionados de alguma forma à Endodontia têm se voltado para a efetividade antimicrobiana sobre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* resistente e sensível a meticilina (MRSA ou MSSA), assim como o presente estudo. Rocha e colaboradores (2020) [14] observaram a efetividade da aPDT sobre biofilmes monoespécie de *Candida albicans*, MRSA e *Escherichia coli*, o que corrobora com o presente estudo, embora não tenha sido realizado no mesmo desafio de biofilme multiespécie. Silva e colaboradores (2019) [21] observaram a eficácia a aPDT através da espectroscopia por fluorescência e análise microbiológica sobre biofilmes maduros monoespécie de *Candida albicans* assim como o presente estudo também constatou essa eficácia, ainda que não tenha sido observada uma redução maior que 1,5 de Log10/mL. Araújo e colaboradores (2018) [22] observaram a eficácia da aPDT sobre biofilmes de MRSA também utilizando-se da espectroscopia por fluorescência e análises microbiológicas em padrões de osso de trabeculado semelhante ao da região periapical o que denota importância da técnica no caso de procedimentos cirúrgicos de lesões endodônticas periapicais.

Outra mudança que é tendência nos estudos da Endodontia é a utilização de nanotecnologia, assim como o presente estudo que se propôs a utilizar a formulação microemulsionada da curcumina para obtenção de melhores resultados antimicrobianos e antibiofilme (desruptura de estrutura de biofilme). Uma revisão realizada por AlKahtani (2018) [23], discorre sobre o emprego da nanotecnologia em soluções irrigantes e na aPDT com

finalidade endodôntica, já que a nanotecnologia parece aumentar a eficácia da atividade antimicrobiana dos compostos. Esses novos nanocarreadores têm vantagens aprimoradas como na penetração em peles e mucosas, liberação controlada e sustentada do fármaco, maior estabilidade, direcionamento específico do local e alta eficiência de aprisionamento [14].

O presente estudo mostrou uma superioridade da aPDT (redução maior que 1,5 Log₁₀/mL) sobre biofilmes extremos utilizando-se curcumina nanotecnológica e este feito pode ter sido em decorrência do aprimoramento das características da curcumina através da utilização do sistema microemulsionado. Pourhajibagher e colaboradores (2020) [12] também utilizaram uma curcumina nanotecnológica que denominaram de nano-curcumina (N-CUR) com o objetivo de aumentar a fotossensibilidade na aPDT, e além disso, os autores ainda associaram metformina (Met) por fornecer uma vantagem sinérgica com a fotossensibilidade (N-CUR@ICG). Observaram que a aPDT com N-CUR@ICG-Met e LED em dois comprimentos de onda com laser de diodo e LED em canais radiculares infectados com biofilme de *Enterococcus faecalis*, apresentou uma redução estatisticamente maior na contagem de *Enterococcus faecalis* viáveis em estruturas de biofilmes em comparação com outras modalidades de tratamento o que, segundo os autores, pode melhorar a atividade antibiofilme da aPDT contra *Enterococcus faecalis*.

É possível refletir que, através dos resultados do presente estudo, seja possível incorporar os parâmetros da aPDT utilizando-se curcumina tecnológica associada a LED azul 450nm nas mesmas condições em estudos clínicos esperando-se resultados satisfatórios do ponto de vista microbiológico e de sucesso do tratamento imediato e tardio de modo a evitar os casos refratários e de recidivas, além de evitar o aparecimento de lesões periapicais e de possibilitar a remissão desse tipo de lesão. Assim a aPDT tem caminhado para promover uma nova era do tratamento endodôntico que venha a diminuir ou até eliminar a utilização de soluções desinfetantes e antimicrobianas tópicos e/ou sistêmicos de modo a minimizar e/ou eliminar o problema tão sério de surgimento de cepas resistentes na atualidade.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que:

- O tratamento que utilizou a luz LED de forma isolada e a aPDT foram os que mostraram eficácia na redução do número de Log₁₀ UFC/mL frente aos microrganismos estudados e organizados em biofilme multiespécie nos condutos radiculares, com exceção da redução de *Enterococcus faecalis* não ter sido alcançada no grupo luz;
- O tratamento que utilizou o fotossensibilizador de maneira isolada mostrou eficácia apenas sobre MRSA quando organizado em biofilme multiespécie nos condutos radiculares;
- Os resultados mostraram superioridade na redução do número de Log₁₀ UFC/mL no grupo aPDT tanto pelo fato de ter sido observada a eficácia da técnica sobre a redução de todos os microrganismos de interesse organizados em biofilmes multiespécie nos condutos radiculares, quanto pelo fato da redução ter sido maior ou igual em relação a redução alcançada nos demais grupos de tratamentos testados no estudo;
- O tratamento com aPDT utilizando-se curcumina nanotecnológica apresentou efetividade na redução de todos os microrganismos estudados na forma de biofilme multiespécie, sendo que a média de redução foi maior que 1,5 Log₁₀ UFC/mL.
- A técnica aPDT nos parâmetros utilizados no presente estudo deve ser explorada para utilização *in vivo* em condutos radiculares durante o tratamento endodôntico por ter mostrado eficácia relevante mesmo sobre as piores condições microbiológicas que possam ser estudadas como a organização em formato de biofilme maduro e a organização em formato de biofilme multiespécies, condições mais desafiadoras do que a organização dos biofilmes na infecção endodôntica natural mais agressiva.

[1] de Pablo, Ó. V., Estevez, R., Péix Sánchez, M., Heilborn, C., & Cohenca, N. (2010). Root Anatomy and Canal Configuration of the Permanent Mandibular First Molar: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, 36(12), 1919–1931. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.055>

[2] Nóbrega, L. M. M., Montagner, F., Ribeiro, A. C., Mayer, M. A. P., & Gomes, B. P. F. de A. (2016). Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. *Brazilian Oral Research*, 30. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0103>

- [3] Alghamdi, F., & Shakir, M. (2020). The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.7257>
- [4] Liu, J., Yu, M., Zeng, G., Cao, J., Wang, Y., Ding, T., Yang, X., Sun, K., Parvizi, J., & Tian, S. (2018). Dual antibacterial behavior of a curcumin–upconversion photodynamic nanosystem for efficient eradication of drug-resistant bacteria in a deep joint infection. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(47), 7854–7861. <https://doi.org/10.1039/C8TB02493>
- [5] Santezi, C., Reina, B. D., & Dovigo, L. N. (2018). Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.01.016>
- [6] Hsieh, Y.-H., Zhang, J.-H., Chuang, W.-C., Yu, K.-H., Huang, X.-B., Lee, Y.-C., & Lee, C.-I. (2018). An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 337. <https://doi.org/10.3390/ijms19020337>
- [7] Iqbal, A. (2016). The factors responsible for endodontic treatment failure in the permanent dentitions of the patients reported to the college of dentistry, the University of Aljouf, Kingdom of Saudi Arabia. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(5), ZC146. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/14272.7884>
- [8] Ibrahim, A. I. O., Petrik, L., Moodley, D. S., & Patel, N. (2017). Use of antibacterial nanoparticles in Endodontics. *South African Dental Journal*, 72(3), 105-112.
- [9] Athanassiadis, B., Abbott, P., & Walsh, L. (2007). The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal*, 52, S64–S82. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00527.x>
- [10] Tavares, W. L. F., Ferreira, M. V. L., de Carvalho Machado, V., Braga, T., Amaral, R. R., & Cohen, S. (2020). Antimicrobial photodynamic therapy and guided endodontics: A case report. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 101935. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101935>
- [11] Azizi, A., Shohrati, P., Goudarzi, M., Lawaf, S., & Rahimi, A. (2019). Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene Blue on streptococcus mutans bacterial colonies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 27, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.06.002>
- [12] Pourhajibagher, M., Plotino, G., Chiniforush, N., & Bahador, A. (2020). Dual wavelength irradiation antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and metformin doped with nano-curcumin as an efficient adjunctive endodontic treatment modality. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 29, 101628. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101628>

- [13] Schneider, S. W. (1971). A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology*, 32(2), 271-275.
[https://doi.org/10.1016/0030-4220\(71\)90230-1](https://doi.org/10.1016/0030-4220(71)90230-1)
- [14] Rocha, M. P., Ruela, A. L. M., Rosa, L. P., Santos, G. P. O., & Rosa, F. C. S. (2020). Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 32, 101962.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101962>
- [15] Bumb, S. S. (2014). Assessment of Photodynamic Therapy (PDT) in Disinfection of Deeper Dentinal Tubules in a Root Canal System: An In Vitro Study. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/11047.5155>
- [16] Dioguardi, M., Di Gioia, G., Illuzzi, G., Arena, C., Caponio, V. C. A., Caloro, G. A., Zhurakivska, K., Adipietro, I., Troiano, G., & Lo Muzio, L. (2019). Inspection of the Microbiota in Endodontic Lesions. *Dentistry Journal*, 7(2), 47.
<https://doi.org/10.3390/dj7020047>
- [17] Ghorbanzadeh, R., Assadian, H., Chiniforush, N., Parker, S., Pourakbari, B., Ehsani, B., Alikhani, M. Y., & Bahador, A. (2020). Modulation of virulence in *Enterococcus faecalis* cells surviving antimicrobial photodynamic inactivation with reduced graphene oxide-curcumin: An ex vivo biofilm model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 29, 101643. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101643>
- [18] Hoedke, D., Enseleit, C., Gruner, D., Dommisch, H., Schlafer, S., Dige, I., & Bitter, K. (2018). Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm *ex vivo*. *International Endodontic Journal*, 51, e23–e34.
<https://doi.org/10.1111/iej.12763>
- [19] de Freitas, M. T. M., Soares, T. T., Aragão, M. G. B., Lima, R. A., Duarte, S., & Zanin, I. C. J. (2017). Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery*, 35(5), 239–245. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4108>
- [20] Moradi, M., Fazlyab, M., Pourhajibagher, M., & Chiniforush, N. (2022). Antimicrobial action of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilm using curing light, curcumin and riboflavin. *Australian Endodontic Journal*, 48(2), 274–282.
<https://doi.org/10.1111/aej.12565>
- [21] da Silva, F. C., Fernandes Rodrigues, P. L., Santos Dantas Araújo, T., Sousa Santos, M., de Oliveira, J. M., Pereira Rosa, L., de Oliveira Santos, G. P., de Araújo, B. P., & Bagnato, V. S. (2019). Fluorescence spectroscopy of *Candida albicans* biofilms in bone cavities treated

with photodynamic therapy using blue LED (450 nm) and curcumin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 26, 366–370. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.002>

[22] Araújo, T. S. D., Rodrigues, P. L. F., Santos, M. S., de Oliveira, J. M., Rosa, L. P., Bagnato, V. S., Blanco, K. C., & da Silva, F. C. (2018). Reduced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.011>

[23] AlKahtani, R. N. (2018). The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. *The Saudi Dental Journal*, 30(2), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.01.002>

CHAPTER I

THE EFFECTS OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY (aPDT) WITH NANOTECHNOLOGY-APPLIED CURCUMIN AND 450nm BLUE LED IRRADIATION ON MULTI-SPECIES BIOFILMS IN ROOT CANALS

Thayse Pithon Quadros Ravazzi^{a2}, Iasmym Mendes de Jesus^a, Gabriel Pinto de Oliveira Santos^a, Luciano Pereira Rosa^a, Francine Cristina Silva Rosa^a

^a Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brazil.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to evaluate the effectiveness of antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) utilizing nanotechnology-applied curcumin activated by blue LED (450 nm) on the elimination of microorganisms arranged in multispecies biofilms inside the root canals of extracted human teeth. **Design:** Forty single-rooted human teeth were used; these were randomized into four experimental groups, each comprising 10 teeth: control group, no treatment; photosensitizer (PS) group, nanotechnology-applied curcumin alone; light group, blue LED used separately; and aPDT group, nanotechnology-applied curcumin activated by blue LED. To carry out the tests, the interiors of the root canals were inoculated with species of *Candida albicans* (ATCC 90029), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 43300), using a multispecies biofilm. After the incubation period, the canals were treated according to the experimental groups, with no treatment given in the control group. **Results:** Inasmuch as the antimicrobial effectiveness of aPDT was concerned, it was observed that the greatest reduction in microbial counts using aPDTs was achieved against MRSA (mean reduction = 2.48 Log₁₀ CFU/mL), followed by *Escherichia coli* (mean reduction = 1.72), and *Enterococcus faecalis* (mean reduction = 1.65); a reduction greater than 1.5 Log₁₀ CFU/mL showed relevant effectiveness of aPDT against these microorganisms. Of note, aPDT has also shown considerable effectiveness against *Candida albicans* (mean reduction = 0.71), with a statistical difference in the reduction between the groups. **Conclusion:** aPDT was effective in reducing all microorganisms examined. The average reduction was greater than 1.5 Log₁₀ in all microorganisms except for *Candida albicans*.

Keywords: Photodynamic therapy; Endodontics; LED; Curcumin; Nanotechnology; Biofilms.

² Correspondence Address:

Thayse Pithon Quadros Ravazzi, Federal University of Bahia, Multidisciplinary Institute of Health. Rua Rio de Contas, 58. Candeias, 450029-094, Vitória da Conquista, BA, Brazil. Email: thayse.pithon@gmail.com and thayse.ravazzi@ufba.br

INTRODUCTION

From a biomechanical perspective, endodontic therapy is performed by cleaning, shaping, and root canal antiseptics, allowing for three-dimensional obturation of the root canal system. However, the complexity of root canal anatomy presents challenges and clinical difficulties that often put the main objective of this therapy at risk [1]. More than 1,000 bacterial species belonging to 13 phylotypes have been identified in the oral cavity to date. These species can reach the root canal system and are potential endodontic pathogens [2].

Among these species, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) stands out for its post-treatment persistence and its relationship with refractory cases [3] *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is recognized for its resistance to antimicrobials used for conventional therapies [4]. Moreover, *Escherichia coli* (*E. coli*) is a gram-negative bacterium commonly found in infectious processes involving root canals, refractory to treatment for neutralizing the aggressive activity of lipopolysaccharides (LPS) compared with gram-positive species [5]. Finally, *Candida species*, which are yeast-like fungi and related to endodontic infections, increase the difficulty of treatment [6].

The key to successful endodontic treatment would be complete debridement of the root canal system; removal of necrotic or infected pulp tissue and microorganisms; complete sealing of the root canal space. The anatomical complexity of the root canal is one cause of failure in endodontic therapy. Thus, failure to locate and treat all canals of the root canal system can mainly lead to unsuccessful endodontic treatment [7].

Several irrigating solutions and drugs are available to eliminate endodontic pathogens. However, elimination of these microorganisms is still not possible in SCR. In addition, this stimulates resistant strains, which makes treatment even more difficult [8]. Antibiotics used in endodontic therapy can act in three different ways: local, systemic, or prophylactic. Conventional endodontic treatment does not commonly require concomitant systemic antibiotic therapy due to possible absence of blood circulation at the target site. Topical use can significantly reduce the number of bacteria [9].

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a promising approach for endodontic treatment that has been shown to be effective *in vitro* and *in vivo* studies. This therapy is effective against many microorganisms that may be present in calcified root canals. Thus, aPDT results in bacterial and fungal cell damage and death and has been shown to be minimally

invasive, , reproducible, and cost-effective for use in endodontically compromised patients; the development of antibiotic resistance is also not a problem [10].

Currently, research is being directed towards the development of light-sensitive materials with selective inhibition properties to manage opportunistic infections, which includes the use of turmeric (*Cúrcuma Longa L.*). This herb exhibits strong antioxidant properties. Furthermore, curcumin, an active ingredient of turmeric, has anti-inflammatory and analgesic properties similar to conventional pain relievers, as well as antibacterial, antiviral, and antifungal activities [11].

Studies have suggested development of nano-photosensitizers for aPDT to improve its bioavailability and binding to microbial cells. Thus, nanotechnology has been recently indicated not only to provide an efficient solution, improving water solubility of curcumin, but also accelerate its penetration and localization to microbial cell surfaces, increasing its bioavailability. Furthermore, it has been reported that nanotechnology-applied curcumin that is used with effective conjugation strategies could improve the medication delivery system [12]

Therefore, this study aimed to evaluate the effectiveness of aPDT using curcumin, activated by blue LED (450 nm), in the elimination of microorganisms arranged in multispecies biofilms of ATCC strains of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA), and *Candida albicans* inside the root canals of natural human teeth in vitro.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings under protocol no. 060/2005 - PH/CEP.

Preparation of specimens for execution of tests

Forty single-rooted human teeth from the tooth bank of the Biophotonics Applied to the Health and Biotechnology Research Group at the Multidisciplinary Institute in Health at the Federal University of Bahia (BAS-BIOTEC-IMS/UFBA) were used.

All teeth were autoclaved at 121°C for 15 min and radiographed in buccolingual and mesiodistal directions, including straight root canals with 5° of curvature or less and approximate dimensions, analyzed using the Schneider technique [13].

After removal of the remaining organic debris with Curette Gracey 3-4, teeth with anatomical complexity of the root canal, moderate and severe degrees of curvature, and presence of cavities resulting from carious lesions or fractures in the root portion were excluded. To prepare the specimens, the selected teeth were transversely sectioned in the region of the cemento-enamel limit using rotary instruments, cylindrical diamond drill no 3216, and carborundum disks to obtain standardized root specimens 16 mm. in size.

After being sectioned, the specimens were submitted to the instrumentation procedure of the root canals in reciprocating movement using the Reciproc Blue 40.06 instrument, with irrigation of 3mL of saline solution. A manual instrument, C-Pilot #10, was also used for foraminal patency through visual inspection of the foramen exit. After patency was achieved, 1 mm was reduced to obtain the actual working length. In all specimens, apical sealing was performed with photopolymerizable resin, and external waterproofing was performed with two layers of epoxy adhesive. The specimens were sterilized in an autoclave at 121°C for 15 min. and fixed in sterile Eppendorf, in a laminar flow with dense condensation silicone, as shown in Fig 1.

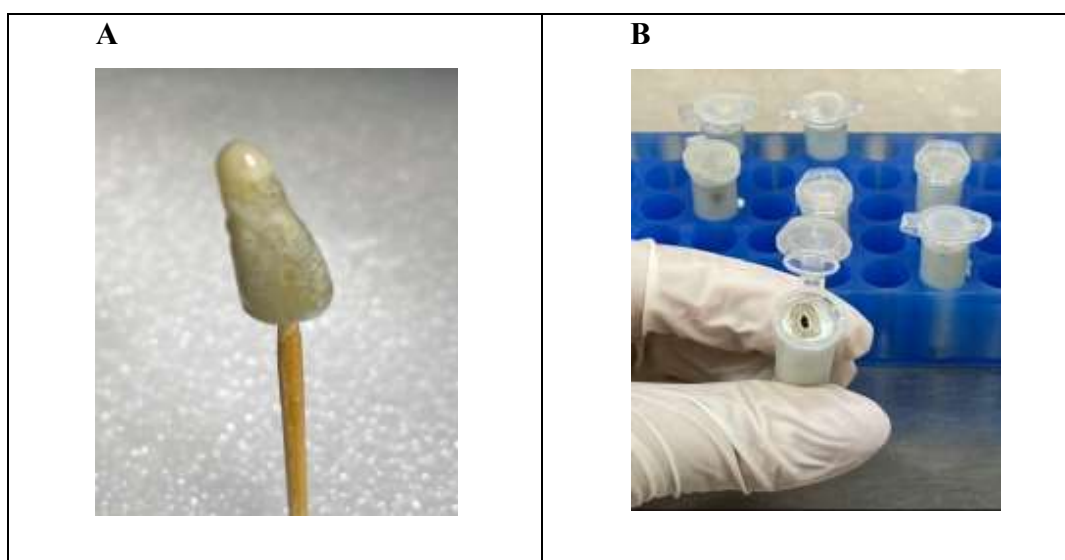


Fig. 1 – A: Photo of the prepared and isolated specimen; **B:** Photo of specimens fixed in eppendorfs.

Development of the multispecies “experimental biofilm transposition” technique

A methodology called “experimental biofilm transposition” was developed by the team. For forming multispecies biofilms, ATCC strains of *Candida albicans* (ATCC 90029),

Enterococcus faecalis (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA; ATCC 43300) were used. First, suspensions of 1×10^6 cells/mL of these microorganisms were prepared and standardized by spectrophotometry. Additionally, their optical density and wavelength (λ) values were determined, as shown in Table 1.

Table 1– Wavelength and optical density used to obtain suspensions containing 1×10^6 cells/mL of microorganisms.

Microorganism	Wave-length	Optical density
<i>Candida albicans</i>	530 nm	0,284
<i>Escherichia coli</i>	590 nm	0,324
MRSA	490 nm	0,374
<i>Enterococcus faecalis</i>	760 nm	0,298

To make the multispecies biofilm, an aliquot of 10 μ L of the standardized suspension of *E. coli* was added to the amount of 2mL of the BHI broth culture medium in one polypropylene tube and then the tube was incubated in a bio-oxygen demand (BOD) incubator for 24h at 36°C. After the initial incubation period, 5 μ L of standardized suspension of *E. faecalis* and *C. albicans* was added to the tube, with nutritional reinforcement of 0.5mL of BHI broth and sabouraud dextrose broth. After incubation under the same conditions for 24 hours, 5 μ L of standardized suspension of MRSA was added to the biofilm along with 0.5mL of BHI broth and Sabouraud dextrose broth, incubated once more for 24 hours, ending the procedure with 3 days for forming a multispecies biofilm.

After the final incubation period, 50 μ L of the biofilm was seeded on each of the selective culture media: sabouraud dextrose agar with chloramphenicol, mitis salivarius bacitracin sucrose agar, mannitol agar, and MacConkey agar. The plates were incubated in a BOD for 24h at 36°C, after which positive growth in the culture media was observed, where colony characteristics were determined using Gram staining and microscopy to verify presence of the microorganisms of interest in the composition of the multispecies biofilm.

The root canals of the properly prepared and fixed specimens were inoculated with a suspension of the biofilm standardized by the MacFarland scale with turbidity equivalent to 1×10^6 cells/mL until the channel was completely filled and sealed with a sterile cotton ball. After 24 hours of incubation, to maintain its growth, 10 μ L of culture medium (BHI broth) was

added to the root canal to provide the nutritional conditions for the biofilm, finally, the set was incubated at 36°C for 24 hours. (Fig 2.)

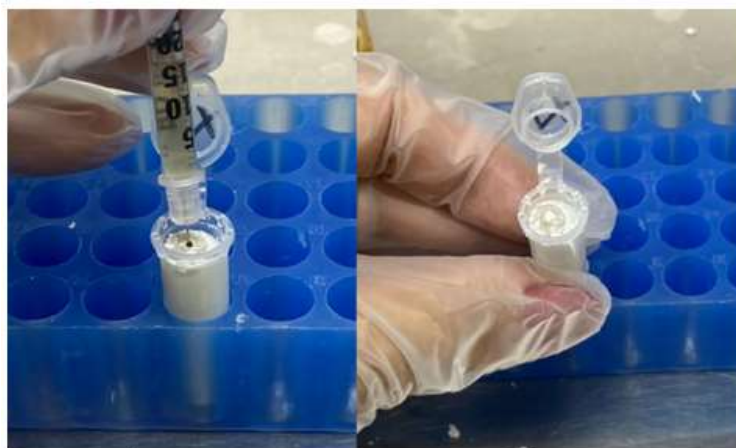


Fig. 2 – A: Transposition of the biofilm; **B:** Specimens contaminated with biofilm and sealed with a sterile cotton ball

Preparation of nanotechnological curcumin

At this stage of the experiment, the nanotechnology-based curcumin formulation technique (microemulsion) developed according to the work of Rocha et al. [14] in the IMS/UFBA pharmacotechnics laboratory by the research group BAS-BIOTEC/IMS-UFBA and partners was used (PATENT PUBLISHED INPI BR 102020009664-8 A2). The initial compound was weighed to obtain solutions with concentrations of: 20µg/ml, 40µg/ml, 60µg/ml, 80µg/ml, and 100µg/ml. Curcumin solutions were prepared and filtered through 0.22 µm pore membrane filters and stored in sterile amber containers.

Photosensitizer concentration screener

A screener test was also performed to determine the best concentration of photosensitizer used in the study. For this, aliquots of multispecies biofilms were subjected to nanotechnology-applied curcumin at concentrations of 20, 40, 60, 80, and 100µg/ml and then left in a dark environment for 9 min (pre-irradiation). After this period, aPDT was performed using the 450nm blue LED for two irradiation times, 5 and 10min. After comparing the results

(CFU/mL), it was observed that the optimal concentration and irradiation time of aPDT were, 80 μ g/ml and 5min, respectively.

Experimental groups and collection of intracanal content

After the 24-hour incubation period following transposition of the multispecies biofilm, the 40 specimens were randomized (each, n = 10) into the following experimental groups: (a) control group: no treatment; (b) photosensitizer group (PS): nanotechnological curcumin used alone; (c) Light group: blue LED used alone; and (d) aPDT group: nanotechnology curcumin activated by blue LED (figure 4). The samples were later processed in a vortex-type apparatus and the content resulting from agitation was used in serial dilutions. Furthermore, the initial suspension and dilutions were seeded in duplicate in the selective culture media. The plates were incubated in a BOD for 24h at 36°C. The colonies were counted, expressing the results in CFU/mL.

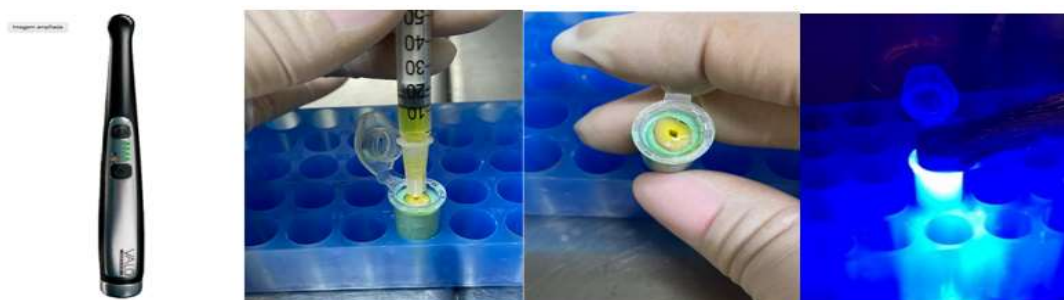


Fig. 3 – A: LED irradiation emission device, VALLO; **B:** photo showing filling of the conduit with curcumin dye; **C:** conduit filled with the photosensitizer; **D:** photo showing the irradiation at the root canal entrance of the specimen from the LED and aPDT groups.

Statistical analysis of the results

Using the GraphPad Prism software, version 9.0, 2020, the data were first analyzed using the Shapiro-Wilk normality test and remained within the precepts of normality. Means in Log₁₀ were compared using the ANOVA statistical test with a significance level of 95% with Tukey's post hoc test.

RESULTS

Regarding the effectiveness of treatments against MRSA, there was a statistical significant difference in the average of Log₁₀ CFU/mL compared with the control group in all groups (light, PS, and aPDT; $p < 0.05$). In all cases, the mean Log₁₀ CFU/mL was lower than that in the control group, indicating that the treatments reduced the number of Log₁₀ CFU/mL, as shown in Fig 4A. However, the mean Log₁₀ CFU/mL of MRSA did not show statistical differences between the treatment groups ($p > 0.05$).

Regarding the effectiveness of treatments against *Escherichia coli*, there was a statistically significant difference in the average of Log₁₀ CFU/mL compared with the control group only in the aPDT ($p < 0.01$) and light ($p < 0.05$) groups. In both cases, reduction in the average of Log₁₀ CFU/mL showed the relevant effectiveness of aPDT. The average of Log₁₀ CFU/mL of *Escherichia coli* between the aPDT and light groups did not present a significant difference ($p > 0.05$), as shown in Fig 4B.

Regarding the effectiveness of treatments against *Candida albicans*, there was a statistical difference in the average of Log₁₀ CFU/mL compared with the control group only in the aPDT ($p < 0.05$) and light ($p < 0.05$) groups. In both cases, reduction in the average of Log₁₀ CFU/mL showed the relevant effectiveness of treatment in the aPDT and light groups. The average of Log₁₀ CFU/mL of *Candida albicans* in the aPDT and light groups did not show a significant difference (Fig 4C).

Regarding the effectiveness of treatments against *Enterococcus faecalis*, there was a statistical difference in the average of Log₁₀ CFU/mL compared with the control group only in the aPDT group ($p < 0.01$). This denoted a reduction in the average of Log₁₀ CFU/mL of *Enterococcus faecalis* in this group and showed the relevant effectiveness of aPDT. The average of log₁₀ CFU/mL of *Enterococcus faecalis* in the aPDT group was statistically different compared with the other groups, showing the superiority of the aPDT group in reducing this microorganism compared with the other treatments studied, as shown in Fig 4D.

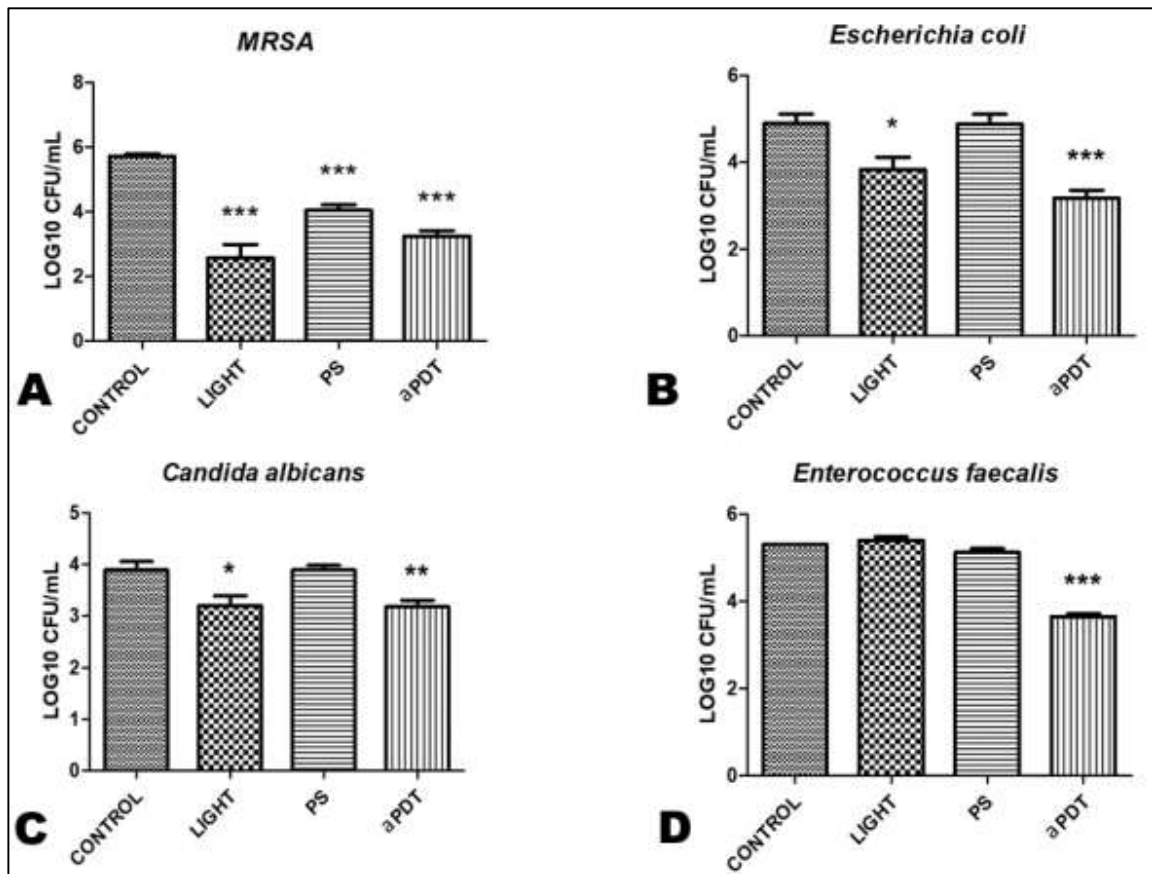


Fig. 4 – **A:** Comparison of the means of Log₁₀ CFU/mL of MRSA between the control, light, PS and aPDT groups. **B:** Comparison of the means of Log₁₀ CFU/mL of *Escherichia coli* between the control, light, PS and aPDT groups. **C:** Comparison of the means of Log₁₀ CFU/mL of *Candida albicans* between the control, light, PS, and aPDT groups. **D:** Comparison of the means of Log₁₀ CFU/mL of *Enterococcus faecalis* between the control, light, PS, and aPDT groups.

Comparing the effectiveness of the aPDT groups against the microorganisms studied, the greatest reduction among the aPDTs was achieved against MRSA (mean reduction = 2.48 CFU/mL), followed by *Escherichia coli* (mean reduction = 1.72), *Enterococcus faecalis* (mean reduction = 1.65). A reduction greater than 1.5 Log₁₀ CFU/mL showed the relevant effectiveness of aPDT against these microorganisms. Additionally, aPDT has also shown considerable effectiveness against *Candida albicans* (mean of reduction = 0.71). There was a statistical difference in the reduction between MRSA and *Candida albicans* ($p < 0.01$), between *Escherichia coli* and *Candida albicans* ($p < 0.05$) and between *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* ($p < 0.05$), according to figure 5.

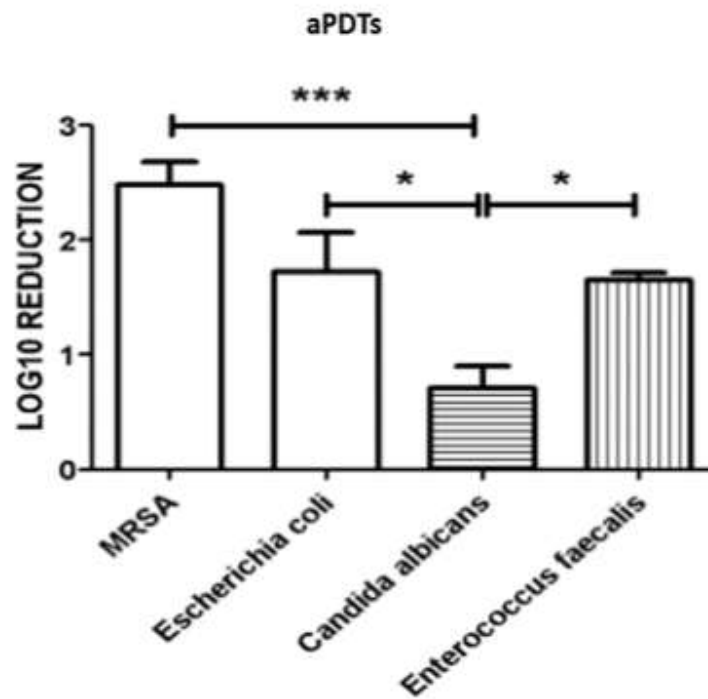


Fig. 5 - Comparison of reductions in the means of Log10 CFU/mL between the aPDTs groups against the microorganisms studied.

DISCUSSION

Enterococcus faecalis is considered one of the main causes of recurrent apical periodontitis after endodontic treatment. Moreover, it is involved in lesions that occur even after re-treatment techniques as endodontic treatment [15-17], which justifies the use of this microorganism in this experiment. In addition to observing the effectiveness of aPDT against *Enterococcus faecalis*, it was important to observe the effectiveness of the technique in the tested parameters against other microorganisms in endodontics. In the present study, an extreme challenge was met in the formation of a 4-day mature biofilm with established growth of multiple organisms with different cellular and physiological characteristics and virulence factors. These comprised *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), and *Candida albicans*. Thus, the proposed technique could be analyzed from a more challenging perspective than that we could find in a clinical situation. Therefore, the results might be really applicable to the worst clinical conditions that may exist.

Thus, our findings showed that aPDT using nanotechnology-applied curcumin activated by LED 450 nm for 5 min had relevant effectiveness in this extreme challenge. The proposed technique reduced the average number of Log₁₀/CFU/mL above 1.5 for *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and MRSA when they were arranged as a mature biofilm of multiple organisms (multispecies) and without the use of irrigating solution with antimicrobials. No studies were found in the literature that carried out tests under very controlled conditions using mature biofilms, multispecies biofilms, and resistant species, as in our study.

Hoedke et al. (2018) [18] analyzed the effectiveness of aPDT in root canals associated with irrigation with 1% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine on a 5-day mature multispecies biofilm. That biofilm comprised *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis*, and *Prevotella intermedia*. They also observed the antimicrobial effectiveness of the technique in this type of biofilm condition. However, in that case, the researchers used disinfectant solutions for irrigation. Freitas et al. (2017) [19] carried out an analysis of the different studies that assessed the effectiveness of aPDT in mono- and multispecies cariogenic biofilms. They found that under different conditions, aPDT was effective in reducing the count of *S. mutans* in monospecies biofilms. It was also observed that multispecies biofilms were more resistant to the antimicrobial action of the therapy, possibly due to their thickness and complexity. This confirmed the challenge met in our study in the proposed parameter that was really greater. However, this challenge was successfully transposed, a fact observed in the effectiveness shown in the results of the study.

Studies in endodontics that analyze the antimicrobial activity of aPDT are commonly carried out in vitro. However, in these studies, challenges were of less complexity than those in the present study, such as the challenge of planktonic cells and monospecies 24-48h biofilms. Moradi et al. (2022) [20] studied the effect of aPDT using curcumin and riboflavin on *Enterococcus faecalis* biofilms. They observed biofilm formation using scanning electron microscopy and the effect of antimicrobial action of aPDT. Their results showed that aPDT with curcumin and riboflavin significantly reduced *Enterococcus faecalis* counts in any region of the canal. Another study also used electron microscopy to observe penetration of microorganisms into the deeper dentinal tubules and the effectiveness of aPDT. It reported that bacteria penetrated up to 1000 µm into the dentinal tubules, which is very difficult for a normal irrigant such as hypochlorite of sodium to reach there (it reaches a depth of 60-150 µm in the dentinal tubules), unlike aPDT, which has been shown to eliminate bacteria up to 890-900 µm inside the dentinal tubules. The study showed the superiority of aPDT in managing to eliminate

microorganisms during endodontic treatment by achieving ample penetration into the dentinal tubules. It is favored over traditional irrigants because it is selective, since in the technique the pronounced cationic formed binds and rapidly penetrates bacterial cells selectively without binding with host mammalian cells [15].

Studies of the antimicrobial activity of aPDT in endodontics have undergone major transformations since the use of the consecrated laser-activated methylene blue. The number of studies using curcumin mediated by blue LED for aPDT in endodontics or with microorganisms of interest in endodontics has increased, as well as in our study. Although the results were apparently shown to be promising, few of these studies have observed antimicrobial activity on multispecies biofilms [12,17].

Most current studies of endodontics have focused on antimicrobial effectiveness against *Candida albicans* and *methicillin-resistant* and-sensitive *Staphylococcus aureus* (MRSA or MSSA), similar to the present study. Rocha et al. (2020) [14] observed the effectiveness of aPDT in monospecies biofilms of *Candida albicans*, MRSA, and *Escherichia coli*, consistent with the present study. However, it was not performed in the same multispecies biofilm challenge. Silva et al. (2019) [21] indicated the efficacy of aPDT through fluorescence spectroscopy and microbiological analysis in mature monospecies biofilms of *Candida albicans*. Although the present study also found this efficacy, the reduction was not greater than 1.5 Log₁₀/mL. Araújo et al. (2018) [22] observed the effectiveness of aPDT in MRSA biofilms using fluorescence spectroscopy and microbiological analyses of trabecular bone patterns similar to those of the periapical region. This indicated the importance of the technique in surgical procedures for periapical endodontic lesions.

Another trend in endodontic studies is the use of nanotechnology, similar to the present study that proposed the use of a microemulsion formulation of curcumin to obtain better antimicrobial and antibiofilm results (disruption of the biofilm structure). Since nanotechnology seems to increase the effectiveness of the antimicrobial activity of compounds, a review carried out by AlKahtani (2018) [23] discussed the use of nanotechnology in irrigating solutions and aPDT for endodontic purposes. These new nanocarriers have improved advantages such as penetration into the skin and mucous membranes, controlled and sustained drug release: greater stability, site-specific targeting, and high entrapment efficiency [14].

The present study showed superiority of aPDT (reduction greater than 1.5 Log₁₀/mL) over extreme biofilms using nanotechnology-applied curcumin. This feat may have been due to improvement in curcumin characteristics through the use of the microemulsified system.

Pourhajibagher et al. (2020) [12] also used nanotechnology-applied curcumin called nano-curcumin (N-CUR) with the aim of increasing photosensitivity in aPDT, and metformin (Met) was also associated with photosensitivity (N-CUR@ICG). They observed that aPDT with N-CUR@ICG-Met and LED at two wavelengths with diode laser and LED in root canals infected with *Enterococcus faecalis* biofilm showed a statistically greater reduction in the count of viable *Enterococcus faecalis* in biofilm structures compared with other treatment modalities. This method, according to the authors, may improve the antibiofilm activity of aPDT against *Enterococcus faecalis*.

Based on the results of the present study, it is possible to incorporate the aPDT parameters using technology-applied curcumin associated with 450 nm blue LED under the same conditions in clinical studies. Therefore, satisfactory results from the microbiological point of view and treatment success could be expected, including immediate and late outcomes to avoid refractory cases and relapses. In addition, its use could prevent appearance of periapical lesions and allowed for remission of this type of lesion. Thus, aPDT might promote a new era of endodontic treatment that would reduce or even eliminate the use of disinfectant solutions and topical and/or systemic antimicrobials. This might minimize and/or eliminate the serious problems of the emergence of resistant strains.

CONCLUSION

It was possible to conclude that:

- Treatment with isolated LED light and aPDT showed effectiveness in reducing the number of Log₁₀ CFU/mL against the microorganisms studied and arranged in multispecies biofilm in the root canals, with the exception of reductions in *Enterococcus faecalis* that have not been achieved in the light group;
- Treatment with photosensitizer alone was effective only against MRSA;
- The results showed superiority in the reduction of the number of Log₁₀ CFU/mL in the aPDT group, because the technique was effective in reducing all microorganisms of interest. In addition, the reduction was greater than or equal to that achieved in the other treatment groups tested in the study;

- Treatment with aPDT using nanotechnology-applied curcumin was effective in reducing all microorganisms studied in the form of a multispecies biofilm, with an average reduction greater than 1.5 Log₁₀ CFU/mL;
- The aPDT technique in the parameters used in the present study should be assessed *in vivo* using root canals during endodontic treatment. This is because aPDT has shown relevant efficacy even under the worst microbiological conditions that could be studied, such as organization in mature biofilm and multispecies biofilm formats. These formats are more challenging conditions than the organization of biofilms in the most aggressive natural endodontic infection.

REFERENCES

- [1] de Pablo, Ó. V., Estevez, R., Péix Sánchez, M., Heilborn, C., & Cohenca, N. (2010). Root Anatomy and Canal Configuration of the Permanent Mandibular First Molar: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, *36*(12), 1919–1931. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.055>
- [2] Nóbrega, L. M. M., Montagner, F., Ribeiro, A. C., Mayer, M. A. P., & Gomes, B. P. F. de A. (2016). Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. *Brazilian Oral Research*, *30*. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0103>
- [3] Alghamdi, F., & Shakir, M. (2020). The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.7257>
- [4] Liu, J., Yu, M., Zeng, G., Cao, J., Wang, Y., Ding, T., Yang, X., Sun, K., Parvizi, J., & Tian, S. (2018). Dual antibacterial behavior of a curcumin–upconversion photodynamic nanosystem for efficient eradication of drug-resistant bacteria in a deep joint infection. *Journal of Materials Chemistry B*, *6*(47), 7854–7861. <https://doi.org/10.1039/C8TB02493>
- [5] Santezi, C., Reina, B. D., & Dovigo, L. N. (2018). Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *21*, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.01.016>
- [6] Hsieh, Y.-H., Zhang, J.-H., Chuang, W.-C., Yu, K.-H., Huang, X.-B., Lee, Y.-C., & Lee, C.-I. (2018). An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 337. <https://doi.org/10.3390/ijms19020337>
- [7] Iqbal, A. (2016). The factors responsible for endodontic treatment failure in the permanent dentitions of the patients reported to the college of dentistry, the University of Aljouf,

Kingdom of Saudi Arabia. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(5), ZC146.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/14272.7884>

[8] Ibrahim, A. I. O., Petrik, L., Moodley, D. S., & Patel, N. (2017). Use of antibacterial nanoparticles in Endodontics. *South African Dental Journal*, 72(3), 105-112.

[9] Athanassiadis, B., Abbott, P., & Walsh, L. (2007). The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal*, 52, S64–S82. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00527.x>

[10] Tavares, W. L. F., Ferreira, M. V. L., de Carvalho Machado, V., Braga, T., Amaral, R. R., & Cohen, S. (2020). Antimicrobial photodynamic therapy and guided endodontics: A case report. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 101935.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101935>

[11] Azizi, A., Shohrati, P., Goudarzi, M., Lawaf, S., & Rahimi, A. (2019). Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene Blue on streptococcus mutans bacterial colonies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 27, 203–209.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.06.002>

[12] Pourhajibagher, M., Plotino, G., Chiniforush, N., & Bahador, A. (2020). Dual wavelength irradiation antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and metformin doped with nano-curcumin as an efficient adjunctive endodontic treatment modality. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 29, 101628.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101628>

[13] Schneider, S. W. (1971). A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology*, 32(2), 271-275.
[https://doi.org/10.1016/0030-4220\(71\)90230-1](https://doi.org/10.1016/0030-4220(71)90230-1)

[14] Rocha, M. P., Ruela, A. L. M., Rosa, L. P., Santos, G. P. O., & Rosa, F. C. S. (2020). Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 32, 101962.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101962>

[15] Bumb, S. S. (2014). Assessment of Photodynamic Therapy (PDT) in Disinfection of Deeper Dentinal Tubules in a Root Canal System: An In Vitro Study. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/11047.5155>

[16] Dioguardi, M., Di Gioia, G., Illuzzi, G., Arena, C., Caponio, V. C. A., Caloro, G. A., Zhurakivska, K., Adipietro, I., Troiano, G., & Lo Muzio, L. (2019). Inspection of the Microbiota in Endodontic Lesions. *Dentistry Journal*, 7(2), 47.
<https://doi.org/10.3390/dj7020047>

- [17] Ghorbanzadeh, R., Assadian, H., Chiniforush, N., Parker, S., Pourakbari, B., Ehsani, B., Alikhani, M. Y., & Bahador, A. (2020). Modulation of virulence in *Enterococcus faecalis* cells surviving antimicrobial photodynamic inactivation with reduced graphene oxide-curcumin: An *ex vivo* biofilm model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *29*, 101643. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101643>
- [18] Hoedke, D., Enseleit, C., Gruner, D., Dommisch, H., Schlafer, S., Dige, I., & Bitter, K. (2018). Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm *ex vivo*. *International Endodontic Journal*, *51*, e23–e34. <https://doi.org/10.1111/iej.12763>
- [19] de Freitas, M. T. M., Soares, T. T., Aragão, M. G. B., Lima, R. A., Duarte, S., & Zanin, I. C. J. (2017). Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery*, *35*(5), 239–245. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4108>
- [20] Moradi, M., Fazlyab, M., Pourhajibagher, M., & Chiniforush, N. (2022). Antimicrobial action of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilm using curing light, curcumin and riboflavin. *Australian Endodontic Journal*, *48*(2), 274–282. <https://doi.org/10.1111/aej.12565>
- [21] da Silva, F. C., Fernandes Rodrigues, P. L., Santos Dantas Araújo, T., Sousa Santos, M., de Oliveira, J. M., Pereira Rosa, L., de Oliveira Santos, G. P., de Araújo, B. P., & Bagnato, V. S. (2019). Fluorescence spectroscopy of *Candida albicans* biofilms in bone cavities treated with photodynamic therapy using blue LED (450 nm) and curcumin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *26*, 366–370. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.002>
- [22] Araújo, T. S. D., Rodrigues, P. L. F., Santos, M. S., de Oliveira, J. M., Rosa, L. P., Bagnato, V. S., Blanco, K. C., & da Silva, F. C. (2018). Reduced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *21*, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.011>
- [23] AlKahtani, R. N. (2018). The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. *The Saudi Dental Journal*, *30*(2), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.01.002>

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FOSJC

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo n° 060/2005-PH/CEP, sobre "Efetividade in vitro da terapia fotodinâmica com laser ArGaI, na eliminação de microrganismos e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares" sob a responsabilidade de FRANCINE CRISTINA DA SILVA, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução n° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa

São José dos Campos, 11 de outubro de 2005.


Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FOSJC

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA <small>R. Eng. Francisco José Longo, 777 - São Carlos - (067) 1200-070 - F. (31) 3647-0900 - FAX (31) 3347-0928 -</small>	
 Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	
São José dos Campos, 19 de fevereiro de 2008	
Ofício nº 01/08-CEP	
Prezado(a) Sr.(a)	FRANCINE CRISTINA SILVA ROSA
Projeto	Efetividade in vitro da terapia fotodinâmica com laser ArGaGI, na eliminação de microorganismos e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares.
PARECER	
Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a ALTERAÇÃO DO NOME DO PROJETO , passando para "Eficácia da instrumentação associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana e medicação intracanal na eliminação de biofilmes e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares" . Convalidando dessa forma o Protocolo nº 060/2005-PH/CEP de 11/10/2005	
Atenciosamente,	
 Prof. Dra. SUELY CARVALHO MUTTI NARESSI Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC	

ANEXO C – NORMAS PARA SUBMISSÃO NA REVISTA LASER IN MEDICAL SCIENCE

Instructions for Authors

Types of papers

- Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures
- Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
- Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures - Case Reports will not be accepted!
- Letter to the Editor – up to 600 words

[Back to top](#)

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit manuscript" and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

[Back to top](#)**Editorial Procedure****Double-blind peer review**

This journal follows a double-blind reviewing procedure. Authors are therefore requested to submit:

A blinded manuscript without any author names and affiliations in the text or on the title page. Self-identifying citations and references in the article text should be avoided.

A separate title page, containing title, all author names, affiliations, and the contact information of the corresponding author. Any acknowledgements, disclosures, or funding information should also be included on this page.

[Back to top](#)**Title Page****Title Page**

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit [ORCID](#) of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusion

For life science journals only (when applicable)

- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- Trial registration number and date of registration followed by "retrospectively registered", for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

- **Competing Interests:** Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to "Competing Interests and Funding" below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

[Back to top](#)

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

[Back to top](#)

Scientific style

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Units and abbreviations

- Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].
- Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

Drugs

- When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

[Back to top](#)

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "<https://doi.org/abc>").

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*.
<https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file sn-basic.bst which is included in the [Springer Nature Article Template](#).

[Back to top](#)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

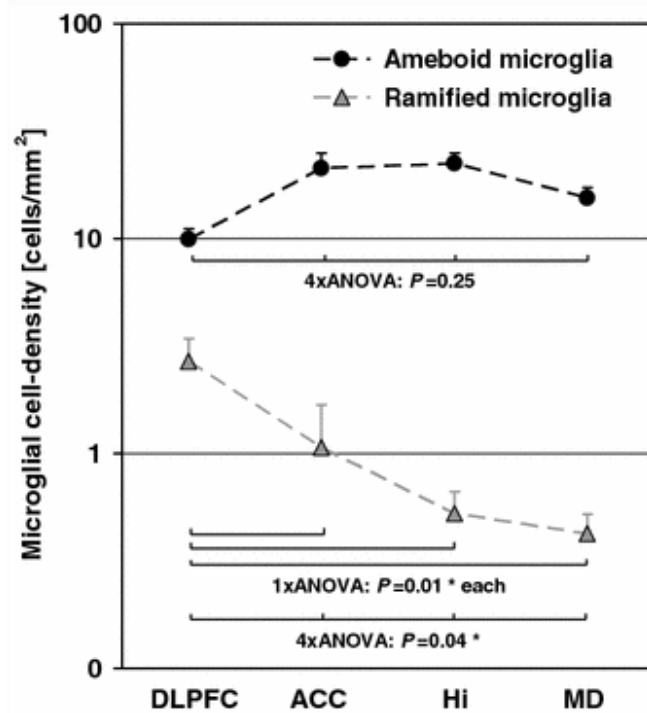
[Back to top](#)

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

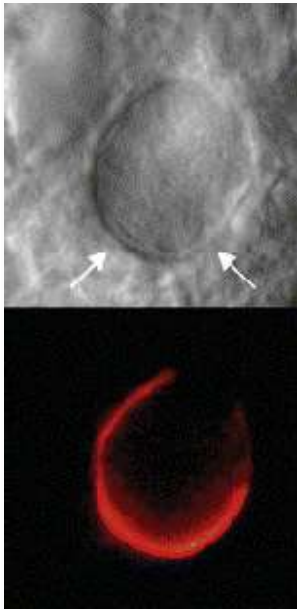
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



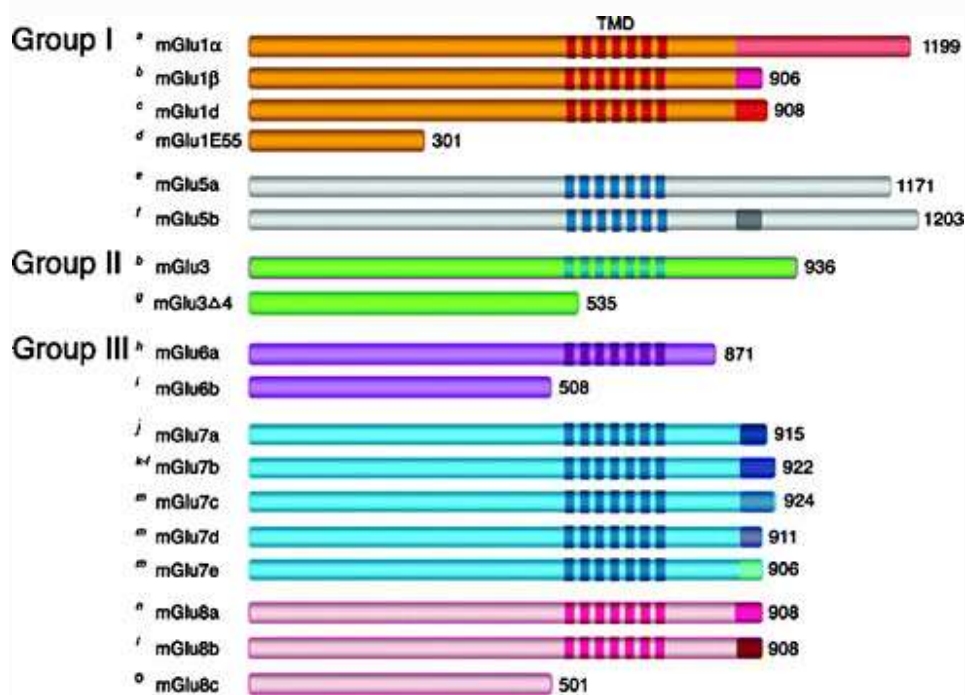
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

[Back to top](#)

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files
- Minimum video duration: 1 sec

- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

[Back to top](#)

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)) the journal will follow the [COPE](#) guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').)
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.

- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following [COPE](#) guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

[Back to top](#)

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018](#)

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or

general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every

author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

[Example: CRediT taxonomy:](#)

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

[A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006](#)

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their [ORCID](#) ID when submitting an article for consideration or acquire an [ORCID](#) ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the

editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

[Back to top](#)

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

[Back to top](#)

Competing Interests

Authors are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

Editorial Board Members and Editors are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list they must declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

Funding: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

Employment: Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

Financial interests: Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

Non-financial interests: In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a

disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under 'summary of requirements' (see below) funding information should be included in the '**Declarations**' section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Funding' and/or 'Competing interests'. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.

- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- **Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company Wand owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.

- **Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.

Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.

- **Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.

Non-financial interests: none.

- **Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.

Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

[Back to top](#)

Research involving human participants, their data or biological material

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the [1964 Declaration of Helsinki](#) and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The

decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on **Informed Consent**.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the [NCBI database](#) for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filip1^{tm1a(KOMP)Wtsi}* **RRID:MMRRC_055641-UCD**

Cell Line: RST307 cell line **RRID:CVCL_C321**

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, **RRID:AB_2722109**

Plasmid: mRuby3 plasmid **RRID:Addgene_104005**

Software: ImageJ Version 1.2.4 **RRID:SCR_003070**

RRIDs are provided by the [Resource Identification Portal](#). Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly [register a new resource](#) and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related

outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#).

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the [EQUATOR Network](#) when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials ([CONSORT](#)) and Study protocols ([SPIRIT](#))

Observational studies ([STROBE](#))

Systematic reviews and meta-analyses ([PRISMA](#)) and protocols ([Prisma-P](#))

Diagnostic/prognostic studies ([STARD](#)) and ([TRIPOD](#))

Case reports ([CARE](#))

Clinical practice guidelines ([AGREE](#)) and ([RIGHT](#))

Qualitative research ([SRQR](#)) and ([COREQ](#))

Animal pre-clinical studies ([ARRIVE](#))

Quality improvement studies ([SQUIRE](#))

Economic evaluations ([CHEERS](#))

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

[Back to top](#)

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent/guardian if the participant is a minor or incapable or legal representative) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant

information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made aware what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered "informed". However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. A consent to publish form can be found

[here. \(Download docx, 36 kB\)](#)

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Consent to participate' and/or 'Consent to publish'. Other declarations include Funding, Competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Sample statements for "**Consent to participate**":

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

Sample statements for "**Consent to publish**":

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

[Back to top](#)

Research Data Policy

This journal operates a [type 1 research data policy](#). The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

[List of Repositories](#)

[Research Data Policy](#)

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include

the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

[DataCite](#)

If the journal that you're submitting to uses double-blind peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also blinded. There are [data repositories that can assist with this](#) and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data repository, or help organising and sharing research data can access our [Author Support portal](#) for additional guidance.

[Back to top](#)

After Acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Once typesetting is complete, you will receive a link asking you to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article as well as arrange rights and payment of any associated publication cost.

Once you have completed this, your article will be processed and you will receive the proofs.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

[Back to top](#)

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.

- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

[Open Choice](#)

[Funding and Support pages](#)

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO



The screenshot shows a web interface for the journal 'Lasers in Medical Science'. At the top right, the user 'Thayse Ravazzi' is logged in. A navigation bar includes links for 'Home', 'Main Menu', 'Submit a Manuscript', 'About', and 'Help'. Below this is a table with columns for 'Action', 'Manuscript Number', 'Title', 'Initial Date Submitted', 'Status Date', and 'Current Status'. One submission is listed with the manuscript number 'LIMS-D-23-00000' and a status of 'Submitted'.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail	LIMS-D-23-00000	THE EFFECTS OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY (aPDT) WITH NANOTECHNOLOGY-APPLIED CURCUMIN AND 450nm BLUE LED IRRADIATION ON MULTI-SPECIES BIOFILMS IN ROOT CANALS	10 Feb 2023	10 Feb 2023	Submitted