



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA  
CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E DA SAUDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**THIAGO MACIEL CAVALCANTI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA A LASER: ESTUDO *IN VITRO***

CAMPINA GRANDE

2011

**THIAGO MACIEL CAVALCANTI**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA A LASER: ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

CAMPINA GRANDE

2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

C376a Cavalcanti, Thiago Maciel.  
Avaliação do efeito antibacteriano da terapia fotodinâmica a laser [manuscrito]: estudo *in vitro* / Thiago Maciel Cavalcanti. – 2011.  
71 f. : il. color.

Digitado  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2011.

“Orientação: Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Departamento de Odontologia”.

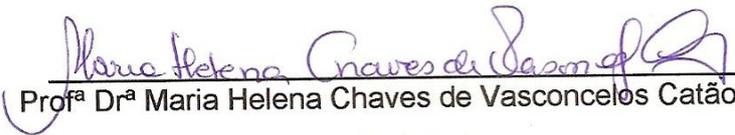
1. Terapia fotodinâmica. 2. Laser de baixa potência. 3. Microbiologia. 4. Bactérias. I. Título.

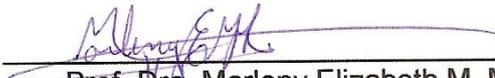
21. ed. CDD 579

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA A LASER: estudo *in vitro***

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

Aprovado em 20 / 07 / 2011

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão / UEPB  
Orientadora

  
Prof. Dra. Marleny Elizabeth M. M. Gerbi / UPE  
Examinador

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raissa Mayer Ramalho Catão / UEPB  
Examinadora

## DEDICATÓRIA

À grande mestre e doutora da minha vida profissional e pessoal, Professora Neves, minha mãe. DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente, agradeço ao nosso PAI eterno, nosso DEUS, por esta grande Vitória. O Senhor que é o meu GUIA, que me orienta e coordena, e toda glória está em seu NOME.

À querida professora Maria Helena Catão pelas oportunidades, pelos incentivos científicos, para realização desta tão importante pesquisa.

Agradecer com todo carinho a minha amada esposa Ana Patrícia Aguiar Feitosa Cavalcanti, por todas as palavras, gestos de incentivo, e por transbordar o mais sincero amor que me fortalece a cada dia.

Agradeço ao amor companheiro do meu Pai, José Adailton, por sempre está ao meu lado, principalmente como grande Amigo, me dando força, tranquilidade e a ciência da vida.

Agradeço aos meus irmãos Diego e Rafaella, que cumprem o verdadeiro sentido da família unida, nos fazendo sempre três espelhos com reflexos de vitória, felicidade e amor, um para o outro.

A toda minha família Maciel Cavalcanti, tendo as minhas maravilhosas avós Hilda Cavalcanti e Maria das Dores Maciel, como alicerces de uma família feliz.

À família da minha esposa, pelo apoio incondicional.

Ao programa de pós-graduação em Odontologia da nossa Universidade Estadual da Paraíba e todos os professores.

À coordenadora da microbiologia do LPAA, querida professora Raíssa Catão pelo fornecimento da bagagem do conhecimento e por ter aberto as portas do seu departamento para o mestrado de Odontologia

Ao grande amigo Jalber Almeida, pela amizade construída desde a graduação e pelo grande apoio. “Vencemos mais uma etapa companheiro!”

Aos meus colegas da primeira turma de mestrado em odontologia da UEPB, pela colaboração, incentivos e aprendizado conseguidos.

Às alunas da graduação do curso de farmácia Anna Flávia Fernandes e Luanne Nunes pelo apoio importantíssimo no setor laboratorial.

A CAPES pelo apoio financeiro. Agradeço.

## RESUMO

O aumento da resistência das bactérias às drogas antibióticas gera a necessidade de desenvolver novos meios bacteriostáticos e bactericidas que colaborem com a terapêutica de indivíduos infectados. Dentre esses meios estão as terapias complementares, envolvendo a laserterapia e a terapia fotodinâmica. Os lasers estão sendo utilizados isolados ou associados a substâncias fotossensibilizadoras para serem auxiliares na inativação de bactérias, fungos e vírus. A terapia fotodinâmica (TFD) baseada na ativação de fotossensibilizadores por luz visível em baixas doses, com comprimento de onda apropriado, tem se tornado uma alternativa aos tratamentos convencionais no combate aos micro-organismos bucais, levando à morte do micro-organismo através de desordens na sua parede celular e no seu DNA. Nesse estudo, *IN VITRO*, duas terapias foram empregadas, a terapia fotodinâmica (TFD) e o Laser de Baixa Potência (LBP). Para TFD empregou-se o corante azul de metileno frente às bactérias em várias concentrações, utilizando-se da técnica disco-difusão estimulado através da luz *Laser*, comprimento de onda 660nm, luz vermelha, 320J/cm<sup>2</sup>, meio ativo InGaAlP (Índio Gálio Alumínio Fósforo). Para o uso do LBP, isoladamente, sobre o crescimento bacteriano utilizou-se várias dosimetrias com dois parâmetros: meio ativo InGaAlP (Índio Gálio Alumínio Fósforo), comprimento de onda 660 nm, laser vermelho e emissão contínua e o meio ativo AsGaAl (Arseneto de Gálio e Alumínio) 808 nm, laser infravermelho e emissão contínua. As bactérias utilizadas nesse experimento foram as cepas padrão American Type Culture Collection – ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 abrangendo o espectro bacteriano Gram-negativo, Gram-positivo, aeróbias e anaeróbias facultativas. O efeito antibacteriano, *IN VITRO*, da TFD em diferentes bactérias foi quantificado em milímetros através da observação do diâmetro dos halos de inibição de crescimento medidos com o auxílio de um halômetro. Foram consideradas como presentes as atividades antibacterianas das terapias com resultados de diâmetro de halos de inibição de crescimento maiores ou iguais a 8mm. Observou-se efeitos antibacterianos da TFD para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com a presença de halos de inibição com média de 12mm, assim como para o uso isolado do corante azul de metileno. Para *Pseudomonas aeruginosa* não foi observado qualquer efeito antibacteriano assim como para o uso isolado do laser de baixa potência.

**PALAVRAS CHAVES:** bactérias/efeito de radiação; terapia a laser de baixa intensidade; microbiologia; terapia fotodinâmica

## ABSTRACT

The increased resistance of bacteria to antibiotic drugs creates the need to develop new bacteriostatics ways and bactericidals to cooperate with the treatment of infected individuals. Among those tools are the complementary and alternative therapies involving laser therapy and photodynamic therapy. Lasers are being used isolated or associated with photosensitizing substances to work as helpers in the inactivation of bacterias, fungus and viruses. Photodynamic therapy (PDT) based on the activation of photosensitizers for visible light in low doses, with appropriate wavelength, has become an alternative to conventional treatments in the fight against oral micro-organisms, leading to death the organism by disorders in cell wall and DNA. *IN VITRO* study two therapies were used, Photodynamic therapy (PDT) and Low-Level Laser (LBP). For PDT we used the dye (methylene blue) to the bacteria in various concentrations, using the disk diffusion technique stimulated by laser light, wavelength 660nm, red light, InGaAlP active medium (Aluminum Indium Gallium Phosphorus). For use in the LBP isolated in micro-organisms several dosages were used with two parameters: medium active InGaAlP (Aluminum Indium Gallium Phosphorus), wavelength 660 nm, red laser and continuous emission and the active medium AsGaAl (Gallium Arsenide and Aluminum), 808 nm infrared laser and continuous emission. The bacteria used in this experiment were the standard strains American Type Culture Colection - ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 covering the spectrum Gram-negative bacteria, Gram-positive, aerobic and facultative anaerobic. The antibacterial effect *IN VITRO* of PDT in different bacteria was quantified in millimeters by observing the diameter of inhibition halos measured with the aid of a halometer. Were considered present antibacterial activities of therapy with diameter of inhibition halos greater than or equal to 8mm. Observed antibacterial effects of PDT for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with the presence of inhibition halos with an average of 12mm, as well as for the individual use of methylene blue dye. For *Pseudomonas aeruginosa* was not observed anyantibacterial effect as well as for the individual use of low power laser.

**KEYWORDS:** bacteria / radiation effects; laser therapy low level intensity; microbiology; photodynamic therapy

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 –</b>	Fotossensibilizantes (Fenotiazínicos) utilizados de acordo com o comprimento de onda compatível	28
<b>TABELA 2 –</b>	Identificação dos grupos experimentais e procedimentos executados	40
<b>TABELA 3 –</b>	Identificação dos subgrupos para utilização do LBP isolado para cada cepa bacteriana	41
<b>TABELA 4 –</b>	Avaliação do efeito antibacteriano <i>IN VITRO</i> da terapia fotodinâmica do laser em associação com o azul de metileno frente a cepas padrão ATCC	47
<b>TABELA 5 –</b>	Análise do halo médio de inibição (mm) utilizando a terapia fotodinâmica de acordo com a bactéria e concentração do corante utilizado no estudo	48
<b>TABELA 6 –</b>	Avaliação <i>IN VITRO</i> da ação do laser de baixa potência sobre crescimento microbiano	49
<b>TABELA 7 –</b>	Avaliação do efeito antibacteriano <i>IN VITRO</i> do uso isolado do azul de metileno frente a cepas padrão ATCC	51
<b>TABELA 8 -</b>	Análise do halo médio de inibição (mm) utilizando isoladamente o azul de metileno de acordo com a concentração, a bactéria utilizado no estudo	52

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 –</b>	Estrutura química dos compostos fenotiazínicos	28
<b>FIGURA 2 –</b>	Estrutura química do azul de metileno caracterizando a carga positiva (o cátion)	29
<b>FIGURA 3 –</b>	A: Placa de petri sendo preenchida pelo meio de cultura B: Placa de petri com o meio de cultura pronta para receber o micro-organismo	43
<b>FIGURA 4 –</b>	Semeio pela técnica de estrias, em placas de Agar Sangue e Agar Mueller-Hinton. Após, as placas foram incubadas a 37°C/24 horas	43
<b>FIGURA 5 –</b>	Discos de papel de filtro estéreis Cecon® com 6 mm de diâmetro	43
<b>FIGURA 6 –</b>	Discos de papel de filtro estéreis Cecon® com 6 mm de diâmetro	43
<b>FIGURA 7 –</b>	Esquema para aplicação do Laser de Baixa Potência em placa de Petri	44
<b>FIGURA 8 –</b>	Equipamento Laser de Baixa Potência utilizado	45
<b>FIGURA 9 –</b>	A: Figura mostrando placas de Petri com discos estéreis nos centros B: halos de inibições prontos para serem medidos com o halômetro	45
<b>FIGURA 10 –</b>	Evidenciação dos halos de inibição de crescimento formados em placa de Petri sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 após TFD a laser (660nm/320J/cm <sup>2</sup> ).	47
<b>FIGURA 11–</b>	Evidenciação dos halos de inibição de crescimento formados em placa de Petri sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 após o uso isolado do azul de metileno à 50 µg/ml.	51

## LISTA DE SIGLAS

AM – Azul de metileno

AsGaAl – Arseneto de gálio e alumínio

AGNB – Bacilos Aeróbios Gram-negativos

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Trifosfato de Adenosina

BHI – Brain heart infusion

Ca(OH)<sub>2</sub> – Hidróxido de cálcio

DNA – Ácido desoxirribonucléio

FS – Fotossensibilizador

FSs – Fotossensibilizadores

LBP – Laser de baixa potência

µg/ml – Micrograma por mililitro

He-Ne – Hélio-Neônio

Hz – Hertz

InGaAlP – Índio Gálio Alumínio e Fósforo

J – Joules

J/cm<sup>2</sup> – Joules por centímetro quadrado

LED – light emitting diode

mW – MiliWatt

mM – Milimolar

ml – mililitro

N/cm – Newton por centímetro

Nd:YAG – Neodímio dopado com ítrio granada de alumínio

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NiTi – Níquel-Titânio

nm – Nanômetro

Pg – *Porphyromonas gingivalis*

PQM – Preparo químico-mecânico

TBO – Azul de toluidina

UFC – Unidades formadoras de colônias

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

W – Watt

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 Microbiologia Oral .....	17
2.2 Bactérias .....	18
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
2.3 Laser .....	21
2.3.1 Considerações Gerais .....	21
2.3.2 Interação Laser e células.....	22
2.3.3 A terapêutica do laser .....	23
2.4 Terapia Fotodinâmica.....	25
2.4.1 Considerações Gerais .....	25
2.4.2. Os Fotossensibilizantes .....	26
2.4.2.1 Os Fenotiazínicos .....	27
2.4.2.1.1 O azul de metileno .....	28
2.4.3 Reação fotodinâmica .....	29
2.5 Estudos envolvendo Terapia Fotodinâmica e Laser de baixa potência.....	31
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
3.1. Objetivo Geral .....	36
3.2 Objetivos específicos .....	36
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	37
4.1 Caracterização do estudo.....	37
4.2 Local de Pesquisa .....	37
4.3 Linhagens Microbianas.....	37
4.4 Meios de cultura .....	37
4.5 Reativação de Cepas .....	37
4.6 Cultivo dos micro-organismos .....	38
4.7 Inóculo bacteriano .....	38
4.8 Determinação da Atividade Antimicrobiana .....	38

4.9 Terapia Fotodinâmica.....	39
4.9.1 Técnica.....	39
4.9.2 Equipamento Laser.....	39
4.9.3 Divisão e descrição dos grupos .....	40
4.10 Leitura das placas .....	42
4.11 Análise estatística e avaliação .....	42
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1 Efeito Biológico <i>in vitro</i> da terapia fotodinâmica sobre cepas bacterianas.....	46
5.2 Efeito biológico <i>in vitro</i> do laser de baixa potência sobre cepas bacterianas..	49
5.3 Efeito biológico do uso isolado azul de metileno sobre cepas bacterianas....	50
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Biofilme microbiano é definido como uma associação de células microbianas, fixadas a superfícies, bióticas ou abióticas, envolta por uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas. Os biofilmes representam mais de 90% dos contaminantes existentes em sistemas aquosos, industriais, clínicos e ambientais (LUCCHESI, 2006).

O biofilme dental ou placa bacteriana é fator determinante da cárie e da doença periodontal, justificando, desta maneira, a utilização de medidas para o seu controle. A formação do biofilme dental ocorre através de um processo ordenado e dinâmico onde há necessidade da fixação e proliferação de bactérias sobre as superfícies dos dentes (PEREIRA et al., 2010).

A remoção do biofilme dental é um fator importante na prevenção da cárie e da doença periodontal. Diante às limitações dos métodos mecânicos de higiene, agentes antimicrobianos têm sido estudados e utilizados no controle do biofilme buscando reduzir a microbiota cariogênica (JARDIM; JARDIM, 1998).

O controle químico do biofilme auxilia a remoção mecânica, prevenindo a instalação da cárie e de doenças gengivais, que estão intimamente relacionadas à sua presença. A clorexidina é um potente agente antimicrobiano, capaz de inibir o desenvolvimento dos micro-organismos presentes no biofilme, porém apresenta efeitos adversos locais quando utilizada por tempo prolongado, como manchamento de dentes e língua, acúmulo de cálculo dentário, alteração do paladar e descamação das mucosa oral. Outros ativos, como os anti-inflamatórios e anti-sépticos, também vêm sendo utilizados amplamente para afecções da mucosa oral (MORAN; ADDY; ROBERTS, 1992).

Os micro-organismos pioneiros na colonização da película adquirida são os estreptococos (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*) e, em proporções menores, *Neisseria* e *Actinomyces*. A doença cárie apresenta como principais agentes etiológicos o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*. Esses agentes são constituintes do biofilme dental, uma estrutura formada sobre superfícies duras a partir do metabolismo da sacarose que confere propriedades de adesão e agregação microbiana, provocando as lesões de cárie devido à desmineralização do esmalte dentário (ALMEIDA et al., 2002, GE et al., 2008).

Nos últimos anos, a mudança do padrão de doenças infecciosas e o surgimento de antibióticos e cepas bacterianas antibioticorresistentes tornaram necessário encontrar novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas (TAYLOR; STAPLETON; LUZIO, 2002). Tornando-se importante então estudos sobre a terapia fotodinâmica como nova alternativa para tais tratamentos. Pele ou mucosas acessíveis são os principais sítios de infecção de micro-organismos patogênicos, sendo assim candidatos à destruição fotodinâmica (CONTAG, 2002; HAMBLIN; O DONNELL; MURTHY, 2002, HAMBLIM; ZAHRA; ORENSTEIN *et al.*, 1998, WOOD *et al.*, 1999).

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste na associação de um agente fotossensibilizante, normalmente exógeno, e uma fonte de luz, com o objetivo de provocar a morte microbiana. A TFD representa um complexo sistema de fototerapia que necessita da presença de três fatores que interagem concomitantemente: corante (agente fotossensibilizador), uma fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nem o fotossensibilizador, nem a luz tem a capacidade de produzir efeito deletério ao sistema biológico alvo (WAINWRIGHT, 1998).

Segundo Wilson *et al.*, (1995) a terapia fotodinâmica surgiu como um tratamento alternativo ao uso de agentes antimicrobianos tradicionais. A utilização de um fotossensibilizador que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante para produzir efeito antimicrobiano. Os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem proporcionar danos tóxicos ao hospedeiro (WILSON *et al.*, 1992). Assim, se células desprovidas de componentes fotossensíveis à luz forem coradas com fotossensibilizadores ou agentes cromóforos exógenos como o azul de metileno, azul de toluidina, eosina e hamatoporfirinas tornam-se susceptíveis à terapia (WILSON, 1993)

De acordo com Wilson (2004) a terapia fotodinâmica apresenta algumas vantagens em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais, incluindo o fato de que a morte da célula bacteriana pode ser mais rápida, não sendo necessário a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo, como ocorre com os agentes antissépticos e antibióticos. Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos improvável. A luz ou o fotossensibilizador sozinhos não apresentam efeitos significativos sobre a

viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica. Poucos são os estudos que avaliam a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes cariogênicos (O'NEILL et al.,2002).

O laser por se tratar de uma luz diferenciada vem sendo utilizado em várias pesquisas como componente para a terapia fotodinâmica através de comprimentos de onda específicos para cada corante ou com o seu uso individualizado através dos tipos de laser, baixa e alta potência.

O laser de baixa potencia é usado largamente pelo seu efeito fotobiomodulador, atuando com ações anti-inflamatória e reparadora tecidual. Porém, o uso isolado do laser diodo, *in vitro*, em bactérias tem o mecanismo de ação ainda obscuro e com poucos resultados satisfatórios.

Postula-se que o efeito bactericida da laserterapia pode ser direto na membrana bacteriana devido à absorção de fótons por cromóforos endógenos com concomitante produção de moléculas altamente reativas e citotóxicas, que provocam a ruptura da membrana e morte (KARU, 1999).

Diante do exposto, este estudo avaliou *in vitro* o efeito antibacteriano da terapia fotodinâmica a laser com azul de metileno em diferentes bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microbiologia Oral

Os micro-organismos estão em todos os lugares, mas o ambiente os seleciona. Na cavidade oral existem aproximadamente  $10^{10}$  bactérias (MIMS et al., 1995) consistindo de mais de 700 diferentes espécies de micro-organismos (AAS et al., 2005), os quais buscam por um nicho e nutrição.

A cavidade oral do homem possui uma microbiota bastante complexa constituída por bactérias, leveduras, protozoários e alguns vírus (LOESCHE, 1997, MARSH; MARTIN, 1999). Na microbiota oral predominam as bactérias anaeróbias ou anaeróbias facultativas, dos gêneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Micrococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Leptotriquia* (MOREIRA et al., 2003).

O aparecimento de doenças orais depende essencialmente da presença dos micro-organismos, que durante o metabolismo dos carboidratos formam ácidos e produtos metabólicos (SVENSSATER et al., 2003). Esse processo só ocorre quando há um desequilíbrio no ecossistema oral. Atualmente os estudos na área odontológica têm sido norteados pela valorização de aspectos preventivos, visando uma manutenção da saúde oral (BEVILACQUA et al., 2007).

Biofilmes microbianos são compostos por micro-organismos que aderem tanto entre si quanto a superfícies, envoltos em uma matriz extracelular de polímeros, com canais de água e nutrientes. A presença de micro-organismos patogênicos nos biofilmes orais pode levar ao desenvolvimento da doença cárie. (DUARTE et al., 2006) e doença periodontal (HANNULA et al., 2001).

O biofilme envelhece através do crescimento das espécies aderidas e por colonização e crescimento de espécies adicionais. Nesta sucessão ecológica do biofilme, existe uma transição do meio ambiente aeróbico inicial, caracterizado por espécies gram-positivas facultativas para um meio ambiente privado de oxigênio, no qual os micro-organismos gram-negativos anaeróbicos predominam (KOLENBRANDER; LONDON, 1993).

Devido a sua conduta contínua de agressão, o biofilme dental, em cada etapa do seu desenvolvimento, vai adquirindo novas espécies, incluindo *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*,

*Lactobacillus casei*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, que com suas patogenicidades irão provocar danos ao esmalte e ao tecido gengival (ALVES et al., 2008).

## **2.2 Bactérias**

O século passado é marcado pelo tratamento de infecções com a utilização dos antibióticos. Estes são produzidos em larga escala devido às intensas mutações das bactérias patogênicas (HAMBLIN; HASAN, 2004). Assim, a multiplicação microbiana pode levar ao fim da era dos antibióticos, incentivando os pesquisadores a encontrarem novas técnicas antimicrobianas capazes de não permitir o desenvolvimento de resistência bacteriana (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004, MAISCH et al., 2005).

A laserterapia e a TFD são propostas alternativas de técnicas antimicrobianas. Para Maisch et al. (2005) em relação à inativação bacteriana, as bactérias gram-positivas são mais susceptíveis a estas terapias do que as gram-negativas, que são mais resistentes.

A maior resistência é justificada por estruturalmente as bactérias gram-negativas possuírem um arcabouço mais complexo, incluindo uma estrutura externa com duas camadas lipídicas, funcionando como barreira física e funcional entre célula e ambiente, ao contrário da bactéria gram-positiva, que apresenta apenas uma membrana relativamente permeável (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

### **2.2.1 Pseudomonas aeruginosa**

*Pseudomonas aeruginosa*, bactéria da família *Pseudomonadaceae*, caracteriza-se como bastonete reto ou ligeiramente curvo, Gram-negativo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (POLLACK, 1995).

Esta bactéria pode colonizar vários tecidos, devido principalmente à presença de fímbria e à cápsula mucoide (alginato). Tal cápsula possibilita aderência à superfície da mucosa normal, é antifagocitária e permite também a formação de microcolônias, denominadas biofilme, que são fortemente aderidas e recobertas por

um material espesso, constituído pelo próprio alginato, lipopolissacarídeo e proteína (ABDI-ALI; MOHAMMADI-MEHR; ALAEI, 2006). Em sua maioria, os biofilmes estão presentes em próteses vasculares, articulares, cateteres, drenos e nos pulmões de indivíduos acometidos por fibrose cística (DONLAN, 2002).

Gosney et al. (1999) relataram que a colonização oral por bacilos aeróbios Gram-negativos (AGNB) não é normal e indica geralmente um estado imunológico debilitado do hospedeiro, além de terem postulado que a colonização oral de um indivíduo por AGNB pode indicar uma grave infecção sistêmica.

A cavidade oral pode ser um reservatório de *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente em pacientes com periodontite, o que dificulta o tratamento e, em caso de infecções oportunistas, pode comprometer pacientes debilitados, como idosos e imunossuprimidos (BACT et al., 2006, SANTOS et al., 2002). Nas infecções endodônticas assintomáticas, a microbiota constitui-se predominantemente de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (GOMES; LILLEY; DRUCKER, 1996).

Relatos de redução da suscetibilidade da *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos vêm sendo publicados no Brasil e em outros países, destacando-se a diminuição de sensibilidade aos antibióticos de maior espectro de ação, como os carbapenêmicos e as cefalosporinas antipseudomonas, que são as principais opções terapêuticas (ANDRADE et al., 2003, VAN ELDERE, 2003).

### 2.2.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), a maioria pertencente à microbiota intestinal, tanto de seres humanos quanto de animais de sangue quente. No entanto, aproximadamente, 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e infecções extra-intestinais (JOHNSON; RUSSO, 2005, RUSSO; JOHNSON, 2000).

A *Escherichia coli*, um microrganismo ubíquo, é o mais frequente entre os micro-organismos isolados no meio hospitalar (CROWLEY, 1986, DIEKEMA et al., 1999) sendo também o mais proeminente agente etiológico das infecções urinárias, das septicemias e das meningites bacterianas nos neonatos (VASQUEZ et al., 1992, REACHER, 2000, FOXMAN, 2002, KAHLMETER, 2003). Alguns estudos apontam-na como uma das bactérias mais isoladas nas infecções cirúrgicas (BROOK; FRAZIER, 1999).

Atualmente existem evidências que reforçam a apreensão sobre o aumento da capacidade da resistência da *Escherichia coli* aos agentes tradicionalmente usados nas afecções por ela causada, bem como, a existência de diferenças geográficas e temporais da sua taxa de prevalência da resistência aos antibióticos (COLLIGNON, 2002, GARAU et al., 1999; KENNEDY; ROBERTS; COLLIGNON, 2008; OTEO et al., 2005, PITOUT; LAUPLANS, 2008, WANG; CHEN, 2005, ZAIDI; MCDERMOTT; TOLLEFSON, 2008).

### **2.2.3 *Staphylococcus aureus***

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica (coccus), Gram-positiva, que aparece, no exame microscópico, aos pares, em cadeias curtas ou em cachos similares aos da uva ou em grupos. Algumas cepas produzem uma toxina protéica altamente termo-estável que causa doença em humanos. Tal toxina é produto da multiplicação da bactéria nos alimentos deixados em temperaturas inadequadas (BENENSON, 1995).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes de infecções nosocomiais e principal causador de infecção cirúrgica em todo o mundo (TAKAHASSHI; TANAKA; ASHIKI, 1990). A infecção cirúrgica é causada por micro-organismos de origens endógena e exógena. Quando endógena, aproximadamente 25% destes correspondem a seres aeróbios, predominando *Streptococcus viridans*, e 75% a anaeróbios. Quando exógena, predominam os *Staphylococcus* e os bacilos aeróbios Gram-negativos. As fontes desses últimos são instrumental cirúrgico ou de manipulação, ambiente hospitalar e corpo clínico (WANNMACHER, 1999).

Estes micro-organismos estão presentes na pele humana, narinas e mucosas como um patógeno oportunista capaz de infectar, invadir, persistir e se replicar em muitos tecidos humanos (BAE et al., 2004). Esta bactéria era sensível à penicilina quando foi introduzido nos estudos por volta de 1940, mas desenvolveu resistência quase que imediatamente como resultado da aquisição de *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactamases capazes de inativar o anel de  $\beta$ -lactâmicos (BASS et al., 2002).

Os antibióticos lactamaserresistentes (metecilina, oxacilina) permaneceram em vigor até o início dos anos da década de 60 (COLLIGNON, 2002, DIEKEMA et al., 2002) quando os *Staphylococcus aureus* adquiriram um novo gene modificando a ligação penicilina-proteína (FALCAO, 1999, GRISOLD et al., 2002, ROSATO et al.,

2003, THORNSBERRY, 1988, WILDERS et al., 2002) tornando-os resistentes à penicilina e aos seus derivados semi-sintéticos, além de uma resistência a uma variedade de antimicrobianos (BLUMBERG et al., 1991, BREN, 2002, GRISOLD et al., 2002, MUSSER; KAPUR, 1992, HU et al., 2002).

A multirresistência de *Staphylococcus aureus* o torna o mais notório de todos os patógenos bacterianos associados com humanos (BAE et al., 2004).

As espécies de *Staphylococcus* não são consideradas residentes da microbiota oral humana, quando presentes, encontram-se em números reduzidos e são considerados como parte da microbiota transitória; entretanto, em indivíduos submetidos à medicação sistêmica prolongada de antimicrobianos e imunossupressores, podem atuar como patógenos oportunistas (VAN WINKELHOFF; RAMS; SLOTS, 1996).

## **2.3 Laser**

### **2.3.1 Considerações Gerais**

Sem dúvida, um dos grandes avanços na área médica, mais precisamente no século XX, foi o desenvolvimento dos aparelhos de laser. A aplicação dos diferentes tipos de lasers possibilitou uma grande alteração nos procedimentos médicos e odontológicos, pois proporcionou uma grande redução no tempo de duração das cirurgias, no tempo de recuperação dos pacientes, nas complicações pós-operatórias, de edemas, facilitando a bioestimulação dos tecidos moles, atualmente conhecida como biorregulação, bem como um maior controle e domínio das dores crônicas (PÉCORA; BRUGNERA JÚNIOR, 1999).

Laser é o acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão de radiação estimulada). É uma forma de energia que se transforma em energia luminosa, visível ou não, dependendo da matéria que produz esse tipo de radiação (GENOVESE, 2000).

Todo o equipamento laser possui três elementos essenciais: (1) o meio laser (meio ativo), que pode ser de Dióxido de Carbono, de Argônio, de Hélio-Neônio, de YAG, de Exímeros, de Corantes, de Rubi e de Diodos semi-condutores, como o de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), Índio Gálio Alumínio e Fósforo (InGaAlP) entre outros, (2) a fonte de excitação, que pode ser uma lâmpada de *flash* ou um

arco elétrico, que elevará as moléculas ou átomos do meio de irradiação laser do estado de repouso até um estado de excitação, cujo retorno ao estado de repouso gera a emissão espontânea de um fóton e, por fim, (3) dois espelhos, situados nas extremidades de uma câmara ressonante que refletem a luz emitida de volta às moléculas ou átomos do meio laser (RENISCH, 1996).

Dessa maneira, o funcionamento desses três elementos gera uma emissão de luz que ao incidir sobre outras moléculas ou átomos do meio, acaba por elevar ao estado de excitação novos elétrons que estavam em órbitas menores, que, por sua vez, ao retornarem ao estado de repouso, liberam novos fótons, ou seja, novas ondas de luz, que incidirão sobre outros átomos em repouso, formando uma reação em cadeia (RENISCH, 1996).

### **2.3.2 Interação Laser e células**

O entendimento da interação entre os lasers e as células, baseia-se principalmente no entendimento das reações que podem ser induzidas nestes tecidos pela luz laser. Cada tipo de laser resulta em luz de comprimento de onda específico que reage de uma maneira diferente com cada tecido. Outro fator importante é a densidade de energia, que é a quantidade de energia por unidade de área entregue aos tecidos. Temos também que considerar os fatores temporais, tais como: a forma de emissão de luz (contínua ou pulsátil), a taxa de repetição e a largura do pulso, para lasers de emissão pulsátil (CATÃO, 2004, CHAVANTE, 2009).

A radiação laser interage com a matéria viva através dos processos ópticos de reflexão, transmissão, espalhamento e absorção. Ou seja, ao incidir em uma célula ou tecido biológico, parte da luz não penetra, sendo refletida. A porção de luz que penetra será dividida em uma parte que será absorvida, outra será espalhada e outra transmitida. Quando a luz é absorvida, a energia entregue irá provocar efeitos: fotoquímicos, térmicos, por fotoablação, e ainda fotomecânicos (YOSHIYASU, 2001).

A energia absorvida é medida em Joules por centímetro quadrado ( $J/cm^2$ ) e é conhecida como densidade de energia ou fluência. A absorção da luz do laser depende da quantidade de cromóforo presente no tecido e se o comprimento de onda utilizado corresponde às características de absorção daquele cromóforo.

O efeito fototérmico ocorre quando o cromóforo absorve a energia com o comprimento de onda correspondente e a energia luminosa se converte em calor capaz de destruir o alvo atingido. No efeito fotoquímico ocorre uma reação química após a absorção da luz por agentes fotossensibilizantes (endógenos ou exógenos) sendo o princípio básico da terapia fotodinâmica. A expansão térmica pode ocorrer de forma extremamente rápida, capaz de produzir ondas acústicas e destruição fotomecânica do tecido que a absorveu (MORIYAMA, 2006, YOSHIYASU, 2001).

A profundidade de penetração da energia do laser nos tecidos depende da absorção e da dispersão. A dispersão da energia do laser é inversamente proporcional ao comprimento de onda. E quanto maior o comprimento de onda mais profunda é a penetração da energia do laser. Comprimentos de onda entre 300 a 400 nm dispersam mais e penetram menos. Comprimentos de onda entre 1000 e 1200 nm dispersam menos e penetram mais. Entretanto, energias com comprimento de onda na faixa de infravermelho médio e superior do espectro eletromagnético são absorvidas superficialmente já que o principal cromóforo deste comprimento de onda é a água presente no tecido (MORIYAMA, 2006)

### **2.3.3 A terapêutica do Laser**

A propriedade terapêutica dos lasers vem sendo estudada desde a sua descoberta por Einstein, em 1917, com a Teoria da Emissão Estimulada e, em 1960, Mainman converteu essa teoria em realidade (GENOVESE, 2000).

Theodore Mainman, um cientista americano, construiu o primeiro laser, o qual foi desenvolvido a partir de uma barra de rubi sintético, que produzia um raio laser quando uma luz comum intensa incidia sobre a mesma. No ano seguinte, muitas novidades surgiram, pois Javan, Bennett e Herriot apresentaram o laser de He-Ne (Hélio e Neônio), Johnson desenvolveu o laser de Nd:YAG (cirúrgico). Posteriormente, em 1964, Patel et al. apresentaram o laser de Dióxido de Carbono (ALMEIDA-LOPES; MASSINI, 2000, LOPES; EDUARDO, 1999).

Segundo relatos de Lopes e Eduardo (1999), o primeiro trabalho de laser na odontologia foi realizado por Stern e Sognnaes, em 1964, utilizando o laser rubi para vaporização do esmalte e da dentina. Eles aplicaram em tecidos dentários "*in vitro*" e observaram que esse tipo de laser formava cratera e fusão de esmalte e dentina. A dentina exposta ao laser de rubi apresentava crateras e queima de tecido. As

alterações de temperatura nos tecidos irradiados chamaram a atenção dos estudiosos para a necessidade de se desenvolver mais pesquisas sobre o assunto.

A primeira aplicação de laser de rubi em dentes "*in vivo*" foi realizada por Goldman (1965) e, sendo ele médico, aplicou o laser em um dente de seu irmão, cirurgião-dentista relatando que o mesmo não sentiu dor durante e depois o ato operatório (BRUGNERA-JUNIOR, PINHEIRO, 1998).

O aumento da resistência das bactérias às drogas antibióticas gera a necessidade de desenvolver novos meios bacteriostáticos e bactericidas que colaborem com a terapêutica de indivíduos infectados (BENVINDO, et al., 2008).

Diversos estudos são realizados para determinação do efeito do laser de baixa potência sobre o crescimento de micro-organismos. Analisando o espectro de absorção dessas células em um estado de monocamada, tem-se demonstrado que as moléculas da cadeia respiratória, mais precisamente na membrana, são os fotorreceptores primários, que estão na faixa visível e infravermelho (VO-DINH, 2003). Estes fotorreceptores incluem o citocromo oxidase para luz vermelha e infravermelha (TIPHLOVA; KARU, 1999) e as flavoproteínas para luz violeta e faixa azul (KARU, 1988).

Dentre as diferentes hipóteses para descrever o mecanismo principal das reações do crescimento bacteriano, após a absorção de luz por fotorreceptores, as mais importantes são: 1. Mudança de redox, hipótese mais aceita, proposta em 1988, em que a excitação de certos cromóforos em moléculas fotorreceptoras afeta os estados redox desses agentes e, assim, a taxa de transferência de elétrons na cadeia respiratória (KARU, 1988). Este processo acelera a síntese de ATP (KARU et al., 1998). 2. Produção de oxigênio singleto, proposta em 1981 (KARU; KALENDO; LETOKHOV, 1981). Nesta hipótese quando há absorção de luz, determinadas porfirinas ou flavoproteínas são convertidas em fotossensibilizadores naturais (GIESE et al., 1980) e no momento em que essas moléculas absorvem a luminosidade, este mecanismo pode ser responsável pela produção de oxigênio singleto (KARU et al., 1982).

## 2.4 Terapia Fotodinâmica

### 2.4.1 Considerações Gerais

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento médico que utiliza luz para ativar um agente fotossensibilizador (corante) na presença do oxigênio. Esta reação resulta na formação de espécies de oxigênio, como o oxigênio singleto, e radicais livres, causando danos e morte celular (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

O termo “terapia fotodinâmica” é relativamente novo, mas a modalidade de tratamento que combina a administração da droga e subsequente exposição à luz solar é antiga. Existem relatos do uso de combinação de plantas ou extratos ingeridos oralmente e a luz do sol para tratar doenças de pele como vitiligo e psoríase com sucesso na Índia, Egito e China há 4000 anos (OCHSNER, 1997, SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A primeira demonstração de fotossensibilização letal de células data de 1900, quando Raab verificou que baixas concentrações de acridina que, no escuro, não possuíam efeito sobre o *Paramecium*, podiam sob exposição à luz normal do dia, determinar a inativação do microrganismo (KESSEL, 2004).

Von Tappeiner e Albert Jesoniek, em 1903, realizaram o tratamento de carcinomas com aplicação de solução de eosina a 5% por via tópica e posterior exposição a lâmpadas ou a luz do sol (FREEDBERG; EISEN; WOLFF, 2003). E, no mesmo ano, publicaram um curto, mas notável artigo sobre o tratamento de herpes, psoríase e câncer de pele por aplicação tópica de eosina e subsequente exposição à luz do Sol. Von Tappeiner e seus colegas biomédicos afirmaram que essas reações eram altamente dinâmicas e diferiam da fotossensibilização de chapas fotográficas por certos corantes. Então o termo *Photodynamische Wirkung* (efeito fotodinâmico) foi cunhado, por Von Tappeiner e Jodlbauer, para todas as reações fotobiológicas envolvendo um fotossensibilizador que ocorrem na presença de oxigênio molecular e levam à destruição de tecidos (BONNET, 1995, OCHSNER, 1997, PERVAIZ, 2001, TRIESSCHEIJN; BASS; SCHELLENS, 2004).

A TFD parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com uma substância fotossensível e oxigênio resultam em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células visando a destruição localizada do tecido vivo anormal mediante sua necrose, assim como também a

desativação de vírus, destruição de bactérias e fungos. Esta terapia consiste na associação de um fotossensibilizador a uma fonte de luz visível, com o objetivo de provocar inativação microbiana (GARCEZ et al., 2003).

#### **2.4.2 Os Fotossensibilizadores**

Uma substância fotossensibilizadora funciona como um agente de absorção óptico. No ato da irradiação, o corante, substância fotossensibilizadora, tem suas moléculas convertidas em estado de excitação e nesse estado, a energia transferida da fonte para moléculas do corante resulta na formação de moléculas reativas como o oxigênio singleto que podem danificar e ainda matar células bacterianas (DOBSON; WILSON, 1992)

O uso da TFD se concentra em compostos ou substâncias que apresentem as seguintes características (BONNET, 1995):

- Baixa toxicidade (no escuro) causando danos às células apenas sob irradiação;
- Absorção na região com  $\lambda > 630$  nm, preferencialmente  $\lambda > 680$  nm, propriedade requerida para a penetração da luz em células e o número de fótons absorvidos, uma vez que o fluxo de luz absorvido diminui exponencialmente com a distância;
- Estabilidade in vivo limitada para rápida eliminação dos tecidos tumorais;
- O fotossensibilizador deve ser cineticamente e termodinamicamente estável para conferir um tempo de estocagem adequado;
- Rota sintética curta, conveniente e com alto rendimento;
- Permitir derivações para otimização das propriedades;
- Fluorescência característica que permite a localização;

- Composição química bem definida;
- Agregação seletiva à célula ou tecido;
- Não causar mutagenicidade ou carcinogenicidade.

Fazendo parte da primeira geração de fotossensibilizadores tem-se o photofrin (utilizado na prática clínica), constituído de derivados oligoméricos de hamatoporfirinas, uma composição complexa que dificultou a reprodução da sua síntese.

Na segunda geração foram desenvolvidas substâncias simples como as principais famílias de corantes mais utilizadas na TFD, incluindo as porfirinas, as ftalocianinas, cianinas e as fenotiazinas.

Atualmente, os fotossensibilizantes têm um mecanismo com ligação a anticorpos, estando em fase inicial de desenvolvimento.

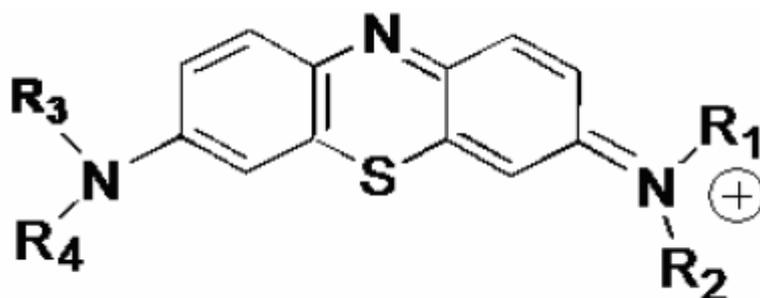
Lisossomos, mitocôndrias e membranas plasmáticas, em células de mamíferos, são os principais alvos para TFD, enquanto em células microbianas, o dano à membrana externa desempenha um papel importante, pois pode impedir o dano ao DNA (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

#### **2.4.2.1 Os Fenotiazínicos**

Os corantes fenotiazínicos são substâncias azuis que possuem um espectro de ação entre 620 e 660nm e os seus primeiros relatos ocorreram nos anos trinta do século passado (WAINWRIGHT, 1998). Autores como Walsh (1997), Wilson, Dobson e Harvey (1992) afirmaram, em seus trabalhos, que estes sensibilizadores são potentes para certos micro-organismos e para emissão de laser na faixa vermelha do espectro visível.

Segundo Wainwright (1998), os fenotiazínicos se apresentam com uma estrutura linear com grupos heteroaromáticos tricíclicos, permitindo se intercalarem com os ácidos nucleicos das células submetidas à sensibilização (Figura 1). Na odontologia, esta classe de fotossensibilizantes é a mais usada e nela estão incluídos os corantes azul de metileno e azul de toluidina (GARCEZ et al., 2003).

Estes corantes têm sido utilizados em pesquisas com ação antifúngica e antibacteriana, inativando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



**Figura 1:** Estrutura química dos compostos fenotiazínicos. O que diferencia os tipos de fenotiazianas são os grupos R .

Fotossensibilizantes	Comprimento de onda compatível (nm)
Azul de metileno	660
Azul de toluidina	625

**Tabela 1:** Fotossensibilizantes (Fenotiazínicos) utilizados de acordo com o comprimento de onda compatível

#### 2.4.2.1.1 O azul de metileno

Descoberto por Heinrich Caro em 1876, o azul de metileno é um corante orgânico redox fenotiazínico que inicialmente era reconhecido como indicador de oxidorredução e como corante citológico. Por possuir propriedades fotoquímicas importantes, este fotossensibilizante é utilizado para inativação de bactérias (SCOTTI et al., 2006).

Sua fórmula química (figura 2) possui carga positiva, o cátion, justificando a atração ou afinidade especial por alguns sítios celulares com cargas negativas, como as mitocôndrias e ácidos nucleicos. Há uma fácil redução nos sistemas biológicos deixando sua atividade antibacteriana baixa. Entretanto, foi relatado que a metilação cromofórica deste azul de metileno diminui a tendência à redução.

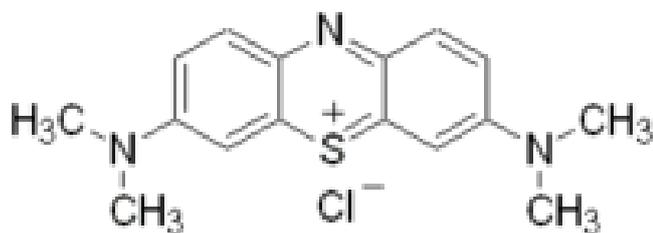


Figura 2 : Estrutura química do azul de metileno caracterizando a carga positiva (o cátion).

A reação mais comum no uso de fotossensibilizadores é que estas moléculas, depois da passagem para um estado tripleto, podem reagir com o oxigênio para produzir oxigênio singleto ou com outras moléculas, exceto o oxigênio, para produzir óxido de hidrogênio ou ânions superóxido (DADRAS et al., 2006). Todos estes produtos são tóxicos e levam à destruição das células (NIEMZ, 2002). A semelhança entre os espectros emitidos (de ação) e de absorção do DNA e RNA favorece o transporte do efeito dessa irradiação da cadeia respiratória para a nucleóide (VON-DINH, 2003).

### 2.4.3 Reação fotodinâmica

A reação fotodinâmica envolve três componentes: a luz, um fotossensibilizador e o oxigênio. Após a irradiação com luz de um comprimento de onda específico, o fotossensibilizador passa por uma transição de uma energia de baixo nível, de estado fundamental para um estado singleto excitado. Posteriormente, o fotossensibilizador pode voltar para seu estado fundamental, com emissão de fluorescência, ou pode sofrer uma transição para o estado de nível de energia mais alto, o estado tripleto. Neste estado, pode ocorrer uma reação do oxigênio endógeno produzindo o oxigênio singleto e outras espécies de radicais livres, causando uma rápida destruição seletiva do tecido alvo.

Existem dois mecanismos pelos quais o fotossensibilizador no estado tripleto pode reagir com biomoléculas. O Tipo I envolve transferência de elétrons/hidrogênio

diretamente do fotossensibilizador, produzindo íons ou elétrons/hidrogênio removidos de uma molécula de substrato para formar os radicais livres. Estes radicais reagem rapidamente com o oxigênio, resultando na produção de espécies de oxigênio altamente reativas (superóxido, hidroxila radicais, peróxido de hidrogênio). As reações do tipo II produzem o estado eletronicamente excitado e altamente reativas de oxigênio conhecido como o oxigênio singlete. Na TFD é difícil distinguir os dois mecanismos de reação. A contribuição de ambos os tipos indica que o mecanismo de dano é dependente tanto da tensão de oxigênio quanto da concentração do fotossensibilizador (KONOPKA, GOSLINSKI,2007).

Há vários fatores influenciando a TFD, incluindo o tipo, dose, tempo de incubação e localização do fotossensibilizador, a disponibilidade de oxigênio, o comprimento de onda luz (nm), a densidade de potência de luz ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) e a fluência de energia luminosa ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Uma importante característica da terapia fotodinâmica é a sua inerente seletividade dupla, primeiro por alcançar uma maior concentração do fotossensibilizador através da ligação específica ao tecido-alvo e segundo por concentrar o irradiação para um volume específico. Em atividade antibacteriana, especificamente a terapia fotodinâmica, a fotodestruição é causada principalmente por dano à membrana citoplasmática e ao DNA (BETOLONI et al., 2000, ROMANOVA et al., 2003, SCHAFFER; SCHMITZ; HORNECK, 1998).

A ação antimicrobiana dos lasers de baixa potência só começou a ser efetivamente estudada na última década, quando a terapia fotodinâmica inicialmente idealizada para o tratamento do câncer foi trazida para a odontologia.

Enquanto no tratamento do câncer, o alvo da TFD é promover a morte seletiva das células tumorais, no caso da odontologia surge uma nova perspectiva para a utilização da terapia fotodinâmica, tendo como alvo as células bacterianas envolvidas no desenvolvimento das lesões de cárie e da doença periodontal (ZANIN et al., 2003).

Os lasers são os sistemas ópticos mais indicados para a fotossensibilização, devido a suas propriedades de monocromaticidade, coerência e alta intensidade. Além disso, a luz de laser pode ser aplicada em regiões de difícil acesso, por meio de fibras.

Semelhante às células tumorais, a maioria das bactérias orais não absorve a luz visível, portanto, a utilização de um cromóforo (nesse caso conhecido como

fotossensibilizador) que se fixe à parede bacteriana atraindo para si a luz laser no momento da irradiação, é essencial para que os lasers de baixa potência tenham ação antimicrobiana sobre bactérias orais (WILSON, 1993).

## 2.5 Estudos envolvendo TFD e LBP

Os primeiros estudos da TFD em bactérias orais foram realizados por Wilson, Dobson e Harvey (1992), sendo que naquela época o principal interesse dos autores era descobrir os mais efetivos fotossensibilizadores na TFD. Assim, avaliaram 27 compostos e obtiveram êxito em 16 destes FSs, quando associados a um Laser He-Ne. Os mais efetivos foram o azul de toluidina e o azul de metileno e em todos os casos, o uso do corante sem a presença de luz não apresentou efeito significativo sobre os microorganismos testados.

Dobson e Wilson (1992), ao estudarem a TFD com laser He-Ne, no comprimento de onda de 632,8 nm, em biofilmes bacterianos *in vitro*, utilizando tanto o azul de metileno nas concentrações de 0,01% e 0,1%, quanto o azul de toluidina a 0,01%, verificaram que, em 30 segundos ( $16,5 \text{ J/cm}^2$ ), foram letais a *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. O azul de toluidina foi eficaz em erradicar as bactérias no tempo de dez segundos de irradiação ( $5,5 \text{ J/cm}^2$ ).

Komerik et al. (2000) demonstraram que a TFD pode ser uma alternativa aos tratamentos convencionais. As bactérias testadas foram *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, que foram expostas ao laser com emissão de radiação eletromagnética na região do vermelho e Azul de Toluidina. Houve significativa redução microbiana provando a ação antimicrobiana da terapia.

Em 2002, Komerik e colaboradores também testaram a atividade antimicrobiana do Azul de Toluidina, associada ao laser diodo. Foi demonstrado o efeito da TFD na redução de diversas bactérias orais, sem causar efeitos colaterais nas regiões de mucosa estudadas.

Segundo Zanin et al. (2003) muitos trabalhos têm demonstrado a eficácia da TFD em destruir bactérias relacionadas ao desenvolvimento das lesões de cárie e periodontal em humanos. No entanto, há poucos trabalhos que forneçam dados práticos sobre o efeito bactericida da TFD e da laserterapia de baixa potência, não havendo consenso nos resultados dessas terapias em feridas.

Os estudos sobre o efeito bactericida de tais terapias usam vários tipos de *laser*, com diferentes comprimentos de onda, potência e doses de irradiação, e nenhuma recomendação pode ser feita a respeito do tipo de laser e comprimento de onda ótimo para tal terapia (BENVINDO et al., 2008).

De acordo com Rogero et al. (2003), os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como limitação do número de variáveis experimentais, obtenção de dados significativos mais facilmente e período de teste mais curto.

Nussbaum et al.(2002) observaram crescimento *in vitro* de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* , *Staphilococcus aureus* e *Escherichia coli*) expostas à irradiação com LBP de 810nm de comprimento de onda e frequência de 1.000Hz. Contraditoriamente, Meral et al. (2003) relataram redução no número de unidades formadoras de colônia em cinco espécies de bactérias submetidas *in vitro* à irradiação com laser Nd:YAG, sugerindo que seu efeito bactericida reduziria o risco de infecção em feridas pós-operatórias.

SIGUSCH et al. (2005) testaram a TFD como método alternativo de supressão de bactérias periodontopatogênicas. Foram utilizados dois tipos de fotossensibilizadores em cães beagle. Os animais foram infectados com *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn) em todas as áreas subgingivais. A TFD foi realizada com um laser de diodo com comprimento de onda de 662 nm, utilizando uma potência de 0,5 W e os FSs. Um dos FSs causou uma redução significativa na inflamação clínica em comparação com os controles (laser isolado e sem tratamento). A utilização isolada do laser não influenciou a frequência de micro-organismos; a TFD com o cloro e6 causou uma redução significativa nos sítios de Pg; já com BLC1010 não houve redução.

KAIRALLA (2006) realizou um estudo com objetivo de comparar a redução bacteriana intracanal utilizando a terapia fotodinâmica e o laser de alta potência em vinte e oito dentes humanos unirradiculares. O corante utilizado foi o azul de metileno e o LBP de diodo InGaAIP (660nm) em *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* ), já o laser de alta apresentou potência de emissão média de 1,13W. Após coleta de *Enterococcus faecalis*, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). Nos dois grupos houve redução significativa das UFC/ml do micro-organismo. Todavia, não houve diferenças estatísticas entre os dois grupos da TFD e do laser de alta potência.

Carvalho et al. (2006) avaliaram o efeito antibacteriano *in vitro* o efeito do laser diodo com comprimento de onda de 650nm, associado ao azul de toluidina sobre as bactérias de úlceras cutâneas infectadas. Os materiais foram inoculadas em meios de cultura contendo ágar sangue azida para o crescimento de bactérias Gram-positivas e ágar Mac Conkey para as Gram-negativas, e incubadas por 48 horas. Os resultados obtidos após contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foram relacionados e submetidos à análise estatística, havendo redução significativa das UFC quando submetidas à terapia fotodinâmica.

LEE et al. (2006) avaliaram o efeito bacteriano isolado do laser diodo de alta potência e 810nm sobre streptococos mutans de diferentes espessuras da dentina humana (500, 1000 e 2000 µm) através do efeito térmico. Este efeito ainda foi avaliado quanto à injúria pulpar. Depois da irradiação com laser, a bactéria era removida das superfícies da dentina e cultivada por 48 horas a 378 °C para avaliação das UFC/ml. Os resultados revelaram que a potência do laser de 7W pode exterminar 97,7% do número de UFC por 500 mm de espessura de dentina. A eficiência bactericida foi significativamente reduzida e a espessura da dentina, aumentada. A dentina com espessura de 500 µm apresentou aumento de temperatura danoso à polpa. Todavia, o laser de diodo pôde eliminar o *Streptococcus mutans* da dentina cariada residual sem induzir aumento de temperatura pulpar quando a dentina remanescente tem espessura maior que 1 mm.

Dadras et al. (2006) utilizaram, *in vitro*, em *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* os seguintes lasers: Laser 514nm , Laser He-Ne (633nm), Laser SHG Nd: YAG (532nm) objetivando determinar efeitos proliferativos e inibitórios. A TFD em *Pseudomonas aeruginosa* também foi estudada, tanto utilizando o laser He-Ne como SHG Nd: YAG na presença de azul de toluidina ou safranina como fotossensibilizadores. Todas as densidades de energia dos lasers estudados mostraram um efeito proliferativo sobre *Pseudomonas aeruginosa* e efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus*. Sendo que o SHG Nd: YAG foi mais eficaz do que o He-Ne em ambos os casos. A TFD mostrou-se eficaz em *Pseudomonas aeruginosa* na presença de ambos fotossensibilizadores levando à diminuição da população de células (UFC) em relação ao controle.

Em 2007, Coutinho e colaboradores realizaram um estudo bacteriológico, *in vitro* avaliando o efeito de dois tipos de Laser de baixa potência em bactérias como *Acinetobacter baumannii* complex, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*,

*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*, *Serratia sp* e *Staphylococcus aureus*. Foram utilizados dois Laseres com o mesmo comprimento de onda de 904 nm, 150.J/cm<sup>2</sup> e 230 J/cm<sup>2</sup>. A análise da amostra ocorreu após 12 e 24 horas. O LBP mostrou-se inócuo quanto ao aumento do número de unidades formadoras de colônia.

Usando o Laser de baixa potência InGaP com doses de 2, 4 e 6 J/cm<sup>2</sup> e o FS Azul de metileno (0,1µg/ml), Benvindo e colaboradores (2008) verificaram in vitro o efeito bactericida em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A TFD e a laserterapia foram realizadas uma única vez, e as placas com *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* incubadas por 24 horas. As culturas foram analisadas pela formação de halo de inibição. Não houve qualquer formação de halos para as terapias aplicadas, não produzindo, para esta metodologia, efeitos bactericidas e bacteriostáticos.

Fimple et al. (2008) investigaram os efeitos fotodinâmicos do azul de metileno em biofilme bacteriano, incluindo: *Actinomyces israelii*, subespécie *Fusobacterium nucleatum nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* nos canais radiculares infectados experimentalmente in vitro de dentes humanos extraídos. A Microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de biofilmes em canais radiculares antes da terapia. Sistemas de canais foram incubados com azul de metileno (25µg/ml) por 10 minutos, seguida da exposição a luz vermelho em 665 nm com uma fluência de energia de 30 J/cm<sup>2</sup> de um laser de diodo através de um 250 µm de diâmetro da fibra óptica que uniformemente distribuída luz mais de 360 graus. A TFD obteve redução de até 80% da contagem de UFC.

Huang, Dai e Hamblin (2010) utilizaram nas colônias de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, a técnica da terapia fotodinâmica, in vitro, com o FS Azul de Metileno e luz vermelha, objetivando verificar, após 24 e 48 horas, o efeito bactericida. Os autores avaliaram concentração de 0,3 a 30 mM do AM, e dosimetrias de 10J/cm<sup>2</sup> a 320J/cm<sup>2</sup>. Porém em dois momentos, o primeiro fixando a dosimetria em 10J/cm<sup>2</sup> e 660nm, e variando a concentração do FS e o segundo fixando a concentração em 1mM do AM variando a dosimetria. As concentrações de AM menores que 1 µg/ml foram ineficazes sob quaisquer condições de luz emitida. Quando 1 mM de AM foi usado com uma lavagem por centrifugação e ressuspensão, obteve-se uma matança luz dose-dependente, com fluência relativamente alto de 320 J/cm<sup>2</sup>.

Hajim, Salih, Rassam (2010) realizaram um estudo *in vitro* para descrever efeito da TFD (laser He-Ne 632,8 nm em combinação com um TBO 50 µg/ml) sobre a viabilidade do grupo de *Staphylococcus aureus* resistentes a metciclina por 5, 10 e 15 minutos de exposição. Através da contagem de UFC, mostraram que houve uma diminuição substancial no número de colônias em relação a quantidade inicial, principalmente para o tempo de 15 min (100% UFC erradicadas). Não houve efeito significativo observado em amostra de *Staphylococcus aureus* expostos ao laser sozinho. Não houve qualquer alteração na utilização do fotossensibilizante isoladamente.

SOUZA et al. (2010) avaliaram a eficácia antibacteriana adicional ao preparo químico-mecânico (PQM) da TFD com AM ou com TBO (ambos a 15 µg/ml) em canais infectados por cepa endodôntica de *Enterococcus faecalis*. Cem dentes unirradiculares foram acessados, inoculados com uma cultura de *Enterococcus faecalis* e incubados por uma semana. Após o PQM, foram divididos em seis grupos (os quatro primeiros usando NaOCl a 2,5% como irrigante): Grupo A \_ TFD com AM; Grupo B \_ controle: laser sem FS; Grupo C \_ controle: AM; Grupo D \_ TFD com azul de toluidina; Grupo E \_ irrigação com solução salina: TFD com azul de toluidina; Grupo F \_ irrigação com solução salina: TFD com azul de metileno. Preencheram-se os canais, conforme seus grupos, com o FS ou com solução salina, sendo estes deixados no canal por dois (Grupos A, B, D, E e F) ou seis minutos (Grupo C), e a luz vermelha do laser diodo (InGaAlP), 660nm, ativada por quatro minutos (Grupos A, B, D, E e F). Foi realizada após coleta, a contagem das UFCs. Tais procedimentos pós-PQM reduziram significativamente a contagem bacteriana quando comparados com a contagem pré-PQM. Porém, não houve diferença estatística entre os procedimentos, quando comparados os grupos irrigados com NaOCl. Os resultados sugeriram possuir a TFD efeito adicional no tratamento endodôntico para a redução bacteriana, tanto com AM quanto com TBO.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o efeito antibacteriano da terapia fotodinâmica a laser em diferentes espécies bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar comparativamente, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica utilizando o LBP de InGaAlP(660 nm), 320J/cm<sup>2</sup>, por 90 segundos e 100 mW com uso do azul de metileno nas concentrações de 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml e 1,562 µg/ml sobre as diferentes cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857);
- Avaliar *in vitro* o efeito antibacteriano do LBP, com 660nm, 100 mW de potência e dosagens de 40J/cm<sup>2</sup>, 80J/cm<sup>2</sup>, 160J/cm<sup>2</sup>, 320J/cm<sup>2</sup> em *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857);
- Avaliar *in vitro* o efeito antibacteriano do LBP, com 830nm, 100 mW de potência e dosagens de 40J/cm<sup>2</sup>, 80J/cm<sup>2</sup>, 160J/cm<sup>2</sup>, 320J/cm<sup>2</sup> em *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857);
- Comparar entre si o efeito antibacteriano do Laser de baixa potência, da terapia fotodinâmica e do uso isolado do azul de metileno nas concentrações de 50µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml e 1,562 µg/ml em cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857);

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Caracterização do Estudo

Foi realizado um estudo experimental, analítico e quantitativo. Realizou-se um estudo *in vitro* do efeito biológico da terapia fotodinâmica (TFD) em diferentes espécies bacterianas.

### 4.2 Local da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Pesquisas em Atividades Antimicrobianas (LPAA) do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

### 4.3 Linhagens Microbianas

Foram utilizadas neste trabalho, cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) identificadas como: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), provenientes da empresa Cefar Diagnóstica LTDA.

### 4.4 Meios de cultura

**Foram utilizados os meios de Agar Sangue (AS), Agar Mueller-Hinton (AMH) e Caldo Brain Heart Infusion (BHI), os quais foram preparados seguindo-se as recomendações do fabricante DIFCO® (figura 3).**

### 4.5 Reativação das Cepas

Cada cepa foi inoculada com o auxílio de uma alça de platina, estéril, em um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas e após este período observou-se a turvação nos meios de cultura, indicando viabilidade microbiana

#### 4.6 Cultivo dos micro-organismos

Após a reativação das cepas, procedeu-se o semeio pela técnica de estrias (para obtenção de colônias isoladas), em placas de Agar Sangue e Agar Mueller-Hinton (para observar a pureza das cepas). As placas foram incubadas a 37°C/24 horas (figura 4).

#### 4.7 Inóculo bacteriano

Para a obtenção do inóculo bacteriano, foram selecionadas 3 a 5 colônias semelhantes as quais foram transferidas para 2,0 mL de solução salina (NaCl) a 0,85%, estéril, de modo a produzir uma leve turvação, de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, obtendo-se assim um inóculo de concentração final de  $10^{-6}$  UFC/mL. Essa suspensão, inóculo bacteriano, foi semeada aproximadamente 15 a 20 minutos após sua preparação (BAUER et al., 1966, CATÃO, 2007, CLSI, 2005)

#### 4.8 Determinação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de disco difusão (CLSI, 2005), utilizando discos papel de filtro estéreis Cecon® com 6 mm de diâmetro (figura 4). Os discos foram impregnados com 20 µL da solução de azul de metileno (figura 5) e distribuídos, com o auxílio de uma pinça estéril, sobre a superfície do AMH, previamente semeada com a suspensão bacteriana utilizando-se para tal procedimento, *swab* de algodão estéril. As placas foram incubadas a 37 °C / 24 h. Cada placa, medindo 60mm x 15 mm, recebeu um disco estéril com a concentração pré estabelecida (figura 5).

Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição de crescimento formado ao redor dos discos.

Foram considerados ativos a presença de halos de inibição de crescimento  $\geq$  8 mm de diâmetro (WONG-LEUNG, 1988; NAQVI et al. 1991; CATÃO, 2007).

## 4.9 Terapia Fotodinâmica

Para os grupos tratados com terapia fotodinâmica (TFD) foi utilizado o corante (azul de metileno), na concentração de 50µg/ml, da empresa Chimiolux®. Este agente fotossensibilizante foi diluído em água destilada em concentrações menores e correspondentes aos valores de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125% em relação a concentração adquirida de fábrica. As concentrações de azul de metileno estudadas neste experimento foram: 50µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml e 1,562 µg/ml (figura 6).

### 4.9.1 Técnica

Para a amostra tratada com terapia fotodinâmica (TFD) foi acrescentado 20µl de corante (azul de metileno) em todas as concentrações estudadas aos discos estéreis e estes colocados na placa de Petri com meio de cultura adequado para cada micro-organismo. Em seguida o LBP foi incidido no centro da placa de Petri utilizada onde se localizava o disco estéril contendo o fotossensibilizador, conforme esquema (figura 7).

### 4.9.2 Equipamento Laser

No grupo correspondente à terapia fotodinâmica foi utilizado o equipamento *Laser*, da marca DMC®, modelo Thera Lase, com os parâmetros (figura 8):

- Meio ativo InGaAIP, saída de 100 mW, comprimento de onda 660 nm, laser vermelho e emissão contínua;
- Dosimetria: 320J/cm<sup>2</sup> para cálculo em uma área de incidência de 1cm<sup>2</sup>. Assim, para área da ponteira–laser esta dosimetria é de 9 J/cm<sup>2</sup>;
- Tempo: A incidência da luz laser teve duração de 90 segundos;

O aparelho foi aferido e calibrado previamente ao início dos trabalhos pelo próprio fabricante.

### 4.9.3 Divisão e descrição dos grupos

O estudo foi dividido em três grupos experimentais de acordo com o procedimento a ser executado, conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2.** Identificação dos grupos experimentais e procedimentos executados

Grupos Experimentais	Procedimentos Executados
Grupo A	TFD com azul de metileno
Grupo B	Controle: LBP isolado
Grupo C	Controle: azul de metileno isolado

#### **Grupo A – Terapia fotodinâmica (TFD) com azul de metileno**

Nesse grupo, doze placas foram utilizadas para cada micro-organismo (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857)). Duas eram usadas para cada concentração do agente fotossensibilizante para cada micro-organismo (procedimento em duplicata), totalizando trinta e seis placas. Adicionou-se às placas de Petri os discos com o FS azul de metileno nas concentrações propostas, utilizando-se uma pipeta.

Após este procedimento, em cada placa era utilizada a irradiação do laser de baixa potência. A luz vermelha do *Thera lase* (DMC, São Paulo, SP), um laser diodo de baixa potência, foi ativada por 1 minuto e 30 segundos em um comprimento de onda de 660 nm com 100 mW de potência total. A ponteira ótica do transdutor ficava a uma distancia de 1 cm, com apoio de um dispositivo fixo confeccionado para o experimento. Após estes procedimentos as placas eram colocadas na estufa à 37°C por 24 horas.

### **Grupo B – Laser de baixa potência (LBP) isolado**

Este grupo foi subdividido em oito subgrupos para cada cepa bacteriana de acordo com a dosimetria e comprimentos de onda utilizado, totalizando 48 placas, onde a luz era incidida no centro de cada placa, sem o uso do disco estéril (Tabela 3). Neste grupo utilizou-se dois tipos de LBP, o vermelho, 660nm (InGaAlP) e o infravermelho, 830nm (AsGaAl).

**Tabela 3.** Identificação dos subgrupos para utilização do LBP isolado para cada cepa bacteriana

<b>Grupo B</b>	<b>Dosimetria</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Tempo de exposição (segundos)</b>
B1	40J/cm <sup>2</sup>	660	11
B2	80J/cm <sup>2</sup>	660	22
B3	160J/cm <sup>2</sup>	660	45
B4	320J/cm <sup>2</sup>	660	90
B5	40J/cm <sup>2</sup>	830	11
B6	80J/cm <sup>2</sup>	830	22
B7	160J/cm <sup>2</sup>	830	45
B8	320J/cm <sup>2</sup>	830	90

### **Grupo C –Azul de metileno isolado**

Neste grupo, doze placas foram utilizadas para cada micro-organismo (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857). Duas eram usadas para cada concentração do agente fotossensibilizante para cada micro-organismo (procedimento em duplicata), totalizando trinta e seis placas. Foi acrescentado 20 µl de corante (azul de metileno) em todas as concentrações estudadas aos discos estéreis e estes

colocados na placa de Petri sobre o crescimento microbiano no meio Agar Mueller-Hinton. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857). Não foi realizada a irradiação do Laser de baixa potência, e após a colocação dos discos estéreis nas placas de Petri estas foram colocadas na estufa à 37°C por 24 horas.

#### **4.10 Leitura das placas**

Após a incubação à 37°C por 24 horas, foi realizada a medição da área de inibição do crescimento microbiano. O efeito biológico da terapia fotodinâmica (TFD), da aplicação isolada do laser de baixa potência, e do uso do corante azul de metileno, em diferentes espécies bacterianas, foi quantificado em milímetros através do diâmetro dos halos de inibição medidos com o auxílio de um halômetro (figura 9).

#### **4.11 Análise estatística e avaliação**

Os dados foram analisados através de técnicas estatísticas descritivas e inferenciais. Utilizaram-se gráficos e tabelas para análise estatística descritiva, enquanto a análise inferencial ocorreu por meio de comparação de médias. Os testes utilizados foram U de Mann-Whitney para amostras independentes, Kruskal Wallis, teste de Levene's e teste de Kolmogorv Smirnov.

Os dados foram digitados e analisados no SPSS (Statistical Packag for Social Sciences) na versão 17.0. A margem de erro dos testes estatísticos foi de 5%.

Todos os resultados foram confrontados estatisticamente a fim de se avaliar o efeito biológico da terapia fotodinâmica, do LBP e do uso do fotossensibilizante azul de metileno isoladamente nas espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857).

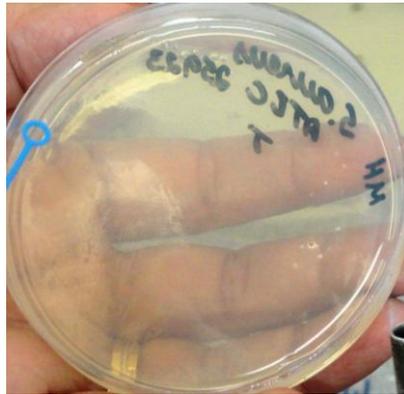


A



B

**Figura 3:** Placa de petri sendo preenchida pelo meio de cultura (A). Placa de petri com o meio de cultura pronta para receber o micro-organismo (B).



**Figura 4:** Semeio pela técnica de estrias, em placas de Agar Sangue e Agar Mueller-Hinton. Após, as placas foram incubadas a 37°C/24 horas.



**Figura 5:** Discos de papel de filtro estéreis Cecon® com 6 mm de diâmetro.

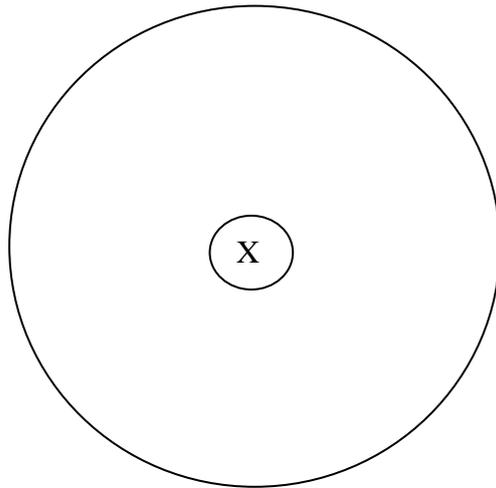


A



B

**Figura 6:** Preparo das concentrações do azul de metileno (A). Discos de papel de filtro Cecon® embebidos com concentrações de azul de metileno.



**Figura 7:** Esquema para aplicação do Laser de Baixa Potência em placa de Petri.



**Figura 8:** Equipamento Laser de Baixa Potência utilizado.



A



B

**Figura 9:** A: Figura mostrando placas de petri com discos estéreis nos centros e os halos de inibições prontos para serem medidos com o halometro (B).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito antibacteriano *in vitro* da terapia fotodinâmica sobre cepas bacterianas

A tabela 4 apresenta os resultados do efeito antibacteriano *in vitro* da terapia fotodinâmica, utilizando o azul de metileno (agente fotossensibilizante) em diferentes concentrações e o laser de baixa potencia (660nm e 320J/cm<sup>2</sup>) em cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27857.

Foi observado a presença de halo de inibição de crescimento de 12 mm na concentração de 50µg/ml de azul de metileno apenas quando testado frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 (Figura 10) e *Escherichia coli* ATCC 25922. Não foi observado nenhum efeito desta terapia quando testada frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857).

Na pesquisa, para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27857), observou-se ausência total de halo de inibição independente da concentração de azul de metileno utilizado para TFD. Pelo teste U de Mann-Whitney, p=1,00, existem evidências estatísticas de que não há diferença significativa de halos de inibição de acordo com as concentrações de azul de metileno para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Ao nível de 5% de significância.

Evidenciou-se para TFD que nesta pesquisa tanto a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 quanto a *Escherichia coli* ATCC 25922 apresentam um halo médio de inibição de 12 mm quando utilizado 50µg/ml de azul de metileno enquanto que, utilizando concentrações menores que 50µg/ml, ambas as bactérias não apresentam nenhum halo de inibição.

Aplicado o teste U de Mann-Whitney, p=0,001,(tabela 5) verifica-se que existem evidências estatísticas de que tanto para a bactéria *Staphylococcus aureus* quanto para *Escherichia coli* o halo de inibição é significativamente maior, quando utilizado uma concentração de 50µg/ml do azul de metileno, do que quando utilizado concentrações menores.

**Tabela 4 - Avaliação do efeito antibacteriano *in vitro* da terapia fotodinâmica do laser em associação com o azul de metileno frente a cepas padrão ATCC**

Micro-organismos testados	TFD- 660nm/320J/cm <sup>2</sup> (corante utilizado:Azul de metileno µg/mL / Diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm))					
	50 µg/ml	25µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,125 µg/ml	1,5625 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	12	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	12	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27857)	0	0	0	0	0	0

Legenda: (0) = Ausência de halos de crescimento microbiano.



**Figura 10:** Evidenciação dos halos de inibição de crescimento formados em placa de Petri sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após TFD a laser (660nm/320J/cm<sup>2</sup>).

**Tabela 5: Análise do halo médio de inibição (mm) utilizando a terapia fotodinâmica de acordo com a bactéria e concentração do corante utilizado no estudo**

Bactéria	Concentração	Halo médio	n	Desvio padrão	Halo mínimo	Halo máximo	*1 p-Valor
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,5625µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	1,000
	3,125µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	6,25µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	12,5µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	25µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	50µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
Total		0,0	12	0,00	0	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5625µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	0,001
	3,125µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	6,25µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	12,5µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	25µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	50µg/ml	12,00	2	0,00	12	12	
Total		2,00	12	4,671	0	12	
<i>Escherichia coli</i>	1,5625µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	0,001
	3,125µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	6,25µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	12,5µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	25µg/ml	0,0	2	0,00	0	0	
	50µg/ml	12,00	2	0,00	12	12	
Total		2,00	12	4,671	0	12	
Total	1,5625µg/ml	0,0	6	0,00	0	0	-
	3,125µg/ml	0,0	6	0,00	0	0	
	6,25µg/ml	0,0	6	0,00	0	0	
	12,5µg/ml	0,0	6	0,00	0	0	
	25µg/ml	0,0	6	0,00	0	0	
	50µg/ml	8,00	6	6,197	0	12	
Total		1,33	36	3,825	0	12	

\*1 p-valor por meio de teste U de Mann-Whitney ao nível de 5% de significância.

\*2 Para a aplicação do teste U de Mann-Whitney, a concentração de Azul de metileno foi dividida em dois grupos, sendo um menor ou igual a 25µg/ml e o outro igual a 50µg/ml.

## 5.2 Efeito antibacteriano *in vitro* do laser de baixa potência sobre cepas bacterianas

A tabela 6 apresenta os resultados da avaliação da aplicação *in vitro* do laser de baixa potência em diferentes dosimetrias sobre o crescimento de cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27857. Constatou-se que nas condições metodológicas utilizadas, não foi observado a presença de halo de inibição de crescimento bacteriano após as aplicações do laser de baixa potência nas dosimetrias e nos comprimentos de onda estudados.

**Tabela 6 - Avaliação *in vitro* da ação do laser de baixa potência sobre o crescimento microbiano**

Micro-organismos testados	Dosimetria (J/cm <sup>2</sup> ) / Diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm)							
	660 nm				830 nm			
	40	80	160	320	40	80	160	320
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> <b>(ATCC 25923)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>Escherichia coli</i></b> <b>(ATCC 25922)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> <b>(ATCC 27857)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: (0) = Ausência de halos de crescimento microbiano

### 5.3 Efeito antibacteriano do uso isolado azul de metileno sobre cepas bacterianas

O efeito antibacteriano do uso isolado do azul de metileno (sem emissão do laser de baixa potencia) em diferentes concentrações sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27857 está representado na tabela 7.

Neste estudo, evidenciou-se que para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, qualquer que seja a concentração de azul de metileno utilizada isoladamente, o halo médio de inibição é zero.

Enquanto que o halo médio de inibição no estudo da bactéria *Staphylococcus aureus* apresenta uma variação dependendo da concentração de azul de metileno utilizada. Isto é, utilizando um a concentração de 1,5625 até 25µg/ml, o halo médio é zero no entanto, ao utilizar uma concentração de 50µg/ml o halo médio passa a ser de 12mm, similarmente ocorre com a bactéria *Escherichia coli*.

Aplicado o teste de U de Mann-Whitney (tabela 8) para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ao nível de 5% de significância,  $p=0,436$ , verifica-se que existem evidências estatísticas de que o halo de inibição seja o mesmo para qualquer que seja a concentração de azul de metileno utilizada.

Tanto para a bactéria *Staphylococcus aureus* quanto para a *Escherichia coli*, verifica-se a existência de evidências estatísticas de que utilizando o azul de metileno isoladamente na concentração de 50µg/ml, o halo de inibição é significativamente maior do que utilizando concentrações iguais ou menores de 25µg/ml. Ao nível de 5% de significância.



Figura 11: Evidenciação dos halos de inibição de crescimento formados em placa de Petri sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 após o uso isolado do azul de metileno à 50 µg/ml.

**Tabela 7 - Avaliação do efeito antibacteriano *in vitro* do uso isolado do azul de metileno frente a cepas padrão ATCC**

Micro-organismos testados	Azul de metileno [µg/ml] / Diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm)					
	50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	3,125 µg/ml	1,5625 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	12	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	12	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27857)	0	0	0	0	0	0

Legenda: (0) = Ausência de halos de crescimento microbiano.

**Tabela 8: Análise do halo médio de inibição (mm) utilizando isoladamente o azul de metileno de acordo com a concentração, a bactéria utilizado no estudo**

Bactéria	Concentração	Halo médio	N	Desvio padrão	Halo mínimo	Halo máximo	p-valor
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,5625µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	0,436
	3,125µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	6,25µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	12,5µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	25µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	50µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
Total		0,00	12	0,000	0	0	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5625µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	0,001
	3,125µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	6,25µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	12,5µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	25µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	50µg/ml	12,00	2	0,000	12	12	
Total		2,00	12	4,671	0	12	
<i>Escherichia coli</i>	1,5625µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	0,001
	3,125µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	6,25µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	12,5µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	25µg/ml	0,00	2	0,000	0	0	
	50µg/ml	12,00	2	0,000	12	12	
Total		2,00	12	4,671	0	12	
Total	1,5625µg/ml	0,00	6	0,000	0	0	
	3,125µg/ml	0,00	6	0,000	0	0	
	6,25µg/ml	0,00	6	0,000	0	0	
	12,5µg/ml	0,00	6	0,000	0	0	
	25µg/ml	0,00	6	0,000	0	0	
	50µg/ml	8,00	6	6,197	0	12	
Total		1,33	36	3,825	0	12	

\*1 p-valor por meio de teste U de Mann-Whitney ao nível de 5% de significância.

\*2Para a aplicação do teste U de Mann-Whitney, a concentração de Azul de metileno foi dividida em dois grupos, sendo um menor ou igual a 25µg/ml e o outro igual a 50µg/ml.

## 6 Discussão

A procura por novos métodos que exerçam efeitos antimicrobianos é crescente nos meios científicos. A Terapia fotodinâmica e a Laserterapia são alternativas complementares na Odontologia em diversos tratamentos e protocolos. O uso do laser de baixa potência como coadjuvante em processos inflamatórios tem mais utilização do que a terapia fotodinâmica para tratamento antimicrobiano.

A microbiota bucal é caracterizada pela presença de milhões de bactérias com morfologia bem abrangente. Segundo Moreira et al.(2003) além de leveduras, protozoários e alguns vírus, bactérias anaeróbias, anaeróbias facultativas e aeróbias abrangendo as classes Gram-positiva e Gram-negativa estão presentes. O presente estudo teve como intuito avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana da ação da terapia fotodinâmica com azul de metileno em diferentes micro-organismos.

A TFD tornou-se conhecida desde o início do século passado quando os micro-organismos eram mortos pela combinação de luz com corantes, mas este interesse diminuiu com a introdução a antibioticoterapia. Todavia, recentemente a procura por novas alternativas foi retomada devido às resistências de bactérias aos medicamentos como meticilina e vancomicina (KANOPKA; GOSLINSKI, 2007).

O desenvolvimento de resistência à terapia fotodinâmica parece ser menos provável, uma vez que nas células microbianas, o oxigênio singlete e os radicais livres interagem com estruturas celulares nas mais diversas vias metabólicas. Além disso, a efetividade contra bactérias resistentes ou não a antibióticos é igual, e a fotossensibilização, mesmo que realizada diversas vezes não induz o selecionamento de cepas resistentes (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004).

Embora sejam encontrados estudos que comprovem a utilização de luz associada a fotossensibilizantes como um procedimento efetivo para inativação microbiológica, algumas variáveis podem ter influência sobre essa terapia, como o tipo e a concentração do FS, a espécie do micro-organismo, a fonte de luz e a dose empregada (JORI et al., 2006).

A terapia fotodinâmica envolve três componentes: a luz, o fotossensibilizador e o oxigênio. Vários dos trabalhos realizados *in vitro* com micro-organismos utilizaram a fonte de luz laser como componente da terapia (CARVALHO et al., 2006, DADRAS et al., 2006, FILMPLE et al., 2008, FOSCHI et al., 2007, HAJIM; SALIH; RASSAM, 2010, JUNQUEIRA et al, 2009; MULLER; GUGGENHEIM;

SCHMIDLIN, 2007, PEREIRA et al., 2010), outros utilizam a luz do LED - Light Emission Diodo (COSTA et al., 2010, GOIS et al., 2009, TSENG et al., 2009, ZANIN et al., 2006), alguns estudos realizaram a TFD com outras fontes, luzes com fluorescentes, fotopolimerizadores e bioluminescentes (BERTOLONI et al., 2000, GOULART et al., 2010, RAMONOVA et al., 2003).

Os LEDs (light emitting diode) são dispositivos semicondutores que necessitam de menos energia para emissão do comprimento de onda desejado surgindo assim, como fontes de radiação alternativa para essa terapia (ZANIN et al., 2005). Permite, inclusive, uma redução significativa no custo do tratamento quando comparado com fotossensibilização usando lasers convencionais (ZANIN et al., 2006).

Os lasers de diodos (baixa potência) são os mais empregados tipos de lasers e possuem propriedades especiais como: comprimento de onda único e monocromaticidade, que determinam a interação fotobiológica e efeitos terapêuticos específicos. Os lasers de baixa potência também são os mais utilizados na TFD na maioria dos estudos (BAXTER, 1997, ZANIN et al., 2005), bem como neste estudo.

A utilização do LBP requer o envolvimento de vários parâmetros que envolvem a terapia. Devido às alternativas possíveis de se modificar ou alterar estes parâmetros, nos diversos estudos da área, há uma variação de protocolo da aplicação do laser deixando o confronto de métodos minucioso.

Um dos elementos essenciais é o Meio Laser ou Meio ativo. Diversos autores realizaram estudos com laser de Dióxido de Carbono (COFFELT et al., 1997), de Argônio (USACHEVA et al., 2001), de Hélio-Neônio (DADRAS et al., 2006, DOBSON, WILSON, 1992, HAJIM; SALIH; RASSAM, 2010) de YAG (COFFELT et al., 1997; DADRAS et al., 2006, MERAL et al., 2006) , de Exímeros, de Corantes, de Rubi e de Diodos semi-condutores, como o de AsGaAl (CARVALHO et al., 2006, JUNQUEIRA et al., 2009, WILSON, 1994), InGaAlP ( BENVINDO et al., 2008, PEREIRA et al., 2010). Para realização dos testes, o estudo utilizou este último meio ativo como elemento essencial.

Neste grande complexo microbiano, optou-se por utilizar três tipos de bactérias com morfologia diferentes, abrangendo um grande espectro bacteriano: *Pseudomonas aeruginosa* (aeróbio estrito, bastonete Gram-negativo não fermentador); *Escherichia coli* (anaeróbio facultativo, bastonete Gram-negativo) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo, anaeróbio facultativo).

Avaliou-se o efeito da TFD através da medição de halos de inibição em cepas bacterianas padrão ATCC. Estas cepas são padronizadas pelo CLSI (2005) para testes de atividade antimicrobiana permitindo assim, a sua reprodutibilidade em outros estudos. A TFD com azul de metileno concentrado a 50µg/ml obteve resposta de inibição em *Staphylococcus aureus*. Nas concentrações menores, de 25µg/ml, 12,5µg/ml, 6,25µg/ml, 3,125µg/ml e 1,5625µg/ml não houve qualquer efeito bacteriano.

Diversos estudos realizaram TFD nesses tipos bacterianos e obtiveram êxito para a atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* (DADRAS et al., 2006; JUNQUEIRA, 2009; HAJIM; SALIH; RASSAN, 2010). Contraditoriamente, outros estudos não obtiveram efeitos nas mesmas cepas (BENVINDO et al., 2008, COUTINHO et al., 2007).

Na Odontologia, vários autores encontram resposta efetiva (CARVALHO et al., 2006) em estudos envolvendo bactérias Gram-positivas, quando utilizam TFD em *Enterococcus faecalis* (KAIRALLA, 2006, SOUZA et al., 2010), *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (BEVILACQUA, 2006, ZANIN et al., 2006) e *Actinomyces israelii* (FIMPLE et al., 2008).

Estas diferenças de comportamento podem estar relacionadas às espécies microbianas que são coletadas de indivíduos diferentes. Cada ser possui um intrínseco sistema imune levando às respostas diferenciadas aos hospedeiros, alterando o grau de resistência. Além destes fatores, estas pesquisas utilizaram lasers com meios ativos diferentes, assim como comprimentos de onda e dosimetria.

Este estudo avaliou a TFD com azul de metileno concentrado a 50µg/ml para *Escherichia coli* obtendo efeito antibacteriano. Outros estudos envolvendo a TFD e esta bactéria também encontraram efetividade (HAJIM; SALIH; RASSAM, 2010; KOMERIK et al., 2000). Nas concentrações, menores, utilizadas por este estudo, não se encontrou efeito significativo para estas condições metodológicas, assim como em outros estudos (COUTINHO et al., 2007).

Todavia, neste estudo, quando a TFD com azul de metileno foi aplicada na espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*, não houve qualquer formação de halo inibitório, não havendo atividade antibacteriana nas condições metodológicas estudadas para todas as concentrações. Estes dados corroboram com os relatos de outros autores (BENVINDO et al., 2008, COUTINHO et al., 2007, TSENG et al., 2009).

Em estudos envolvendo, na Odontologia, bactérias Gram-negativas, vários autores não encontraram respostas efetivas em estudos com TFD. A obtenção de efeitos inibitórios ou ainda bactericida em espécies bacterianas Gram-negativas, em especial a *Pseudomonas aeruginosa*, é muito mais difícil em relação às bactérias Gram-positivas (HUNG;DAI; HAMBLIN, 2010). O estudo de Sigusch e colaboradores (2005), observou atividade antibacteriana em *Porphyromonas gingivalis*; todavia, em *Fusobacterium nucleatum* não foi encontrado qualquer efeito antibacteriano.

Quanto ao uso isolado dos componentes da TFD também realizado por este estudo, o azul de metileno isolado na concentração de 50µg/ml obteve o mesmo efeito, com o mesmo halo de inibição nas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, nas condições metodológicas estudadas. Este resultado encontrado corrobora com outro trabalho (CARVALHO et al., 2006) , que com este assim pôde-se considerar a impossibilidade de execução do experimento em um ambiente livre de luz branca, o que pode ter sensibilizado algumas cepas.

Outros estudos (BENVINDO et al., 2008, HAJIM; SALIH; RASSAM, 2010; ZANIN et al. 2006) não observaram qualquer efeito sobre *Staphylococcus aureus* com o uso isolado do fotossensibilizador fenotiazinico. Além de que, o AM quando utilizado isoladamente nas condições metodológicas estudadas na espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou qualquer atividade bacteriana de acordo com os métodos estudados.

A fotossensibilização de bactérias parece ser relacionada com a carga dos sensibilizadores (corantes). Estes em geral, quando possuem estruturas moleculares neutras ou aniônicas, ligam-se com mais efetividade às bactérias Gram-positivas, inativando-as (devido às camadas porosas lipídicas da membrana externa), porém quando se ligam a algumas estruturas na extensão da membrana externa de bactérias Gram-negativas, não ocorre a inativação após iluminação. A membrana externa deste tipo bacteriano atua como uma barreira físico-funcional entre a célula e seu ambiente. Esta afinidade das bactérias Gram-negativas aos fotossensibilizadores pode ser aumentada através de ligações do sensibilizador a moléculas catiônicas (por exemplo poli-lisina, colágeno) ou por conjugar o sensibilizador com um anticorpo monoclonal que se liga a antígenos de superfície específicos (HAMBLIN; HASAN, 2004, KOMERIK, MACROBERT, 2006, ROVALDI et al., 2000, WAINWRIGHT, 1998).

Neste estudo, para terapia fotodinâmica, o fotossensibilizante fenotiazínico azul de metileno eleito possui carga negativa em sua estrutura molecular. O AM é bastante utilizado por cumprir muitas das recomendações de um FS ideal e por possuir espectro de ação entre 620 e 660nm, sendo compatível com as luzes mais utilizadas na Odontologia, tornando-o bem aceito e utilizado por diversos estudos (BENVINDO et al 2008, FIMPLE et al., 2008, FOSHI et al 2007, PEREIRA et al 2010, GOULART et al., 2010, HUANG; DAI; HAMBLIN, 2010, WAINWRIGHT et al 1999). Outros estudos utilizaram outro tipo de corante fenotiazínico como o azul de toluidina (CARVALHO et al., 2006, HAJIM, SALIH, RASSAM, 2010, TSENG et al., 2009, ZANIN et al., 2006)

A atividade antibacteriana e/ou a eliminação de bactérias com uso isolado do laser tem sido bastante estudado, principalmente *in vitro*. Os lasers utilizados são de alta potência e o efeito antimicrobiano do laser Nd:YAG tem sido demonstrado em vários estudos *in vitro*. Como estudo clássico Schultz et al.(1986) com laser de alta potência (120 W) Nd:YAG, reduziram a viabilidade de bactérias em suspensão aquosa em microplacas.

Usando o mesmo comprimento de onda, Grönqvist et al. (2000) demonstraram inibição do crescimento de *Staphylococcus epidermidis* em ágar plates. Ward et al. (2000) observaram a ação bactericida do laser alta potência Nd:YAG em princípios de transparência e turbidez de *Escherichia coli*. Da mesma forma, Lee, Tarpley e Miller usaram o laser de CO<sub>2</sub> para o tratamento de feridas cutâneas infectadas por bactérias (LEE, TARPLEY, MILLER, 1999). LEE et al., (2006) conseguiram efeito redutivo bacteriano significativo com Laser diodo com 810nm.

O efeito bactericida dos lasers de alta potência está intimamente relacionado com a ação térmica destas luzes. Porém, este efeito pode ser danoso aos tecidos irradiados, causando por exemplo dano pulpar, e devem ser investigados para obtenção de protocolo clínico.

Assim como em outros trabalhos (BENVINDO et al., 2008, COUTINHO et al., 2007, SIGUSCH, 2005), no presente estudo, o LBP, com este meio ativo, dosimetrias e comprimento de onda, mostrou-se inócuo sobre as bactérias estudadas.

O fenômeno da viabilidade bacteriana na ação do LBP isoladamente ainda é bastante discutido. Autores (PINHEIRO; BRUGNERA JUNIOR; ZANIN, 2010)

afirmaram que os LBP têm por finalidade restabelecer o equilíbrio biológico celular melhorando as condições teciduais (analgésia, anti-inflamatória e biomoduladora) gerando efeitos fotoquímicos, fotoelétricos e não térmicos, não apresentando efeito antimicrobiano quando utilizados isoladamente. Todavia, SOUKOS et al. (2003) afirmaram que a ação do laser está diretamente relacionada a absorção do comprimento de onda pelas porfirinas endógenas, que podem estar presentes em algumas bactérias, sendo componentes importantes para absorção de luz visível ou infravermelha.

Alguns autores (POLY et al., 2010) realizaram revisão de literatura objetivando avaliar a capacidade dos lasers e da TFD em eliminar bactérias. Estes autores salientam que os próprios resultados desta revisão são limitados pela dificuldade de comparação entre os estudos, devido às diferenças metodológicas, aos vários tipos de lasers, aos diferentes FSs e protocolos. Assim sendo, sugere-se que sejam desenvolvidos protocolos específicos para cada tipo de laser, além do desenvolvimento e da validação da metodologia, a fim de garantir uma direta comparação entre os estudos.

## 7 Conclusões

De acordo com a metodologia estabelecida e com os resultados apresentados, este estudo permitiu concluir que:

- Existe efeito antibacteriano de crescimento quando utilizou-se a TFD a laser associado azul de metileno na concentração de 50µg/ml frente as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e *Escherichia coli* ATCC 25922.
- O azul de metileno utilizado isoladamente e na concentração de 50µg/ml foi ativo frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Não foi encontrado qualquer efeito antibacteriano de crescimento, quando utilizada a TFD, o azul de metileno isoladamente nas concentrações estudadas frente às cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27857;
- O LBP isoladamente mostrou-se inócuo frente às cepas bacterianas estudadas.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol.**; v.43,p.5721-32. 2005
- ABDI-ALI, A.; MOHAMMADI-MEHR, M.; ALAEI, Y.A. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents** v.27,p.196-200. 2006.
- ALMEIDA-LOPES, L.; MASSINI, R. J. **Lasers e suas aplicações**. São Paulo: DMC Equipamentos, 2000. 31 p.
- ALVES, P.M.; PEREIRA, J.V.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; QUEIROZ, M.G.L. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de rosmarinus officinalis linn. (alecrim) sobre micro-organismos cariogênicos. **Arquivos em Odontologia**, v.44, n.2, p.53-58.2008.
- ANDRADE, S.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SADER, H.S. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **J Antimicrob Chemother** v.52, p.140-141. 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: Informação e documentação-Apresentação e Citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação -Trabalhos acadêmicos –Apresentação. Rio de Janeiro, 2005.
- BACT, M.B.; ARCE. R.; BOTERO, J.; MAG, A.J.; CRUZ, C.; CONTRERAS, A.; Micro-organismos inusuales em surcos y bolsas periodontales. **Colomb Med** v.1,p.6-14. 2006.
- BAE, T.; BANGER, A.K.; WALLACE, A.; GLASS, E.M.; ASLUND, F.; SCHNEEWIND O.; MISSIAKAS, D.M. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. **Proc Natl Acad Sci USA** v.101,n.33,p.12312-17.2004.
- BASS, S.E.; JOSHI, S.S.; NUTTALL, D.; SAZINSKY, S.L.; SCHARSCHMIDT, T.; SPENCER, R.B. *Staphylococcus*. Course Biotechnology and Its Social Impact (MOL 427), **Princeton University** v.4. 2001.
- BAUER, A. N.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. – Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology** v.45,n.4,p.493-496.1966.

BENVINDO, R.G.; BRAUN, G.; CARVALHO, A.R.; BERTOLINI, G.R.F.; Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias *in vitro*. **Fisioterapia e Pesquisa**, v.15, n.1, p. 53-57, 2008.

BENENSON, A.S. **Control of Communicable Diseases Manual**. American Public Health Association. ed 16, p. 184-187. 1995

BERTOLINI, G.; LAURO, F.M.; CORTELLA, G.; MERCHAT, M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. **Biochim Biophys Acta** v.1475: 169–174. 2000.

BEVILACQUA, I. M.; BRUGNERA JUNIOR, A.; NICOLAU, R. A. Ação do laser de baixa potência associado à substâncias fotoativadoras na redução de candidas em meio bucal (revisão da literatura). In: **VII Encontro latino americano de pos graduacao**, 2007, Sao jose dos campos. Anais de trabalhos completos, 2007.

BLUMBERG, H.M.; RIMLAND, D. CARROLL, D.J.; TERRY, P.; WACHSMUTH, I.K. Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis** v.163,p.1279–85.1991.

BONNETT, R. Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. **Chemical Society Reviews** v.24,p.19-33.1995.

BREN, L. The battle of the bugs: fighting antibiotic resistance. **FDA Consum** v.36,n.4, p.28–34.2002.

BROOK, I.; FRAZIER, E. H. Aerobic and Anaerobic Microbiology of Surgical-Site Infection Following Spinal Fusion **J Clin Microbiol** v.37,n.3,p.841–843.1999.

BRUGNERA, A. Jr.; PINHEIRO, A. L. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo:Pancast,.p.99-120. 1998.

CARVALHO,P.T.C.;MARQUES,A.P.C.;REIS,F.A.;BELCHIOR,A.C.G.;SILVA,I.S. et al. Photodynamic inactivation of *in vitro* bacterial cultures from pressure ulcers.**Acta Cirurgica Brasileira** v.21,n.4,p.32-35.2006.

CATÃO, R. M. R. Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos d3eriparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes.. 126 p. Tese (Doutorado). UFPB, João Pessoa. 2007

CATÃO, M.H.C.V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Rev. Bras. de Patologia Oral** v.3,n.4,p.214-18. 2004.

CHAVANTE, M.C. **Laser em bio-medicina: Principios e prática**. São Paulo; Ed Atheneu; 2009.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. – Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - 8ª ed. M2-A8. v.23,n.1. Substitui a Norma M2-A7, v.20,n.1, 2005.

COFFELT, D.W.; COBB, C.M.; MACNEILL, S.R.; RAPLEY, J.W.; KILLOY, W.J. Determination of energy density threshold for laser ablation of bacteria. **J Clin Periodontol** v.24, p.1-7. 1997.

COLLIGNON, P.J. Antibiotic resistance. **Med J Aust** v.177, p.325–329. 2002.

COSTA, A.C.B.P.; JUNIOR, J.C.; PEREIRA, C.A.; MACHADO, A.K.S.; JUNIOR, M.B.; JUNQUEIRA, J.C. et al. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light emitting diode. **Braz Oral Res** v.24, n.4, p.413-8. 2010.

CROWLEY, J. R., B. H. EDWARDS, AND MELLINGER, J. C. Microorganisms in hospital acquired infections. **J. Med. Technol.**; v.3, p.214-17. 1986.

DADRAS, S.; MOHAJERANIN, E.; EFTEKHAR, F.; HOSSEINI, M. Different Photoresponses of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to 514, 532, and 633 nm Low Level Lasers In Vitro **Current Microbiology** v.53, p.282-286. 2006.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R.; **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.** 2004, v.17, 245.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M.; Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin Infect Dis** v.32, p.114–32. 2002.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch. Oral Biol., Oxford**, v. 37, n. 11, p. 883-887, Nov. 1992.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**; v.8, p.881-90. 2002.

DUARTE S., GREGOIRE S., SINGH A.P., VORSA N., SCHAICH K., BOWEN W.H., KOO H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. **FEMS Microbiol.** v.257, p.50-6. 2006.

FALCAO, M.H.; TEXEIRA, L.A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; BORGES-NETO, A.A.; FIGUEIREDO, A.M. Occurrence of methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* within a single colony contributing to MRSA misidentification. **J Med Microbiol** v.48, p.515–21. 1999

FIMPLE, J.L.; FONTANA, C.R.; FOSCHI, F.; RUGGIERO, K.; SONG, X.; PAGONIS, T., et al. Photodynamic Treatment of Endodontic Polymicrobial Infection In Vitro. **Basic Research—Technology** v.24, n.6, p.728-734. 2008.

FOSCHI, F.; FONTANA, C.R.; RUGGIERO, K.; RIAHI, R.; VERA, A.; DOUKAS, A.G.; et al. Photodynamic Inactivation of *Enterococcus faecalis* in Dental Root Canals In Vitro. **Lasers Surg Med** v.39, p.382-787.2007.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Am J Med** v. 113,n.1,p.5–13. 2002.

FREEDBERG I. M.; EISEN A. Z.; WOLFF K.; et al. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine vol. 1**. New York: McGraw-Hill Professional, 2003.

GARAU, J.; XERCAVINS M.; RODRIGUEZ-CARBALLEIRA M, et al. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. **Antimicrob Agents Chemother** v.43,p.2736–41. 1999.

GARCEZ, A.A. et al. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 223-225, maio/jun. 2003.

GENOVESE, J. W. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise Ltda, 2000. 175p.

GIESE, A.C.; HILLENKAMPF, F.; PRATESI, R.; SACCHI, C. **Lasers in biology and medicine**. New York: Plenum Press.1980.

GOIS, M.M.; KURACHI, C.; SANTANA, E.J.B.; MIMA, E.G.O.; SPOLIDORIO, D.M.P. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. **Lasers Med Sci** v.25,p.391–395.2010.

GOMES, B.P.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int Endod J** v.29,p.69-75. 1996.

GOULART, R.C.; THEDEI JR, G.; SOUZA, S.L.S.; TEDESCO, A.C.; CIANCAGLINI, P. Comparative Study of Methylene Blue and Erythrosine Dyes Employed in Photodynamic Therapy for Inactivation of Planktonic and Biofilm-Cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomedicine and Laser Surgery** v.28,p.85-90.2010.

GOSNEY, M. A.; PRESTON, A. J; CORKHILL, J.; MILLS, B.; MARTIN, M. V. *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia from an oral source. **Br Dent J**. v. 187, n.12 p.639-40,1999.

GRISOLD, A.J.; LEITNER, E.; MUHLBAUER, G.; MARTH, E.; KESSLER, H.H. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. **J Clin Microbiol** v.40,p.2392-97.2002.

GRÖNQVIST, A.W.J; AXNER ,O.; MONSEN T.J. Bactericidal effect of pulsed 1,064 nm Nd:YAG laser light on *Staphylococcus epidermidis* is of photothermal origin: an in vitro study. **Lasers Surg Med** v.4, p.336–340.2000.

HAJIM,K.I.;SALIH,D.S.;RASSAM,Y.Z. Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Lasers Med Sci** v.25,p.743-48, 2010.

HAMBLIM, M. R.; T. ZAHRA, C. H.; CONTAG, A. T.; McManus and T. Hasan Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. **J. Infect. Dis** v.187,p.1717-26. 2003.

HAMBLIN, M. R.; O'DONNELL,D. A. N.;MURTHY, C. H. Contag and T. Hasan Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. **Photochem. Photobiol** v.755,p.1-57.2002

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T.; **Photochem. Photobiol. Sci.** v.3, p.436.2004.

HANNULA J., DOGAN B., SLOTS J., OKTE E., ASIKAINEN S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.** v.16,p.113–8, 2001.

HU, Z.Q.; ZHAO, W.H.; ASANO, N.; YODA, Y.; HARA, Y.; SHIMAMURA T.Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** v.46,p.558–560.2002.

HUANG, L.; DAI, T.; HAMBLIN,M.R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections **Methods Mol Biol** v.635,p.155–173.2010.

JARDIM, P. S.; JARDIM, E. G. J. Influência da remoção mecânica da placa bacteriana associada ao uso diário de solução fluoretada. **Rev. Gaúcha Odontol**, Porto Alegre, v. 46, n. 2, p. 79-84, abr./jun. 1998.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Inter J Med Microb** v.295, p.383-404. 2005.

JORI G, FABRIS C, SONCIN M, FERRO S, COPPELLOTTI O, DEI D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg Med** v.38, p.468-81, 2006.

JUNQUEIRA,J.C.;RIBEIRO,M.A.;ROSSONI,R.D.;BARBOSA,S.M.R.;JORGE,A.O. C. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Photodynamic Antimicrobial Effects of Malachite Green on *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, and *Candida*. **Photomedicine and Laser Surgery** v.28,p.67-72, 2010.

KAHLMETER, G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. **J Antimicrob Chemother** v.51, p.69–76. 2003.

KAIRALLA, E.C. **Efeito da redução microbiana intracanal utilizando laser de baixa potência associado a fotossensibilizador e laser de alta potência.** Dissertação (Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo. 2006.

KAPER, J.B.; NATARO JP, MOBLEY HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol** v.2,p.123-40. 2004

KARU,T.I. Molecular mechanism of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci** v.2,p.53–74.1988

KARU, T.I.; AFANASYEVA, N.I.; KOLYAKOV, S.F.; PYATIBRAT, L.V. Changes in absorption spectra of monolayer of living cells after irradiation with low intensity laser light. **Dokl Akad Nauk** v360,n.2,p.267–270.1998.

KARU TI, KALENDO GS, LETOKHOV VS. Control of RNA synthesis rate in tumor cells HeLa by action of low-intensity visible light of copper laser. **Lett Nuov Cim** v.32,p.55–61.1981.

KARU, T.I.;KALENDO, G.S.; LETOKHOV, V.S.; LOBKO, V.V. Biostimulation of HeLa cells by low intensity visible light. **Nuov Cim D** v.1,p.828–840.1982.

KARU, T.I Primay and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J PhotochemPhotobiol B** v.49,p.1-17.1999.

KENNEDY, K.J.; ROBERTS, J.L.; COLLIGNON, P.J. *Escherichia coli* bacteraemia in Canberra: incidence and clinical features. **Med J Aust** v.188,p.209–13.2008.

KOLENBRANDER, P.E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacteria adherence. **J. Bacteriol** v.175,p.32-47. 1993.

KÖMERIK, N.; MACROBERT, A.J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **J Environ Pathol Toxicol Oncol** v.25, p.487-504.2006.

KOMERIK, N.;WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of gram-negative bacteria to toluidine blue-mediated lethal photosensitisation. **J. Appl. Microbiol** v.92 n.18, p.618–623. 2002.

KOMERIK, N.; WILSON, M.;POOLE S.The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. **Photochem. Photobiol** v.72,p.676–680. 2000.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J. Dent. Res** v.86,p.694–707.2007.

LEE, J.S.; TARPLEY, S.K.; MILLER, A.S.CO<sup>2</sup> laser sterilization in the surgical treatment of infected median sternotomy wounds. **South Med J** v.92, n.4, p.380–384.1999.

LEE, B.S.; LIN, Y.W.; CHIA, J.S.; HSIEH, T.T.; CHEN, M.H.; LIN, C.P.; LAN, W.H. Bactericidal Effects of Diode Laser on *Streptococcus mutans* After Irradiation Through Different Thickness of Dentin. **Lasers Surg Med** v.38, p.62-69.2006.

LOESCHE, W. J. Ecology of the oral flora. In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. (Org.). **Microbiologia oral e imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 395p.

LOPES, L M.; EDUARDO, C. P. Laserterapia em periodontia. In: **Compêndio terapêutico periodontal**. São Paulo: Artes Médicas, 1999. Cap.14, p.293-307.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e a avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. Dissertação (Mestrado), Universidade de Campinas, Campinas.

MAISCH, T.; BOSL, C.; SZEIMIES, R.-M.; LEHN, N.; ABELS, C.; **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, p.1542. 2005.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Oral microbiology**. 4. ed. London: British Library, 1999. 192p.

MENEZES, M. de C.; SOUZA, M. M. S. de e BOTELHO, R. P. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos de plantas brasileiras sobre bactérias isoladas da cavidade oral de cães. **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida, Seropédica, RJ: EDUR**, v. 24, n.2, p. 141-144, jul.- dez., 2004.

MERAL G, TASAR F, KOCAGÖZ S, SENER C. Factors affecting the antibacterial effects of Nd:YAG laser in vivo. **Lasers Surg Med**.v32,n.3,p.197-202. 2003

MILLER H, DELOZIER J. Cost implications of the pressure ulcer treatment guideline. Columbia, MD: **Center for Health Policy Studies**; 1994.

MIMS, C.; DIMMOCK, N.; NASH, A.; STEPHEN, J. **MIMS' Pathogenesis of Infectious Disease**. New York: Academic Press, 1995.

MORAN, J.; ADDY, M., ROBERTS, S. A Comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. **J Clin Periodontal**, Copenhagen, v. 19, n. 8, p. 578-582, Set. 1992.

MOREIRA,A.C.A.;CARVALHO,M.A.R.;CISALPINO,E.O.;DAMASCENO,C.A.;NEGRETTE,A.C. R. **Ci. méd. biol** v. 2, n. 1, p. 94-103, jan./jun. 2003

MORIYAMA, LT. **Ablação de resinas compostas com laser de Er: YAG sob diferentes fluxos de água**. Dissertação (mestrado): Universidade de São Paulo Instituto de física de São Carlos. São Paulo. 2006

MULLER,P.;GUGGENHEIM,B.;SCHMIDLIN,P.R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. **Eur J Oral Sci** v.115, p.77–80.2007

MUSSER, J.M.; KAPUR, V .Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. **J Clin Microbiol** v.30,p.2058–63.1992.

NAQVI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, anti-fungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia** v.62,n.3, p.221-228, 1991.

NIEMZ, M.H. **Laser-tissue interaction: fundamentals and applications**.New York: Springer. 2002.

NUSSBAUM EL, LILGE L, MAZZULLI T. Effects of 810 nm laser irradiation on *in vitro* growth of bacteria: comparison of continuous wave and frequency modulated light. **Lasers Surg Med**. 2002;31(5):343-51

OCHSNER, M. Photodynamic Therapy: The Clinical Perspective. **Arzneim-Forsch. / Drug Res** v.47,n.2, p.1185-1194.1997.

O'NEILL J.F., HOPE C.K., WILSON M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. **Lasers Surg. Med**. V.31: p.86-90, 2002.

ORENSTEIN, A.; KLEIN, D.; KOPOLOVIC, J.; WINKLER, E.; MALIK, Z.; KELLER, N.; NITZAN, Y. The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in bum wound infections. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**. v.19,n.4,p.307-14.1998.

OTEO. J.; LAZARO, E.; ABAJO, F.J, et al. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, **Emerg Infect Dis** v.11, p. 546–53. 2005.

PÉCORA, J. D.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; Breve histórico do Laser. Disponível em: [www.forp.usp.br/restauradora/laser/historia.html](http://www.forp.usp.br/restauradora/laser/historia.html). Acesso em 14 maio de 2010.

PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V. ; ALBUQUERQUE, A. C. L. ; Araújo, Cristina Ruan Ferreira ; DINIZ, D. N. ; MACEDO-COSTA, Maria Regina Macedo ; Alves, Pollianna Muniz . **Plantas Medicinais na Odontologia: Potencial Antimicrobiano**. 1. ed. João Pessoa: Editora Universitária-UFPB, p.23.2010.

PEREIRA, C.A.; ROMEIRO, R .L.; COSTA A.C.B.P.; MACHADO, A.K.S.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O. C. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. **Lasers Med Sci**. 2010.

PERVAIZ, S. Reactive Oxygen-Dependent Production of Novel Photochemotherapeutic Agents. **The FASEB Journal** v.15, p.612-617.2001.

PINHEIRO, A.L.P.; BRUGNERA JUNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. In: Zanin, I.C, J et al. São Paulo: Santos, p.153-167.2010.

PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. B.; Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis** v.8, p.159–66. 2008.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.). **Principles and practice of infectious diseases**, 1995.

POLY, A.; BRASIL, J. F. W.; MARROIG P.C.; BLEI.V.; RISSO P.A. Efeito antibacteriano dos lasers e terapia fotodinâmica contra *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v.39, n.4, p. 233-239, jul./ago. 2010.

REACHER, M.H.; SHAH, A.; LIVERMORE, D.M.; WALE, M.C.; GRAHAM, C.; JOHNSON, A.P, et al. Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. **BMJ** v.320,p.213–6.2000.

RENISCH, L. Laser physics and tissue interactions. Laser Applications In Otolaryngology. **Otolaryngol Clin North Am**. v.29,n.6,p.893-915.1996.

ROGERO, S.O. et al. Teste *in vitro* de toxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, abr./jun. 2003.

ROMANOVA, N.A.; BROVKO, L.Y.; MOORE, L.; POMETUN, E.; SAVITSKY, A.P.; UGAROVA, N.N.; GRIFFITHS, M.W. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. **Appl Environ Microbiol** v.69 p.6393–8. 2003:

ROSATO, A.E.; KREISWIRTH, B.N.; CRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.W.; ARCHER, G.L. *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob Agents Chemother** v.47,p.1460–63.2003.

ROVALDI, C.R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N.A.; FRIDEN, P.M.; ROTHSTEIN, D.M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother** v.44, p.3364-3367. 2000.

RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. **J Infect Dis** v.181, p.1753-4. 2000.

SANTOS, S.S.F.; LOBERTO, J.C.S.; MARTINS, A.P.; JORGE, A.O.C. Prevalência e sensibilidade *in vitro* de - e *Pseudomonas* isoladas na cavidade

bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. **PGRO-Pós Grad Rev Odontol** v.5,p.74-84. 2002.

SCHAFER, M.; SCHMITZ, C.; HORNECK, G. High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen. **Int J Radiat Biol** v.74,p.249–253. 1998.

SCHULTZ, R.J; HARVEY, G.P; FERNANDEZ-BEROS, M.E; KRISHNAMURTHY, S.; RODRIGUEZ JE, CABELLO, F. Bactericidal effects of the neodymium:YAG laser: in vitro study. **Lasers Surg Med** v. 6, n.5, p.445–448.1986

SCOTTI, R.; LIMA, E.C.; BENVENUTTI, E.V.; PIATNICKI, C.M.S.; DIAS, S.L.P. Azul de Metileno imobilizado na cellulose/  $\text{TiO}_2$  e  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ : Propriedades eletroquímicas e planejamento fatorial. **Química Nova**, v. 29, p. 208-212. 2006.

SIGUSCH,B.W.;PFITZNER,A.;ALBRECHT,V.;GLOCKMANN,E. Efficacy of Photodynamic Therapy on Inflammatory Signs and Two Selected Periodontopathogenic Species in a Beagle Dog Model. **J Periodontol** v.76,n.7,p.1100-1205.2005

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova** v.25, n.5, p.801-807. 2002.

SOUKOS, N.S.; MULLHOLLAND, S.E.; SOCRANSKY, S.; DOUKAS, A.G. Photodestruction of human dental plaque bacteria: Enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Laser Surg Med** v.33,p.161-168. 2003.

SOUZA, L.C.; BRITO, P.R.R.;OLIVEIRA, J.C.M.O.; ALVES, F.R.F.;MOREIRA,E.J.L.;SAMPAIO-FILHO,H.R., et al. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. **Basic Research-Technology** v.36,n.2,p.292-296.2010

SVENSSATER, G; BORGSTROM, M; BOWDEN, G.H.W; EDWARDSSON, S. The Acid- Tolerant Microbiota with Plaque from Initial Caries and Healthy Tooh Surfaces. **Caries Res**, v.37, p.395-403, 2003.

TAKAHASHI, S.; TANAKA, T.; ASHIKI, A. Clinical studies of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) infections during the recent 10 months in our department. **Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi** v.81,n.10,p.1480–1486.1990.

TAYLOR, P. W.; STAPLETON, P. D.; LUZIO, J. P. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discov. Today** v.7,p.1086-1091. 2002.

THORNSBERRY, C. The development of antimicrobial resistance in staphylococci. **J Antimicrob Chemother** v.21,p.9–17.1988.

TIPHLOVA, O.; KARU, T. I. Action of low-intensity laser radiation on *Escherichia coli*. **CRC Critical Rev Biomed Eng** v.18, p.387–394. 1991.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H. M. et al. Photodynamic Therapy in Oncology. **Oncologist** v.11, p.1034-1044. 2006.

TSENG, S. P.; TENG, L. J.; CHEN, C. T.; LO, T. H.; HUNG, W. C.; CHEN, H. J. et al. Toluidine Blue O Photodynamic Inactivation on Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Lasers in Surgery and Medicine** v.41, p.391-397. 2009.

USACHEVA, M. N., TEICHERT, M. C., BIEL, M. A. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine** v.29, p.165-173. 2001.

VAN WINKELHOFF, A. J.; RAMS, T. E.; SLOTS, J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. **Periodontol** v.10, p.45-78. 1996.

VAN ELDERE, J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. **J Antimicrob Chemother** v.51, p.347-352. 2003.

VAZQUEZ, F.; MENDOZA, M. C.; VIEJO, G.; MENDEZ, F. J. Survey of *Escherichia coli* septicemia over a six-year period. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v.11, p.110–7. 1992.

VO-DINH, T. **Biomedical Photonics Handbook**. New York: CRC Press. 2003.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother** v.42, n.1, p.13-28. 1998.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; GASKELL, M.; MARSHALL, B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. **J Antimicrob Chemother** v.44, n.1, p.823-825. 1999.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Photosensitizing agents—circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. **Int Biodeterior Biodegrad** v. 53, p. 119-126. 2004.

WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry, Part 2, Hard tissue applications. **Aust Dent J** v.42, n.5 p.302-6, 1997.

WANG, H.; CHEN, M. China Nosocomial Pathogens Resistance Surveillance Study Group. Surveillance for antimicrobial resistance among clinical isolates of gram-negative bacteria from intensive care unit patients in China, 1996 to 2002. **Diagn Microbiol Infect Dis** v.51, p.201–8. 2005.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. *Farmacologia Clínica para Dentistas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999.

WARD, G.D.; WATSON, I.A.; STEWART-TULL, D.E.; WARDLAW, A.C.; WANG, R.K.; NUTLEY, M.A. et al. Bactericidal action of high-power Nd:YAG laser light on *Escherichia coli* in saline suspension. **J Appl Microbiol** v.89, n.3, p.517–525.2000.

WIELDERS, C.L.; FLUIT, A.C.; BRISSE, S.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F.J. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. **J Clin Microbiol** v.40,n.11,p.3970–75.2002

WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potencial use in the treatment of caries and periodontal disease. **J Appl Bacteriol, Oxfors**, v.75, n.4, p.299-306, 1993.

WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol**, New York, v.25, n.2, p.77-81, Ago.1992.

WOOD, S., B. NATTRESS, J.; KIRKHAM, R.; SHORE, S.; BROOKES, J.; GRIFFITHS, C.; ROBINSON. *An in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol** v.50p.1-7. 1999

WONG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in chinese medicine. **Fitoterapia** v.69,n.1,p.11-16. 1988.

YOSHIYASU, RYA. **Um estudo *in vitro* sobre os efeitos da irradiação pelo laser de Er: YAG combinado com a terapia com flúor na resistência ácida do esmalte de dentes submetidos a aparelho ortodôntico fixo** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de odontologia. Instituto de pesquisa energéticas nucleares. Universidade de São Paulo, 2001.

ZAIDI, M.; MCDERMOTT, P.; TOLLEFSON, L. Integrated surveillance of antimicrobial-resistant foodborne pathogens in Mexico (abstract S12:2). In: **Program and abstracts of the American Society for Microbiology Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens** (Copenhagen, Denmark) 30.2008.

ZANIN, I.C.J.; BRUGNERA JUNIOR, A.; ZANIN, F.; GONÇALVES, R.B. Terapia Fotodinâmica na Odontologia (T.F.D.). **RGO** v.51, n.3, p.179-182, jul/ago/set. 2003.

ZANIN, I.C.J.; GONÇALVES, R.B.; BRUGNERA JUNIOR, A.; HOPE, C.K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **J Antimicrob Chemother** v.56,p.324–330. 2005

ZANIN, I.C.J.; LOBO, M.M.; RODRIGUES, L.K.A, PIMENTA, L.A.F.; HOFLING, J.F.; GONCALVES, R.B. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **Eur J Oral Sci** v.114, p.64–69. 2006.