



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM ENGENHARIA MECÂNICA

**“ANÁLISE COMPARATIVA DA EMISSÃO DE LUZ POR LED E LASERS
EMITINDO NO VERMELHO DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO NA
REDUÇÃO DE BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS”.
ESTUDO “*IN VITRO*”**

GERDAL ROBERTO DE SOUSA

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa

Belo Horizonte

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA MECÂNICA

**“ANÁLISE COMPARATIVA DA EMISSÃO DE LUZ POR LED E LASERS
EMITINDO NO VERMELHO DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO NA
REDUÇÃO DE BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS”.**
ESTUDO “*IN VITRO*”

GERDAL ROBERTO DE SOUSA

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia Mecânica.

Belo Horizonte

2007

Dedicatória,

*Aos meus pais, cuja dedicação
e retidão construíram o exemplo
que procuro seguir em todos os dias
da minha vida;*

*A Marcia, por ser a luz que ilumina
meus passos, pelo apoio constante, incentivo
e pelas meninas Isabella, Bárbara e Camila
razão do meu esforço.*

*“Os homens não percebem que tudo pertence a todos.
A vida é uma benção que Deus concede, distribuindo
todos os bens igualmente, sem fazer seleção. O homem
é que criou os limites e as prerrogativas”.*

P.E. Paulo

Agradecimentos,

Ao meu orientador e amigo, **Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa** por acreditar em mim e pela valiosa ajuda no desenvolvimento e realização desta tese.

Ao **Prof. Dr. Roberto Márcio de Andrade**, pelo estímulo e confiança em mim depositados.

Aos Professores da Engenharia Mecânica, pela atenção e amparo.

Aos Professores **Maria Auxiliadora Roque de Carvalho e Dr. Luiz Macedo de Farias** por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para que este trabalho se concretizasse.

Ao **Prof. Dr. Maurício Veloso Brant Pinheiro e ao Gustavo Catão Alves** pela imensa ajuda nos experimentos executados no Laboratório de Ressonância Paramagnética do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UFMG.

A prima e amiga **Betânia Maria Soares** pela enorme cooperação e apoio.

A amiga **Patrícia Ranger Queiroz Santos** pelo carinho no auxílio nos experimentos no laboratório.

Aos amigos e companheiros **Profs. José Cláudio Faria Amorim, Lívio de Barros Silveira, Marcos Vinicius Lucas Ferreira e Renato Araújo Prates** pela ajuda de todas as horas.

A **Walquiria Lopes Borges** pela presteza que nos ajudou no Departamento de Micologia do ICB/UFMG.

Às empresas **mmoptics** e **Ecco Fibras** pelo empréstimo dos equipamentos utilizados neste experimento.

A todos que de alguma maneira ajudaram-me na realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a sensibilização letal *in vitro* das bactérias periodontopatogênicas (*Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia*), através da utilização de lasers e LED (Light Emitting Diode) no processo de redução bacteriana, utilizando como fotossensibilizador azul de toluidina (TBO) a 0,01%. Os resultados estatísticos obtidos pelo Teste *t-student* demonstraram que os grupos de terapia fotodinâmica (PDT) (grupos 6, 7, 8) são diferentes do grupo controle para $p=0,05$ e os valores percentuais de redução bacteriana dos grupos PDT foram de 99,8% no grupo 6, 81,9% no grupo 7 e 99,8% no grupo 8 para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, de 93,7% no grupo 6, 84% para o grupo 7 e 99,8% no grupo 8 para o *Fusobacterium nucleatum* e 26,3% no grupo 6, 38,6% no grupo 7 e 49,5% no grupo 8 para a *Prevotella intermedia*, demonstrando assim, que o corante azul de toluidina 0,01% associado aos lasers e ao LED apresenta um excelente potencial para a utilização em PDT, na sensibilização letal dessas bactérias nos parâmetros utilizados no experimento ($\Delta t=3$ minutos).

Palavras chaves – Bactérias periodontopatogênicas, terapia fotodinâmica, sensibilização letal.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Siglas ou Abreviaturas	xiv
1 – Introdução	01
2 – Objetivo	07
3 - Revisão de Literatura	08
3.1 – Bactérias periodontopatogênicas submetidas à fotossensibilização	08
3.1.1 – <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	08
3.1.2 – <i>Fusobacterium nucleatum</i>	09
3.1.3 - <i>Prevotella intermedia</i>	09
3.2 – Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica	10
3.2.1 - Tipos de destruição bacteriana	13
3.3 – Corantes (fotossensibilizadores)	14
3.3.1 – O Azul de Toluidina	15
3.3.2 – Concentração do fotossensibilizador	16
3.3.3 – Tempo de pré-irradiação	17
3.4 - Aplicação da Terapia Fotodinâmica na Periodontia	17
4 – Materiais e Métodos	27
5 – Resultados e Discussão	44
6 – Conclusão	67
7 – Sugestões para trabalhos futuros	68
Referências Bibliográficas	70
Anexo 1 – Fontes de Luz	79
Anexo 2 – Espectroscopia	89
Anexo 3 - Medidas descritivas da transmissividade do Laser 1, Laser 2 e LED para a água (baseline) e os corantes azul de toluidina (TBO), verde de malaquita (VM) e azul de metileno (MB) utilizados no experimento 1.	91
Anexo 4 - Medidas descritivas pelo Método Visual e Digital utilizadas no experimento	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Tabela dos grupos utilizados no experimento e sua descrição e simbologia utilizada	39
Tabela 5.1 – Potência transmitida (τ) da linha de base e do corante obtida pelo experimento 1 com o corante TBO a 0,01% avaliado para os equipamentos (Laser 1 – Grupo 6, Laser 2 – Grupo 7 e LED – Grupo 8).	47
Tabela 5.2 - Medidas descritivas visuais das UFCs para todas as bactérias em triplicata (Aa1, Aa2 e Aa3 - <i>Actinobacillus Actinomycetemcomitans</i>), (Fn1, Fn2 e Fn3 - <i>Fusobacterium nucleatum</i>) (Pi1, Pi2 e Pi3 - <i>Prevotella intermedia</i>); dos grupos de G1-10 ² a G8.	49
Tabela 5.3 – Medidas descritivas da contagem visual para os grupos em triplicata mostrando percentualmente as colônias viáveis e sua redução para o <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> .	51
Tabela 5.4 - Medidas descritivas da média, desvio padrão e erro padrão para <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> .	51
Tabela 5.5 – Medidas descritivas da contagem visual para os grupos em triplicata mostrando percentualmente as colônias viáveis e sua redução para o <i>Fusobacterium nucleatum</i>	53
Tabela 5.6 - Medidas descritivas da média, desvio padrão e erro padrão para o <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	53
Tabela 5.7 – Medidas descritivas da contagem visual para os	55

grupos em triplicata mostrando percentualmente as colônias viáveis e sua redução para a *Prevotella intermedia*

Tabela 5.8 - Medidas descritivas da média, desvio padrão e erro padrão para *Prevotella intermedia*

55

Tabela 5.9 – Medidas descritivas para a probabilidade de significância ($p < 0,05$) para as bactérias *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Prevotella intermedia* (Pi) dos grupos 6, 7 e 8 em relação ao grupo 1 (controle) utilizando-se o Teste *t student* entre as amostras avaliadas presumindo variâncias semelhantes. (Utilizou-se um nível de significância de 0,05 ($p = 0,05$), onde os valores de $p < 0,05$ são considerados diferentes).

59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 – Figura mostrando do lado esquerdo uma sonda periodontal dentro do sulco gengival penetrando até no máximo 3mm evidenciando a saúde do periodonto e do lado direito a sonda periodontal penetrando mais que 3mm configurando a presença de bolsa periodontal que é um sinal clínico da doença periodontal (nota-se a destruição óssea que é uma característica da periodontite) 02
- Figura 1.2 – O agente fotossensibilizador é depositado dentro da bolsa periodontal com auxílio de uma seringa (imagem esquerda) e com auxílio de uma fibra ótica a luz do laser em baixa intensidade é irradiado dentro da bolsa periodontal (imagem direita). 06
- Figura 3.1 - Diagrama de Jablonski - Esquema da transferência de elétrons pelos mecanismos Tipo I e Tipo II com produção de oxigênio singlete, ânions superóxidos e hidroxilas por fluorescência e fosforescência. 11
- Figura 3.2 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}) em nanômetros, bem como o deslocamento de *Stokes* ($\Delta\bar{\nu}$) para o corante azul de toluidina (TBO), T=298K. 16
- Figura 3.3 - Representação da estrutura química da molécula do azul de toluidina (TBO). 16
- Figura 4.1 – Câmera digital fixa à estativa dentro do Fluxo Laminar onde foram feitas as fotos das placas com bactérias para a contagem eletrônica 27

Figura 4.2 - Laser em baixa inten. Quantum -Ecco (Laser nº1)	28
Figura 4.3 - Laser em baixa intensidade Twinlaser - <i>mmoptics</i> (Laser n.2)	28
Figura 4.4 - Equipamento de LEDs – FISIOLED – <i>mmoptics</i> – São Paulo	29
Figura 4.5 - Espectrofotômetro JEN WAY Spectrophotometer 640, EUA	29
Figura 4.6 — Power Meter - NOVA – Ophir Optronics, Jerusalém – Israel	30
Figura 4.7 - Bactérias utilizadas no experimento (<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> - ATCC 29525, <i>Fusobacterium nucleatum</i> - ATCC 25586 e <i>Prevotella intermedia</i> – ATCC 25611).	31
Figura 4.8 – Azul de Toluidina a 0,1% (TBO) - Sigma, St. Louis, MO., EUA.	31
Figura 4.9 – Cubas de acrílico com água e com os corantes avaliados.	33
Figura 4.10 - Colocação da ponteira em acrílico do equipamento de LED em posição e do outro lado da cuba o <i>Power Meter</i> para mensurar a potência transmitida.	33

Figura 4.11 - Imagem do experimento mostrando além do sensor o equipamento de medição (<i>Power Meter</i>)	34
Figura 4.12 - Imagem do laser 2 (grupo 7) com a ponta encostada na cuba de acrílico com TBO a 0,01% mostrando o feixe sendo absorvido.	35
Figura 4.13 - Imagem do display digital do <i>Power Meter</i> medindo a potência transmitida pela cuba com o corante.	35
Figura 4.14 - Análise Visual para <i>Mc Farland</i> 0,5 onde a densidade óptica do meio no <i>Falcon</i> tem que coincidir visualmente com o tubo padrão da Escala de <i>Mc Farland</i>	36
Figura 4.15 - Gráfico com as curvas de absorbância ¹ (densidade óptica) das bactérias envolvidas no experimento em relação aos comprimentos de onda entre 380 e 900nm.	37
Figura 4.16 - Foto mostrando os 08 grupos, onde os grupos 1, 3, 4, 5 contém 2ml de suspensão sem TBO (tubos com líquido incolor) e os grupos 2,6,7,8 onde foram adicionados o corante TBO (proporção 1:10).	38
Figura 4.17 - Tubos de ensaio sendo irradiados com laser 2 e LED apoiados em um suporte de laboratório.	40
Figura 4.18a - Procedimento mostrando o momento das diluições de 10^8 UFC/ml para 10^3 UFC/ml dentro do fluxo laminar para manter o meio sem contaminação.	41
Figura 4.18b - Diluição até 10^3 UFC/ml sendo mostrado em um tubo do Tipo <i>Eppendorf</i> (com tampa), antes de ser levado à placa de <i>Petri</i> .	41

Figura 4.19 - Procedimento de semeadura do meio com as bactérias na placa de <i>Petri</i> , procedimento este também feito na câmara do fluxo laminar. Após a semeadura o meio é espalhado em toda a placa com auxílio de um <i>Drigausk</i> (bastão de vidro).	41
Figura 4.20 - Câmara de anaerobiose onde as placas de <i>Petri</i> ficam incubadas por 48 horas a 35°C e após este período é então feita a contagem visual dos pontos com UFCs.	42
Figura 4.21a – Marcação com caneta hidrográfica azul para contagem visual das UFCs	43
Figura 4.21b - Contagem eletrônica – Prog. IMAGEPRO-PLUS 6.0.	43
Figura 5.1 – Potência aplicada e potência transmitida para o Laser 1, com seus respectivos desvios padrões.	44
Figura 5.2 – Potência aplicada e potência transmitida para o Laser 2, com seus respectivos desvios padrões.	45
Figura 5.3 – Potência aplicada e potência transmitida para o LED, com seus respectivos desvios padrões.	46
Figura 5.4 - Contagem das UFC/ml dos grupos avaliados, para as bactérias onde Aa1, Aa2, Aa3 são as medidas para o <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> em triplicata, Fn1, Fn2 e Fn3 para o <i>Fusobacterium nucleatum</i> em triplicata e Pi1, Pi2 e Pi3 para a <i>Prevotella intermedia</i> em triplicata.	50

Figura 5.5 - Redução bacteriana do <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> em escala logarítmica e os desvios padrões para os grupos analisados.	52
Figura 5.6 - Redução bacteriana do <i>Fusobacterim nucleatum</i> em escala logarítmica e os desvios padrões para os grupos analisados.	54
Figura 5.7 - Redução bacteriana da <i>Prevotella intermedia</i> em escala logarítmica e os desvios padrões para os grupos analisados.	56
Figura 5.8 - Número de células viáveis nos grupos de bactérias (<i>Fusobacterium nucleatum</i> em vermelho, <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> em verde e <i>Prevotella intermedia</i> em azul) para os grupos investigados.	57
Figura 5.9 - Percentual de redução bacteriana atingida no experimento para as três bactérias <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Fusbacterium nucleatum</i> e <i>Prevotella intermedia</i> nos Grupos 6 (PDT L1), Grupo 7 (PDT L2) e Grupo 8 (PDT LED).	58
Figura 5.10 - Amostras para contagem de <i>Fusobacterium nucleatum</i> na placa de <i>Petri</i> onde se observa que nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 o número de pontos correspondentes às colônias bacterianas é muito maior que nos grupos PDT (grupos 6,7,8)	60
Figura 5.11 - Amostras para contagem de <i>Actinobacillus actinomycentencomitans</i> na placa de <i>Petri</i> onde se observa que nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 o número de pontos correspondentes às colônias bacterianas é muito maior que nos grupos PDT (grupos 6,7,8) ressaltando que no grupos 6 praticamente não foi constatado nenhuma colônia e no grupo 8 somente uma.	61

Figura 5.12 – Amostras para contagem de *Prevotella intermedia* na placa de *Petri* onde se observa que nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 o número de pontos correspondentes às colônias bacterianas é maior que nos grupos PDT (grupos 6,7,8) e o grupo 8 o número de colônias é bem menor do que os outros dois grupos PDT (grupos 6 e 7)

62

Figura 5.13 - Imagens de microscopia ótica das lâminas coradas pelo método de *Gram* das amostras de *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*) e *Prevotella intermedia* (*Pi*) dos grupos 1 (inóculo) e dos grupos PDT (grupos 6,7 e 8) onde pode-se avaliar pela imagem que os grupos 6,7 e 8 quando comparados com o grupo 1 (inóculo) vê-se um número muito menor de pontos corados demonstrando menos bactérias viáveis.

63

Figura 5.14 – As imagens mostram a transmissão da luz no grupo sem corante (5.14a) e a absorção da luz pelo corante TBO a 0,01% (5.14b) para o Laser 1.

64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a: coeficiente de absorção óptica
Aa: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
AlPcS₂: ftalociacina dissulfonada de alumínio
AsGa: arseneto de gálio
AsGaAl: arseneto de gálio alumínio
ATP: adenosina-trifosfato
BHI: Brain Heart Infusion
°C: graus Celsius
cm: centímetro
cm² : centímetro quadrado
CO₂ : dióxido de carbono
CW: continuous wave
DNA: ácido desoxirribonucleico
et al.: *et al.*li, e colaboradores
ex: exemplo
Fn: *Fusobacterium nucleatum*
H₂O₂: água oxigenada
HeNe: hélio-neon
Hz: hertz
I: intensidade
J: joules
J/cm²: joules por centímetro quadrado
LED(s) (Light Emitting Diode – Diodos Emissores de Luz)
LLLT: low level laser therapy
LILT: low intensity laser therapy
m: metro
MB: Metilene Blue
mg: miligramas
min: minutos
mm: milímetro
mm²: milímetro quadrado
ml: mililitro
mW: miliwatts

mW/cm²: miliwatts por centímetro quadrado
mJ: milijoules
MEV: microscopia eletrônica de varredura
µg/ml: microgramas por mililitro
µm: micrômetro
µW: microwatts
nm: nanômetro
¹O₂ - oxigênio no estado singleto
³T – oxigênio no estado tripleto
PDT –Photodynamic Therapy (Terapia fotodinâmica)
Pi: *Prevotella intermedia*
PIT: Pré irradiation time – Tempo de pré-irradiação
pH: potencial hidrogeniônico
p/v: por volume
s: segundos
t: tempo
TBO – Toluidine Blue (azul de toluidina)
TAB: tabela
UFC(s): Unidades formadoras de colônia(s)
UFC/ml: Unidades formadoras de colônia por mililitro
EUA: Estados Unidos da América
V: volts
VM: verde de malaquita
W: watts
W/cm²: watts por centímetro quadrado
λ : comprimento de onda
τ: transmissividade

1 – Introdução

A doença periodontal é considerada o segundo problema da odontologia em saúde pública, e hoje representam uma importante complicação na saúde geral do indivíduo sendo relacionada a uma série de doenças sistêmicas com infarto agudo do miocárdio, bacteremias transitórias, endocardites bacterianas, nascimento de bebês de baixo peso, partos prematuros e pneumonia por aspiração de partículas contaminadas, além de dificultar o controle metabólico em pacientes portadores de diabete melito (GROSSI *et al.*, 1994).

A doença periodontal é uma doença inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes, levando à perda óssea e do ligamento periodontal. Resulta da interação de fatores determinantes locais, como o biofilme dental ou placa bacteriana, com a presença de bactérias periodontopatogênicas, do hospedeiro e de fatores ambientais responsáveis pela sua progressão e esta infecção representa também forte risco sistêmico, pois a liberação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea pode desencadear uma série de respostas pelo organismo. Alterações, como infartos agudos do miocárdio e rompimento de trombos vasculares, vêm sendo pesquisados e fortemente relacionados a infecções periodontais (FIG. 1.1) (BECK *et al.* 1994).

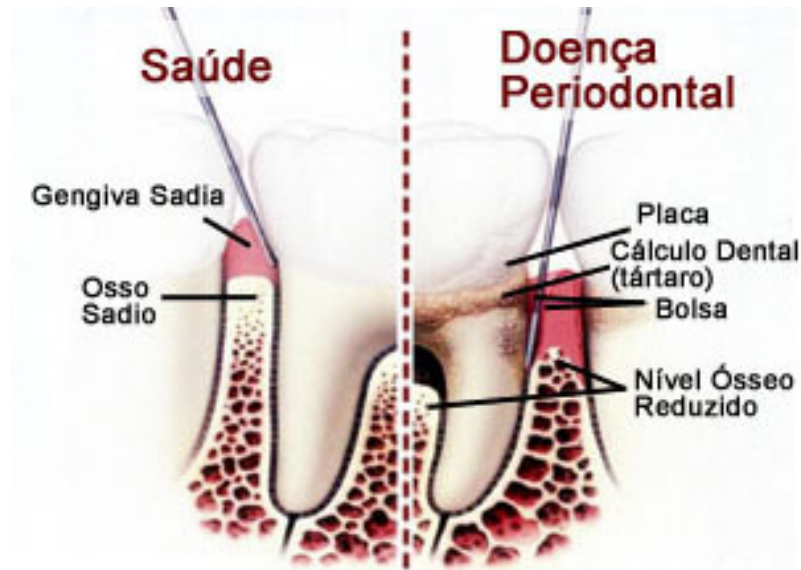


Figura 1.1 – Figura mostrando do lado esquerdo uma sonda periodontal dentro do sulco gengival penetrando até no máximo 3mm evidenciando a saúde do periodonto e do lado direito a sonda periodontal penetrando mais que 3mm configurando a presença de bolsa periodontal que é um sinal clínico da doença periodontal (nota-se a destruição óssea que é uma característica da periodontite) Fonte:http://www.periougmg.com.br/comunidade_artigo001.htm. Acesso em 14/07/2006.

A placa bacteriana envelhece através do crescimento das espécies aderidas e pela colonização e o 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 microrganismos gram-negativos anaeróbicos predominam. (KOLENBRANDER e LONDON, 1993).

A microbiota geralmente encontrada na placa bacteriana na doença periodontal difere da encontrada no tecido saudável, sendo a maioria delas gram-negativas e anaeróbicas estritas. Certas espécies são encontradas comumente em regiões abaixo do tecido gengival lesado pela doença periodontal, entre elas o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, a *Prevotella intermedia* e o *Fusobacterium nucleatum*. Estas bactérias são proteolíticas e podem degradar os tecidos gengivais e/ou componentes de defesa do hospedeiro incluindo proteínas regulatórias que são a chave da resposta inflamatória (MARSH e MARTIN, 2005).

Apesar das dificuldades inerentes na caracterização da microbiota das doenças periodontais, um pequeno grupo de patógenos é reconhecido devido à sua associação com a doença periodontal. Avanços tecnológicos na microbiologia molecular melhoraram a habilidade de detectar bactérias específicas e seus produtos, os quais podem servir de marcadores da doença em atividade ou para previsão de futura doença (HAAKE, 1997).

Exames microbiológicos da periodontite crônica foram realizados tanto em estudos seccionais cruzados como longitudinais; estes últimos foram conduzidos tanto com como sem tratamento. Estes estudos apóiam o conceito de que a periodontite do adulto está associada com agentes bacterianos específicos. O exame microscópico da placa de sítios com periodontite tem, consistentemente, revelando proporções elevadas de espiroquetas. O cultivo de microrganismos da placa de sítios com periodontite de adulto revela porcentagens de espécies anaeróbicas (90%) e gram-negativas (75%) (SLOTS, 1977, SLOTS, 1979).

Na periodontite crônica, os microrganismos mais frequentemente cultivados em altos níveis incluem *P.gingivalis*, *B. forsythus*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *A. Actinomycetemcomitans*, *P. micros* e espécies de *Treponema* e *Eubacterium* (LAI *et al.*, 1987, LOESCHE, 1985). Quando sítios ativos periodontalmente (isto é, com perda de inserção recente) foram examinados em comparação com sítios inativos (ou seja, sem perda de inserção), *C. rectus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* e *F. nucleatum* foram encontrados em níveis elevados nos sítios ativos (DZINK *et al.*, 1988). Além do mais, níveis detectáveis de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus*, *C. rectus* e *A. actinomycetemcomitans* estão associados com a progressão da doença (DZINK *et al.*, 1988), e a eliminação de patógenos bacterianos específicos com a terapia está associada à resposta clínica melhorada (CHRISTERSSON *et al.*, 1991). Demonstrou-se que tanto *P. gingivalis* quanto *A. actinomycetemcomitans* invadem tecidos celulares do hospedeiro, o que pode ser significativo nas formas agressivas da periodontite do adulto (CARRANZA *et al.*, 1983).

A microbiota associada com a periodontite agressiva é composta, predominantemente, de bacilos gram-negativos capnofílicos e anaeróbicos (NEWMAN e SOCRANSKY, 1976, NEWMAN e SOCRANSKY, 1977). Estudos

microbiológicos indicam que quase todos os sítios de Periodontite Agressiva abrigam *A. actinomycetemcomitans*, o qual pode constituir quase 90% da microbiota total cultivável (KORNAM e ROBERTSON, 1985, MOORE, 1987). Outros organismos encontrados em níveis significativos são *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *B. capillus*, *Eubacterium brachy*, espécies de *Capnocytophaga* e espiroquetas (KORNAM e ROBERTSON, 1985, MICHALOWICZ *et al.*, 2000).

O tratamento e a prevenção da doença periodontal envolvem boa higiene oral, que pode ser melhorada pelo uso de agentes antimicrobianos (MARSH e MARTIN, 2005).

Jolkovsky e Ciancio (1997) relataram que o uso de antibióticos no tratamento das doenças periodontais é baseado em sua natureza infecciosa. Entretanto, há dificuldade na identificação dos microrganismos associados com as várias desordens periodontais, dificultando, assim, a escolha do antibiótico. Além disso, os autores acima mencionados citaram que Gibson² (1982) afirma que um antibiótico para o uso no tratamento periodontal tem de ser específico para os patógenos periodontais, alogênico e atóxico, possuir substantividade, não ser usado com frequência em outros tratamentos nem ser caro. Atualmente não existe antibiótico ideal na escolha em questão. Apesar de muitas bactérias orais serem susceptíveis a alguns, eles não inibem todos os patógenos periodontais nas concentrações alcançadas nos líquidos do fluido gengival. Portanto, torna-se necessária uma combinação de antibióticos para eliminar tais patógenos de uma bolsa periodontal. Quanto ao uso local de antibióticos, apesar da vantagem de serem direcionados para sítios específicos.

Nas últimas décadas antimicrobianos locais têm sido utilizados na tentativa de tratar as infecções associadas à periodontite. Irrigação local e dispositivos de liberação controlada, com antibióticos e anti-sépticos, foram desenvolvidos e avaliados como tratamento único, ou adjunto ao tratamento mecânico (raspagem e alisamento das raízes dos dentes). A utilização de antimicrobianos locais seria uma opção de tratamento, já que traria os seguintes benefícios: maior concentração da droga no local, redução de efeitos

² Gibson W. Antibiotics and periodontal disease: a selective review of the literature. J Am Dent Assoc 1982 104:213.

sistêmicos, diminuição do risco de resistência em outros locais do organismo, além de ser opção de tratamento antimicrobiano para pacientes não cooperadores para a antibioticoterapia sistêmica. Por outro lado, a eficácia do antimicrobiano local estará na dependência do tempo de contato entre a droga e o microrganismo alvo e da concentração adequada desta dentro da bolsa periodontal (LOTUFO *et al.*, 2005).

A terapia fotodinâmica para a redução de bactérias periodontais pode ser um novo caminho, pois é baseada no princípio de que uma substância fotoativável, um fotossensibilizador (corante), liga-se à célula alvo e é ativada por uma luz com comprimento de onda específico (ressonante com o corante). Neste processo se formam radicais livres ou oxigênio singlete que produzem efeito tóxico para a célula (FIG. 1.2) (PFITZNER *et al.*, 2004).

As primeiras fontes de luz utilizadas em terapia fotodinâmica foram às lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática, com forte componente térmico associada. Com o desenvolvimento dos lasers, esta fonte de luz se mostrou mais eficiente que as lâmpadas por serem monocromáticos e coerentes no tempo e espaço. Os lasers em baixa intensidade podem ser associados à fotossensibilizadores conhecidos, com bandas de absorção ressonantes ao comprimento de onda do laser usado, sendo assim capazes de absorver a maior parte da radiação emitida pela fonte de luz (ACKROYD *et al.*, 2001).

O laser apresenta características particulares que o diferem das demais fontes luminosas, como monocromaticidade, caracterizada pela emissão de fótons com o mesmo comprimento de onda e, portanto, se estiverem no espectro visível apenas uma cor; coerência, além da direcionalidade, definida pela capacidade da luz de se propagar em uma única direção (ANEXO 1) (SOUSA, 2001).

Uma fonte de luz alternativa para a terapia fotodinâmica são os LEDs (Light Emitting Diode – Diodos Emissores de Luz), que também são monocromáticos e se diferem dos lasers por terem seu feixe de luz divergente e que surgem como uma nova opção (ANEXO 1).

Na Periodontite, como em outras infecções localizadas, de pouca profundidade e de microbiota conhecida, o uso da terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa de tratamento através da redução das bactérias

periodontopatogênicas da bolsa periodontal e diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, documentam a validade da terapia (RIBEIRO, et al. 2005).

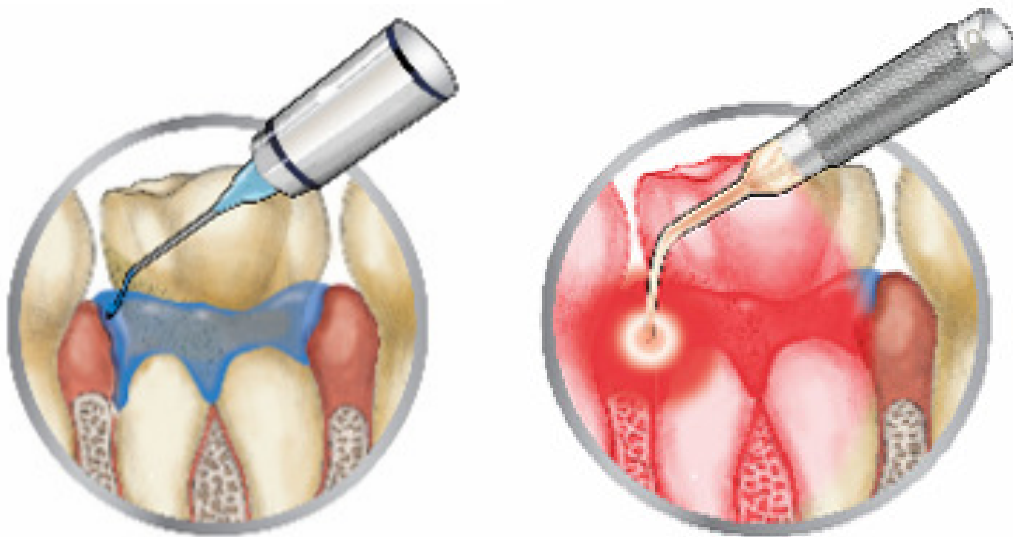


Figura 1.2 – O agente fotossensibilizador é depositado dentro da bolsa periodontal com auxílio de uma seringa (imagem esquerda) e com auxílio de uma fibra ótica a luz do laser em baixa intensidade é irradiado dentro da bolsa periodontal (imagem direita).

Fonte: Modificado de www.periowave.com Acesso em 14/07/2006.

2- Objetivo

2.1 – Objetivo Geral

Comparar a sensibilização letal das bactérias periodontopatogênicas *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* com a utilização de Lasers e LED no processo de redução bacteriana *in vitro*, tendo como fotossensibilizador o corante azul de toluidina (TBO) a 0,01%.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliação quantitativa visual e através de um sistema de aquisição de imagens digital, das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml), em triplicata nas placas de *Petri*;
- Análise dos resultados obtidos e avaliação comparativa entre os grupos irradiados ou não pela técnica de terapia fotodinâmica para os três equipamentos usados.

3 – Revisão de Literatura

3.1 – Bactérias periodontopatogênicas submetidas a fotossensibilização

3.1.1 - *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foi isolado pela primeira vez pelo microbiologista alemão *Klinger*, em 1912, de lesões de actimicose cervicofacial. Apresentam aspectos morfológicos internos em forma de estrela e as células são cocobacilos não móveis, gram-negativas e que fermenta açúcares, tendo como nicho ecológico à placa bacteriana. Está intimamente ligado à patogênese da doença periodontal, sendo sempre encontrado em grandes quantidades nas Periodontites Agressivas, que é uma forma grave da doença periodontal. O tratamento que resulta na eliminação do *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dos locais subgengivais pode ser correlacionado com a melhora clínica. (GENCO *et al.* 1996).

A terapia efetiva para a infecção subgengival causada por esta bactéria e, assim, para a doença periodontal devida a esse microrganismo, necessariamente implica no uso de antibioticoterapia em combinação com cirurgias periodontais. (ZAMBON *et al.* 1981).

O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foi implicado na etiologia de formas particularmente agressivas de doença periodontal em adolescentes. Tem sido descrito como sendo microaerofílico, capnofílico ou anaeróbico facultativo, apesar de parecer que cresce melhor em atmosfera aeróbica enriquecida com 5-10% de CO₂. O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* é também um patógeno oportunista, sendo isolado de casos de endocardite infecciosa, abscessos do cérebro e subcutâneos, osteomielite e doença periodontal. (MARSH e MARTIN, 2005).

3.1.2 - *Fusobacterium nucleatum*

Outro grande grupo de bactérias Gram-negativas anaeróbicas obrigatórias pertence ao gênero *Fusobacterium ssp.* As células possuem caracteristicamente a forma de filamentos longos (5-25µm de comprimento) e incluem as seguintes espécies orais: *F. alocis* e *F. sulci*, do sulco gengival normal e *F. periodonticum*, de áreas com doença periodontal. A espécie isolada mais comum, contudo, é o *Fusobacterium nucleatum*. As fusobactérias requerem meios ricos para crescimento e são muitas vezes descritas como sendo assacarolíticas, embora possam utilizar carboidratos para síntese de compostos intracelulares de armazenamento compostos de poliglicose. As fusobactérias catabolizam aminoácidos como o aspartato, glutamato, histidina e lisina para obter energia; esta pode ser obtida do metabolismo de peptídeos, caso aminoácidos livres não estejam disponíveis. O principal produto do metabolismo é o butirato, juntamente com baixas concentrações de outros ácidos (por exemplo, succinato, acetato, lactato, entre outros). O *Fusobacterium nucleatum* é capaz de remover enxofre da cisteína e metionina para produzir amônia, butirato, sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana. Os dois últimos compostos são altamente fétidos e estão implicados no odor associado com a halitose. As fusobactérias são capazes de co-agregar com a maioria das outras bactérias orais e, conseqüentemente, acredita-se que sejam importantes organismos de ponte entre os colonizadores iniciais e tardios durante a formação da placa bacteriana (MARSH e MARTIN, 2005).

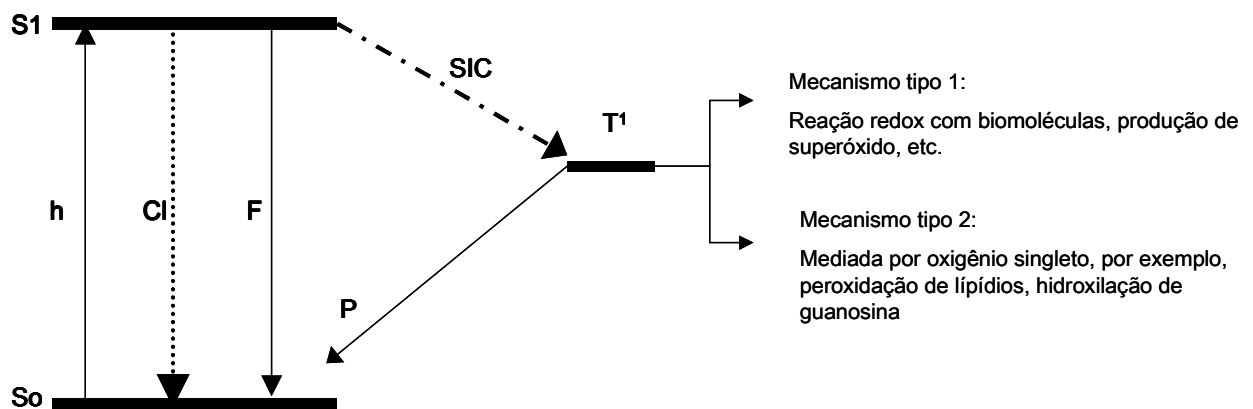
3.1.3 – *Prevotella intermedia*

A maioria dos bacilos gram-negativos anaeróbicos orais foi colocada originalmente no gênero *Bacteróides*. Contudo, estudos taxonômicos mostraram que este gênero deveria ter uma definição mais restrita, com seus membros restritos àqueles do grupo *B. fragilis*, que são encontrados predominantemente no intestino. Os organismos orais assacarolíticos e sacarolíticos foram colocados nos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*, respectivamente. A nova classificação dos *Bacteróides* implicou que várias cepas fossem colocadas no gênero *Prevotella*. As espécies dentro deste grupo

são moderadamente sacarolíticas, produzindo ácido acético, succínico e outros ácidos da glicose. Este novo gênero inclui as espécies pigmentadas *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* e outras cepas. As cepas de *P. intermedia* geralmente têm maior atividade peptidase e estão associadas mais com a doença periodontal (MARSH e MARTIN, 2005).

3.2 - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica

De acordo com Garcez Segundo *et al.* (2003), a terapia fotodinâmica ou PDT (*Photodynamic Therapy*) consiste na associação de um agente fotossensibilizante, normalmente exógeno, a uma fonte de luz com o objetivo de provocar necrose celular, utilizada para tratamento de tumores e para morte microbiana. O mecanismo de ação faz com que o agente fotossensibilizante absorva os fótons da fonte de luz. Sendo assim, seus elétrons passam a um estado excitado (camada mais externa) (FIG. 3.1). Na presença de um substrato, como é o caso do oxigênio, o agente fotossensibilizante, ao retornar ao estado natural, transfere energia, formando espécies altamente reativas e de vida curta, como é o caso do oxigênio singlete (1O_2). Este pode provocar danos a microrganismos, pela oxidação irreversível de componentes celulares, como membrana celular, mitocôndrias e núcleo celular.



Onde: So=estado fundamental singlete; S1=primeiro estado singlete excitado; SIC=inter-sistemas cruzados; T1=primeiro estado tripleto excitado; F=fluorescência; P=fosforescência; CI=conversão interna:

FIGURA 3.1 - Diagrama de Jablonski - Esquema da transferência de elétrons pelos mecanismos Tipo I e Tipo II com produção de oxigênio singleto, ânions superóxidos e hidroxilas por fluorescência e fosforescência. Fonte: Gutknecht; Eduardo, 2004 p.232.

Segundo Malik et al., (1990) o dano celular induzido pelas reações fotoativadas é o resultado da formação de espécies reativas de oxigênio. Inicialmente se forma o oxigênio singleto (1O_2). A absorção de um fóton de luz vai levar as moléculas do corante a um estado singlete excitado. Essas moléculas passam por um sistema intermediário e chegam a um estado tripleto excitado, em que as moléculas mais estáveis vão interagir, na água, com o oxigênio, gerando o oxigênio singleto (1O_2). Além dessas reações, o corante do estado tripleto excitado pode sofrer outras reações formando radicais livres, hidroxilas e superóxidos.

Como foi demonstrado por Zanin e Gonçalves (2003), a maioria das bactérias orais não absorve a luz visível de alguns tipos de laser que operam em baixa potência. Portanto, utiliza-se um agente de absorção óptica não-tóxico que se fixe à parede bacteriana, atraindo para si a luz laser no momento da irradiação. Isso é essencial para que o laser terapêutico tenha ação antimicrobiana sobre as bactérias orais. Durante a terapia fotodinâmica, as bactérias expostas ao fotossensibilizador são irradiadas por uma luz de comprimento de onda compatível, o que promove a absorção de fótons pelo

corante, em virtude do estado de excitação. A seguir, a energia é transmitida para as moléculas vizinhas, determinando a formação de moléculas reativas, como o oxigênio singleto, íons superóxidos, hidroxilas e outros radicais livres, que danificam e até matam as células bacterianas. O fotossensibilizador funciona como um agente de absorção óptica, sendo essencial usar um corante adequado ao comprimento de onda do laser utilizado, para assegurar que ele não apresente danos aos tecidos.

Bhatti *et al.* (1998) relatam que o mecanismo de ação pelo qual o corante associado ao laser de baixa intensidade causa morte celular ainda não está totalmente compreendido. Existem duas hipóteses:

1) Transferência direta de elétrons entre corante e moléculas biológicas;

2) Transferência de energia, pela excitação do corante, para as moléculas de oxigênio, resultando na formação de oxigênio singleto.

Segundo Wilson (1993), um requisito importante, na fotossensibilização letal, é que o tempo de vida útil do substrato excitado seja suficiente para permitir a interação com as moléculas vizinhas para, assim, produzir espécies citotóxicas. O autor lembra que, para a terapia fotodinâmica ser apta a combater doenças periodontais, deve ser capaz de eliminar as bactérias presentes no biofilme.

Mais especificamente, o mecanismo Tipo I acontece quando o composto fotoativo no estado singleto (S_1) ou tripleto (T_1) pode, por reações de oxidação e redução com diferentes biomoléculas, ser foto-reduzido a ânion radical, que por transferência de um elétron à molécula de oxigênio, gera espécies reativas como peróxidos (ROO^\cdot), ânion superóxido (O_2^-), ânion radical hidroxila (OH^\cdot), provocando a destruição da membrana ou de macromoléculas. Finalmente o fotossensibilizador volta para seu estado fundamental. No mecanismo Tipo II, a molécula no estado T_1 transfere sua energia para a molécula de oxigênio cujo estado fundamental é tripleto (3O_2), formando finalmente seu estado excitado singleto (1O_2). O oxigênio singleto é o fator intermediário no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação da célula. O 1O_2 pode induzir várias reações em cadeia com componentes moleculares da célula, tais como: DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular,

mitocôndrias e lisossomos, tendo como resultado a morte da célula, e de um modo geral a destruição do tecido (BORISSEVITCH e SCHABERLE, 2006).

O fator que determina se vai ocorrer reações do Tipo I ou Tipo II, é a competição entre o substrato e o oxigênio molecular pelo estado excitado do sensibilizador. Em sistemas atualmente usados na clínica, a porcentagem de ocorrência do mecanismo tipo I é de aproximadamente 10% enquanto a ocorrência do mecanismo tipo II é de até 90 %. Este parâmetro pode variar, dependendo, entretanto, das características do sensibilizador usado como da natureza do alvo da sua ação (BORISSEVITCH e SCHABERLE, 2006).

A eficácia da terapia fotodinâmica é atribuída a reações bimoleculares entre os estados excitados S_1 e T_1 do sensibilizador e as moléculas alvo ou de oxigênio formando seu estado excitado. Por isso ela é maior quando os rendimentos quânticos dos estados excitados são maiores e seus tempos de vida são mais longos, pois neste caso a probabilidade de encontro entre a molécula excitada do fotossensibilizador e de outro reagente é maior (BORISSEVITCH e SCHABERLE, 2006).

3.2.1 - Tipos de destruição bacteriana (Necrose e apoptose)

A terapia fotodinâmica pode produzir apoptose ou necrose celular, ou a combinação dos dois mecanismos, sendo que a maioria dos casos induz o primeiro. A apoptose é também conhecida como “morte celular programada”. Esse processo fisiológico de eliminação celular ocorre também na embriogênese, na atrofia tecidual e na regressão tumoral, sendo a cromatina condensada uma das características morfológicas. Limita a perda de material intracelular e, desse modo, previne o processo inflamatório. Em contraste, a necrose resulta de elevados danos celulares, com perda da integridade da membrana plasmática, causando lises e dando início ao processo inflamatório (PAZOS *et al.* 2003).

Além disso, a “morte celular programada” proporciona um mecanismo de defesa por meio dos quais as células lesadas ou potencialmente perigosas

possam ser eliminadas para o bem do organismo para um todo. Células infectadas por vírus sofrem frequentemente “morte celular programada”, impedindo desta forma a produção de novas partículas virais e limitando a disseminação do vírus através do organismo do hospedeiro (COOPER, 2001).

Segundo Ten Cate (2001), a apoptose é um tipo de morte celular que resulta numa eliminação seletiva. Tal processo fisiológico caracteriza-se pela condensação do DNA da célula e sua subsequente fragmentação em partículas ligadas à membrana, que são fagocitadas pelos macrófagos.

De acordo com Junqueira e Carneiro (1999), a morte celular por apoptose é rápida e não deixa vestígios. Os fragmentos apoptóticos não induzem os macrófagos a produzir moléculas sinalizadoras que desencadeiam a resposta inflamatória nos tecidos vizinhos. Já na necrose, as células incham, suas organelas também aumentam de volume e se rompem, lançando o conteúdo no espaço extracelular. Na apoptose, ao contrário, os fragmentos celulares estão sempre envoltos por membrana plasmática. Outro ponto a considerar é que o conteúdo das células que morrem por necrose também é fagocitado pelos macrófagos, mas estes secretam moléculas que vão ativar outras células de defesa, que promovem a inflamação.

3.3 – Corantes (fotossensibilizadores)

De acordo com Garcez Segundo (2002), as pesquisas, no campo dos corantes, se concentraram nas porfirinas, que têm estrutura química heterocíclica, similar à da clorofila e da hemoglobina. Os fotossensibilizadores ou corantes absorvem a luz na forma de fótons e transferem energia ao oxigênio e a outras moléculas, resultando na liberação de substâncias altamente reativas e de vida curta, que interagem com os sistemas biológicos, provocando danos aos tecidos. No entanto a toxicidade dos fotossensibilizadores mais utilizados em PDT ainda é elevada, tornando o uso viável apenas em concentrações pequenas, o que diminui a absorção de luz e,

conseqüentemente, a eficácia. A procura por agentes fotossensibilizantes menos tóxicos, de maior absorção, mais ressonantes com os comprimentos de onda utilizados e mais eficientes tem sido uma constante no campo da terapia fotodinâmica, tanto no tratamento de tumores, como na eliminação de microrganismos. Assim, quanto mais próximos do ideal os novos agentes fotossensibilizantes se mostrarem, melhor será a utilização do potencial da terapia fotodinâmica na redução microbiana.

Bhatti *et al.* (1998) afirmaram que, como o corante de azul de toluidina pode ser aplicado na bolsa periodontal com seringa de ponta romba e o laser, com fibra óptica, a terapia fotodinâmica não é dolorosa, ao contrário de outros procedimentos periodontais.

A possibilidade de um composto funcionar como fotossensibilizador é determinada, em parte, pela sua capacidade de absorver luz do comprimento de onda emitido pela fonte. Não é surpresa, pois, que o azul de toluidina seja um eficiente fotossensibilizador associado ao laser de baixa intensidade de HeNe, pois a sua absorção máxima está no comprimento de onda de 632,2nm, ressonante ao da fonte de laser HeNe (Hélio-Neon), que é de 632,8nm. O corante de azul de metileno, que tem sua absorção máxima sob o comprimento de onda de 664nm, tem ainda uma apreciável absorção a 633nm. Contudo a absorção deste é 10 vezes menor que a do azul de toluidina no comprimento de onda do laser HeNe. Já os corantes derivados da hematoporfirina e a ftalocianina dissulfonada de alumínio, a 632,8nm, não apresentam boa absorção (WILSON, *et al.* 1993).

3.3.1 – O Azul de Toluidina

O azul de toluidina (FIG. 3.4) é um corante usado rotineiramente na clínica médica e odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas, principalmente com o biofilme aderido aos dentes.

A molécula deste corante é derivada da fenotiazina e os valores de rendimento quântico de fluorescência do corante obtidos experimentalmente em metanol (MeOH), etanol (EtOH), propanol-1 (PrOH) e butanol-1 (BuOH), são respectivamente: 0,09, 0,10, 0,11 e 0,12; e os valores dos comprimentos de onda máximo de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), e o deslocamento espectral ou de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$) dos corantes dependem da polaridade do solvente, como pode ser visto nos dados apresentados na tabela a seguir (USACHEVA *et al.*, 2003) (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Solventes	MeOH	EtOH	PrOH	BuOH
TBO (λ_{abs}) em nm	627	629	630	631
TBO (λ_{em}) em nm	650	646	647	650
$\Delta\bar{\nu}$ em cm^{-1}	564	418	417	463

Figura 3.2 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}) em nanômetros, bem como o deslocamento de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$) para o corante azul de toluidina (TBO), T=298K (USACHEVA *et al.* 2003).

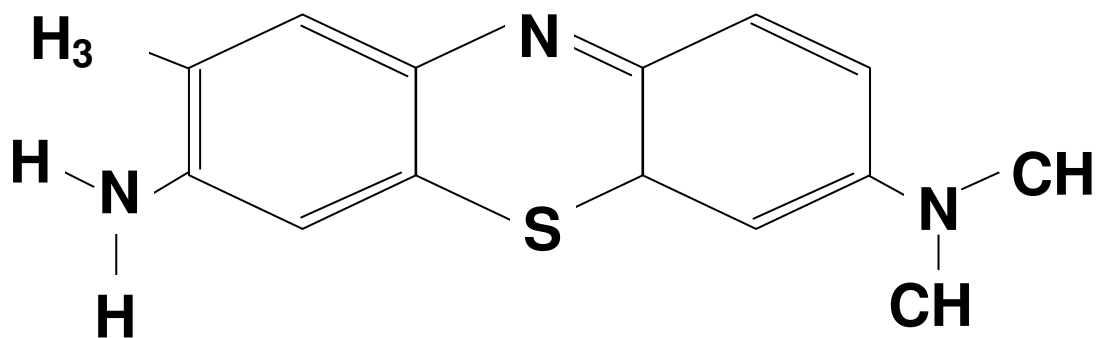


Figura 3.3 – Representação da estrutura química da molécula do azul de toluidina (TBO). Modificado de Oliveira *et al.*, 2003 p.5.

3.3.2 - Concentração do fotossensibilizador

A concentração do corante é outro fator de relevância para o sucesso da terapia. Devem ser utilizadas concentrações não tóxicas, ou seja, a concentração escolhida não deve produzir danos ao alvo sem a ativação pela fonte de luz (toxicidade no escuro). As concentrações utilizadas variam de um fotossensibilizador para outro de acordo com as características químicas de cada composto e de sua toxicidade. As concentrações típicas usadas em PDT antimicrobiana são da ordem de $\mu\text{g/ml}$ (Ribeiro *et al.*, 2005).

3.3.3 - Tempo de pré-irradiação

A interação do agente fotossensibilizador com o substrato, muitas vezes é um ponto crítico para o sucesso da terapia, uma vez que, se o fotossensibilizador não estiver próximo ao alvo, sua ativação pela fonte de energia resultará na formação das espécies tóxicas em local não desejado. O tempo de pré-irradiação, que é o tempo entre a colocação do fotossensibilizador no alvo e sua ativação pela fonte de luz, varia de acordo com a interação desejada. Para a PDT anti-neoplásica, o fotossensibilizador é aplicado via endovenosa e o tempo de pré-irradiação pode chegar a 48 horas. Nas aplicações tópicas da PDT, principalmente antimicrobiana, espera-se que o corante una-se ao microrganismo, ou mesmo chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular, localizando-se no citoplasma da célula ou mesmo intercalando-se com o DNA do núcleo. Os tempos de pré-irradiação típicos utilizados em PDT antimicrobiana vão de um a dez minutos (Ribeiro *et al.*, 2005).

3.4 - Aplicação da Terapia Fotodinâmica na Periodontia e outros campos.

Wilson, Dobson e Harvey (1992) testaram *in vitro* vinte e sete compostos fotossensibilizadores associados a um laser de HeNe com 7,5mW de potência, avaliando a capacidade de sensibilizar e eliminar as bactérias *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococos sanguis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Dentre esses compostos estudados, os corantes azul de toluidina, azul de metileno e cloridrato azure B nas concentrações de 0,005% foram efetivos contra as quatro espécies de bactérias, com tempo de exposição ao laser de apenas 30 segundos. Como esses microrganismos estão envolvidos em um grande número de infecções orais, incluindo gengivite e periodontite, os resultados implicaram que a terapia fotodinâmica pode ser efetiva no tratamento dessas infecções.

Wilson (1993) mostrou que os corantes azul de toluidina, azul de metileno e cloridrato de azure B (todos na concentração de 50 µg/ml) foram fotossensibilizadores efetivos para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *F.nucleatum* e *S.sanguis*, quando expostos *in vitro* ao laser HeNe de 7,3mW, por 30 segundos. Mas não houve evidência de morte bacteriana somente com os corantes na ausência da luz laser. Os derivados da hematoporfirina mostraram-se fracos para sensibilizar *A.a*, *F.nucleatum* e *S.sanguis*, sendo efetivos somente contra o *P.gingivalis*. Isso pode ser atribuído à inabilidade do corante de absorver luz com o comprimento de onda utilizado, que foi de 632,8nm. Mas, usando-se 500-560nm, os derivados de hematoporfirina podem ser excelentes fotossensibilizadores.

Wilson, Dobson e Sarkar (1993) verificaram *in vitro* a fotossensibilização letal de bactérias orais anaeróbias (*P.gingivalis*, *F.nucleatum* e *A.a*), utilizando laser de HeNe, 7,5mW, por 80 segundos, com quatro corantes (azul de metileno, azul de toluidina, ftalociacina dissulfonada de alumínio e diematoporfirina éster, todos com concentração de 25 µg/ml). Os autores chegaram a resultados importantes. O corante azul de toluidina e azul de metileno tiveram efeito letal, quando associados ao laser de baixa intensidade, para essas três bactérias. No caso do *P.gingivalis*, 20% das

mortes obtidas na fotossensibilização letal podem ser atribuídas apenas ao efeito tóxico do corante azul de toluidina. Já para *A.a.* e *F.nucleatum*, a toxicidade do corante foi responsável por 8,1% e 16,2%, respectivamente, das mortes atribuídas à combinação laser/corante. Azul de toluidina causou redução estatisticamente significativa, na ausência do laser, somente no *A.a.*, mas azul de metileno, na ausência do laser, não causou redução das colônias de *P.gingivalis*, *A.a.*, *F.nucleatum*. Na ausência do fotossensibilizador, a exposição ao laser não teve efeito significativo na viabilidade das colônias. Já os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio e dihematoporfirina éster, associados ao laser de baixa intensidade, tiveram efeito letal somente para o *P.gingivalis*. Entretanto o corante ftalocianina dissulfonada de alumínio foi tóxico para esta bactéria e para o *A.a.*, na ausência do laser, mas não para o *F.nucleatum*.

É importante destacar que, de acordo com o estudo de Wilson, Dobson e Sarkar (1993), azul de toluidina e azul de metileno foram os fotossensibilizadores mais efetivos, permitindo reduções apreciáveis nas colônias de *P.gingivalis*, *A.actinomycescomitans* e *F.nucleatum*. Entretanto, outros aspectos da técnica precisam de mais estudos, como os relacionados com concentração do corante, doses do laser e frequência do tratamento.

Wilson e Dobson (1993) investigaram *in vitro* o potencial de três tipos de compostos, azul de toluidina, derivados de hematoporfirina e ftalocianina dissulfonada de alumínio, todos com concentração de 25µg/ml, agindo na fotossensibilização letal do *P.gingivalis* e do *F.nucleatum*, ambos relacionados com a patogênese da periodontite. Foi usado um laser de HeNe com uma potência de 7,3mW e uma densidade de 22J/cm² (292mJ). O comprimento de onda emitido foi de 632,8nm. Os autores chegaram aos seguintes resultados: exposições dos microrganismos somente ao laser, mesmo durante mais de 80 segundos, não tiveram efeito significativo; azul de toluidina ou os derivados de hematoporfirina, isolados, não apresentaram resultados; ftalocianina dissulfonada de alumínio, sem o laser, causou decréscimo no *P.gingivalis*, o que não ocorreu com o *F.nucleatum*; grandes quantidades de ambos os microrganismos foram eliminados (49,8 x 10⁶cfu/ml e 54,72 x 10⁶cfu/ml, respectivamente para *P.gingivalis* e *F.nucleatum*), com o uso de pequenas

concentrações do corante azul de toluidina e pequenas doses de laser. Entretanto, nas associações de derivados de hematoporfirina ou ftalocianina dissulfonada de alumínio com laser, os resultados não foram significativos.

Esses autores também confirmaram, no referido estudo, que o corante azul de toluidina associado ao laser HeNe apresentou os melhores resultados, sendo, pois, um corante efetivo na fotossensibilização letal dos microrganismos *P.gingivalis* e *F.nucleatum*.

Sarkar e Wilson (1993) estudaram a fotossensibilização de bactérias da placa subgingival de pacientes com periodontite crônica. Amostras da placa foram expostas a um laser de HeNe de 7,3mW de potência, por 30 segundos, usando-se 16,5J/cm² (219mJ), na presença e na ausência do corante azul de toluidina na concentração de 50µg/ml. Os autores concluíram que a combinação laser/corante alcançou significativa redução bacteriana, sendo que a média de redução foi de 91,1% nas bactérias aeróbias, 96,9% nas anaeróbias, 100% nas pigmentadas anaeróbias e 94,4% para os *Streptococcus*. Entretanto, a redução não foi significativa na presença apenas do corante. Isso sugere que o laser de baixa intensidade associado a um corante apropriado pode ser eficaz como tratamento coadjuvante ao debridamento mecânico, no tratamento periodontal.

Wilson e Pratten (1994) mostraram *in vitro* a eficácia da terapia fotodinâmica, usando-se o laser GaAs (arseneto de gálio) associado ao corante ftalocianina dissulfonada de alumínio, na fotossensibilização letal da bactéria *S.aureus*, presente em extensa gama de infecções, inclusive periodontais. Os autores concluíram que o *S.aureus*, mesmo cepas resistentes a alguns antibióticos, pode ser eliminado em cerca de 99% dos sítios infectados, quando for previamente tratado com o corante ftalocianina dissulfonada de alumínio, em concentração de 12,5µg/ml, e exposto à irradiação com laser AsGa, com comprimento de onda de 660nm, por tempo de exposição de 60 ou 120 segundos. Não houve, porém, atividade antimicrobiana significativa, quando a bactéria foi exposta ao mesmo tipo de laser ou ao mesmo corante, separadamente, mostrando a efetividade da associação laser/corante exógena, já que no tipo de bactéria estudado não foi encontrada presença de fotossensibilizador endógeno.

Os autores acima mencionados mostraram ainda a eliminação do *S.aureus* pela associação de fonte de luz branca com o corante exógeno hematoporfirina. Entretanto para obter efeito similar ao do laser, usaram o referido corante em alta concentração e exposição à luz branca em período longo. Já com o laser, devido à grande densidade energética, verificam-se várias vantagens, permitindo menor tempo de exposição, mas mantendo o efeito bactericida da associação com o corante ftalocianina dissulfonada de alumínio, este em concentração menor que a da hematoporfirina.

Wilson e Pratten (1995) confirmaram, *in vitro*, que o *S.aureus* pode ser eliminado com a terapia fotodinâmica, utilizando-se, como corante, o azul de toluidina (12,5µg/ml) e o laser HeNe (0,88J e comprimento de onda de 632,8nm), sendo que foi encontrada uma redução de 95% na contagem viável do microrganismo. Entretanto não houve redução significativa nessa contagem, quando foi exposto à mesma dosagem de laser HeNe, na ausência do corante. Utilizando-se, porém, dosagem maior do laser (3,5J), houve eliminação do *S.aureus* estatisticamente significativa, mesmo na ausência do azul de toluidina, o que revelou a presença do fotossensibilizador endógeno nesse organismo. A concentração do azul de toluidina utilizada foi de 12,5µg/ml, havendo aumento da redução do microrganismo com o aumento da concentração do corante. Mesmo assim a associação laser GaAs/ftalocianina dissulfonada de alumínio mostrou-se mais efetiva para eliminar o *S.aureus* que a associação laser HeNe/azul de toluidina.

Wilson e Yianni (1995) estudaram se é possível eliminar cepas de *S.aureus* MRSA (resistentes ao antibiótico meticilina) pela associação de laser HeNe (35 mW,15s) e corante azul de toluidina (12,5µg/ml). Os resultados mostraram que a associação tem efeito sobre as bactérias em questão. Isso é um fator de grande importância clínica, devido à dificuldade de eliminá-las. É importante destacar que esses autores mostraram que, se a dose de energia e a concentração de corante requerida para eliminar células bacterianas forem menores que as exigidas para eliminar células humanas, a terapia fotodinâmica pode ser usada para eliminação seletiva, sem danos às células adjacentes do hospedeiro, *in vivo*. Além disso, para maior segurança, anticorpos podem ser ligados ao corante contra a bactéria-alvo.

Wilson *et al.* (1995) avaliaram se bactérias da placa supragengival poderiam ser eliminadas pela associação laser/corante. Para isso utilizaram placas bacterianas obtidas de dez voluntários, que foram tratadas com azul de toluidina (TBO)/HeNe ou ftalocianina dissulfonada de alumínio (AIPcS₂)/GaAs. Para ambos os casos foi encontrada redução significativa das bactérias anaeróbias e do gênero *Streptococcus* e *Actinobacillus*. Entretanto, a associação HeNe/TBO foi mais efetiva que a outra. Isso pode ser explicado pelo fato de ser o comprimento de onda do HeNe (632,8nm) ressonante com o pico de absorção do azul de toluidina (632nm). Já o AsGa apresentou um comprimento de onda de 660nm e o pico de absorção do AIPcS₂ é de 675nm. Neste estudo, nem o laser isoladamente nem os fotossensibilizadores apresentaram efeito significativo na eliminação das bactérias em questão.

Os mesmos autores destacaram as vantagens da terapia fotodinâmica comparadas às do uso de antimicrobianos, como o não-desenvolvimento da resistência bacteriana e ausência de necessidade de se manterem altas concentrações do fotossensibilizador por longos períodos.

Henry *et al.* (1996) estudaram a ação do laser de argônio em baixa intensidade com comprimento de onda entre 488-514nm, *in vitro*, sobre biofilmes onde havia *P.intermedia* e *P.gingivalis*, entre outras espécies bacterianas. Essas bactérias, do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella*, são classificadas como bacteróides ou bactérias de pigmento negro. A descrição é determinada pela aparência das colônias ou biofilmes cultivados no ágar sangue, em que o pigmento predominante é uma porfirina.

Esses autores chegaram ao seguinte resultado: o laser de argônio foi eficiente para eliminar espécies do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella*. Então, como não foi adicionado nenhum fotossensibilizador exógeno, conclui-se que essas espécies bacterianas possuem fotossensibilizadores endógenos, que, como já dito, são porfirinas. Assim o comprimento de onda utilizado foi ressonante com o pico de absorção da porfirina. É importante destacar também a relação inversa entre a maturação do biofilme e a fototoxicidade dos bacteróides.

Wilson, Burns e Pratten (1996) estudaram, *in vitro*, a susceptibilidade do *S.sanguis*, no biofilme, à terapia fotodinâmica, com a associação do laser

GaAIs com os seguintes parâmetros 660nm, 11mW, 12,2J mais o corante AlPcS₂(675nm). Para isso, fizeram o microrganismo crescer em condições similares às existentes na cavidade oral, utilizando hidroxiapatita como substrato e saliva artificial como fonte de nutriente. Os autores lembraram que as bactérias nos biofilmes são consideravelmente menos susceptíveis a agentes antimicrobianos e que o uso difundido destes está gerando bactérias resistentes. Mesmo assim, a terapia fotodinâmica mostra-se como uma alternativa, já que houve substancial redução do *S.sanguis*, bactéria presente em grande número na placa bacteriana, após uso laser/corante. No entanto, nenhum dos dois, isolados tiveram efeito significativo sobre *S.sanguis*.

Soukos *et al.* (1996) avaliaram os efeitos fotodinâmicos, *in vitro*, da associação do laser HeNe 7,3mW e do corante azul de toluidina sobre os queratinócitos e fibroblastos gengivais humanos e sobre o *S. sanguis*. O objetivo do trabalho foi avaliar se a terapia fotodinâmica poderia ser usada no tratamento da doença periodontal, sem provocar danos aos tecidos adjacentes. Os resultados mostraram que o azul de toluidina é citotóxico para queratinócitos e fibroblastos gengivais *in vitro* e esses efeitos tóxicos são dose-dependentes. Assim, os autores concluíram que o uso de baixas concentrações do corante (2µg/ml ou 5µg/ml TBO) associadas à exposição ao laser HeNe por dois minutos provocou a eliminação do *S.sanguis*, mas não reduziu a viabilidade celular dos queratinócitos e dos fibroblastos.

Bhatti *et al.* (1997) estudaram a influência de alguns fatores, como o pH, concentração do corante, presença do soro sangüíneo, fases de crescimento do microrganismo, tempo de pré-irradiação e dose de luz usada na fotossensibilização letal do *P.gingivalis*. Para isso, usaram azul de toluidina e laser HeNe. Os resultados obtidos foram os seguintes: Em presença do azul de toluidina, foi obtido efeito do laser dose-dependente. Não houve efeito significativo no número de *P.gingivalis* quando a concentração do azul de toluidina foi aumentada de 12,5 para 50,0µg/ml. Aumento no tempo da pré-irradiação gerou discreto aumento de mortes dos microrganismos. Alto número de mortes foi encontrado nos três pHs estudados (6,8 a 8,0). O estudo mostrou também que células das três fases de crescimento do microrganismo foram susceptíveis à fotossensibilização letal, apesar de as da fase estacionária ser

discretamente menos susceptíveis e as da fase log ser ligeiramente mais susceptíveis. A apreensão máxima do azul de toluidina ocorreu por volta de 60 segundos, sendo a absorção menor no soro que em solução salina.

Bhatti *et al.* (1998) estudaram a distribuição do corante nas células do *P.gingivalis* e os possíveis mecanismos envolvidos na fotossensibilização letal deste, utilizando azul de toluidina (25µg/ml) e laser de HeNe (0,88J/cm²). Os efeitos da fotossensibilização foram avaliados pela mensuração da fluorescência do triptofano e eletroforese de proteínas. O envolvimento das espécies citotóxicas na fotossensibilização letal foi investigado com uso do óxido deutério, que prolonga a vida ativa do oxigênio singlete e dos radicais livres, sendo estes possíveis mediadores do dano celular ocorrido na fotossensibilização letal.

Neste estudo, os autores chegaram aos seguintes resultados: 86,7% do azul de toluidina aglutinaram-se na membrana externa do *P.gingivalis*; foram encontrados 5,4% na membrana plasmática, alterando a geração de energia (ATP) e o metabolismo anabólico e catabólico celular; foi encontrado 1,9% nas proteínas citoplasmáticas, 5,7% em outros constituintes citoplasmáticos e somente 0,25% no DNA. Além disso, foi encontrada pequena porção do azul de toluidina livre, que também pode ser responsável por certo dano celular. Nem o laser HeNe, nem o azul de toluidina aplicados isoladamente tiveram efeito nas massas moleculares das proteínas; somente houve efeito, quando as células foram previamente tratadas com azul de toluidina e expostas ao laser HeNe. Foi verificado o envolvimento do oxigênio singlete no processo de morte celular por fotossensibilização letal, mas a ação específica dos radicais livres não pôde ser comprovada pelo estudo em questão. Isso se deve, provavelmente, ao baixo pH dos radicais livres, sendo que o *P.gingivalis* não sobrevive em um pH inferior a 6,0. Mesmo assim, o envolvimento dos radicais livres na morte celular por fotossensibilização não fica excluído. Os autores em questão fazem referência a outro estudo, com a associação do *S.mutans*, azul de toluidina e laser HeNe, que confirma o envolvimento do oxigênio singlete e dos radicais livres na morte celular, durante a terapia fotodinâmica.

Bhatti *et al.* (1998) verificaram ainda que, durante a fotossensibilização letal, o oxigênio singlete pode interagir com aminoácidos foto-oxidáveis de uma

proteína e produzir espécies reativas que podem interagir com radicais e aminoácidos de outra proteína, formando um *cross-link*. Assim, a ocorrência do dano enzimático permite que se estabeleçam três hipóteses: destruição de aminoácidos das cadeias peptídicas (principalmente timina e guanina, que são os principais aminoácidos-alvo da fotossensibilização letal); ruptura da cadeia peptídica e separação das pontes de oxigênio. Após análises da membrana externa e da membrana plasmática do *P.gingivalis*, identificando proteínas fotossensibilizáveis, os autores concluíram que danos a essas proteínas e ao DNA são a principal causa da morte celular na presença de azul de toluidina, após irradiação com laser de HeNe.

Jackson *et al.* (1999) investigaram, *in vitro*, a morte microbiana da *Candida albicans* pela terapia fotodinâmica, nas formas de levedura e hifa. O tratamento convencional da candidíase (infecção oportunista causada pela *C.albicans*) feito com agentes antifúngicos, como o fluconazol, não tem mostrado sempre sucesso, já que pode haver resistência da *C. albicans* a esses agentes. Assim, neste estudo, os autores mostraram uma alternativa de eliminação do fungo, com o laser de HeNe com comprimento de onda de 632,8nm, potência de 35mW associado ao corante azul de toluidina (12,5µg/ml ou 25µg/ml). Concluíram que a associação do laser ao corante determinou morte microbiana expressiva tanto na forma de hifa, quanto na de levedura, sendo que a primeira foi mais susceptível que a segunda, o que pode ser atribuído à diferença de morfologia.

Kawamoto *et al.* (2000) estudaram o efeito antibacteriano do laser HeNe amarelo (594nm, 4.3mW) associado ao corante cristal de violeta em abscessos subcutâneos de ratos, provocados pela bactéria *P.gingivalis*. Para isso, cones de papel foram contaminados pela bactéria. A seguir, foi adicionado 0,8ml do corante e feita irradiação laser por sessenta segundos. Depois os cones foram inoculados subcutaneamente nas costas dos ratos. Neste estudo foi ainda usado um grupo corante sem laser, um grupo *P.gingivalis* sem laser nem corante e um grupo controle. Após sete dias, amostras dos locais em que foram inoculados os cones de papel, dos quatro grupos, foram retiradas para análise histopatológica. Os resultados mostraram que o grupo controle apresentou o menor grau de inflamação, seguido pelo grupo em que foi

aplicado o laser. Já nos dois outros grupos o número de células inflamatórias foi grande, com áreas necrosadas. Os autores concluíram que a associação laser HeNe amarelo/cristal de violeta exerce efeito antibacteriano *in vivo*, levando à formação de menor número de abscessos. É importante lembrar que a eliminação ou decréscimo do *P.gingivalis* está associada à redução da progressão da periodontite, além da redução de abscessos periodontais.

König *et al.* (2000) analisaram a terapia fotodinâmica, *in vitro*, sem o uso de corantes exógenos, contra *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *P.acnes* (presente na microflora normal da pele e um dos responsáveis pela acne), *A.odontolyticus* (presente no processo de cárie de dentina) e *S.mutans*. Nessas bactérias, com exceção do *S.mutans*, foi constatada, pela fluorescência, durante a aplicação do laser HeNe (60mW, 632,8nm), a presença de endoporfirinas, corantes endógenos. Em vista disso, pode-se utilizar a terapia fotodinâmica sem corantes exógenos para eliminar as bactérias citadas, desde que o comprimento de onda do laser seja compatível com o corante endógeno, como ocorreu no estudo citado. Como era esperado, não houve efeito sobre o *S.mutans*, já que este não produz porfirinas endógenas. Os autores lembraram ainda que o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos torna a busca por novas formas de tratamento uma necessidade, sendo a terapia fotodinâmica importante alternativa viável.

Dörtbudak *et al.* (2001) apresentaram o uso da terapia fotodinâmica na periimplantite. Vários métodos de limpeza das superfícies dos implantes foram descritas na literatura com objetivo de evitar o fracasso dos implantes. Entre esses métodos estão o ácido cítrico, o tratamento mecânico com curetas e o uso do ultra-som com pontas revestidas de plástico. Entretanto alguns tiveram por conseqüência mudar ou danificar as propriedades da superfície dos implantes. Uma técnica nova de limpeza, *in vivo*, é o tratamento com laser. Vários estudos têm demonstrado que a fotossensibilização letal pode ser executada *in vivo* sem alteração nas superfícies tratadas dos implantes.

Dörtbudak *et al.* (2001) examinaram a efetividade da fotossensibilização letal no tratamento de superfícies de implantes *in vivo*, avaliando a eliminação do *A.a*, *P.gingivalis* e *P.intermedia*. No estudo, utilizou-se laser de diodo com comprimento de onda de 690nm por 60 segundos e,

como corante, o azul de toluidina (100µg/ml). Houve redução significativa das três bactérias com a terapia fotodinâmica.

Prates *et al.*, (2006) avaliaram a ação bactericida do verde de malaquita a 0,01% e laser vermelho (comprimento de onda 660nm) na bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans in vitro* e de acordo com os autores notou-se que o laser combinado com o corante com tempos de três e cinco minutos levou a redução de 97,2% e 99,9% deste periodontopatógeno.

Ferreira e Ferreira em 2006 desenvolveram e patentearam um agente fotossensibilizador para a utilização no processo antimicrobiano ativado por luz e destinado à sensibilização letal de bactérias e fungos. São utilizados para este processo os corantes azul de metileno, azul de toluidina, azul de trypan, azul de Evans e verde de Malaquita associados a uma fonte de luz composta por LEDs.

O Teste *t student* que foi utilizado para a análise estatística do experimento é aplicado quando se querem comparar duas colunas de dados entre si, mesmo quando é aplicado a uma única amostra, uma coluna de dados, onde se compara a média da mesma com uma média hipotética teórica, extraída da literatura ou de outro experimento da população (DORIA FILHO, 2001).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - MATERIAL

1 – Câmera fotográfica digital Canon G3 - PC1032 – Power Shot – 4.0 Mega Pixels – Fabricante: Canon Inc. – Japão .

2 – Estativa - (FIG. 4.1)

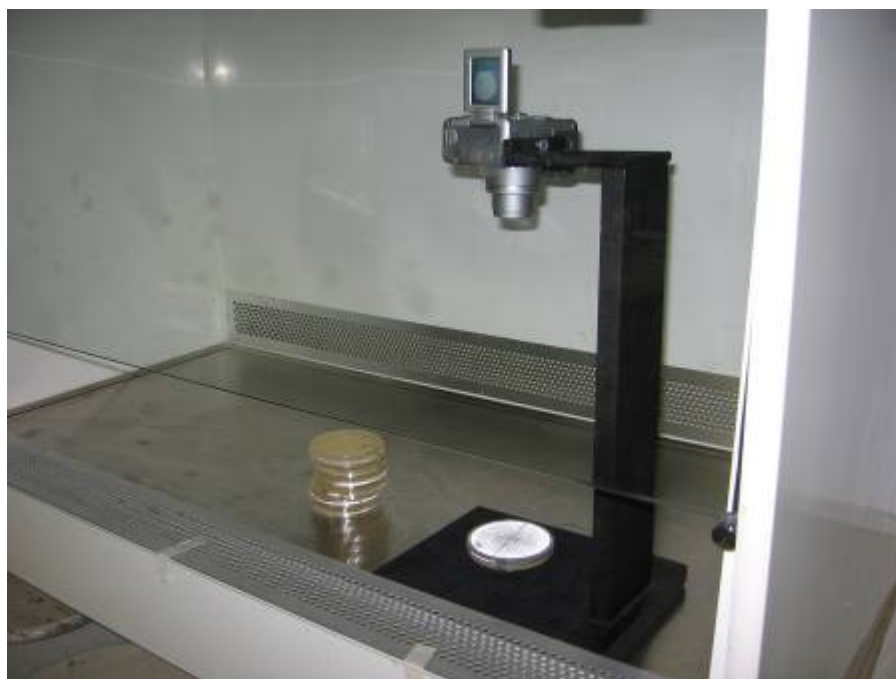


FIGURA 4.1 – Câmera digital fixa à estativa dentro do Fluxo Laminar onde foram feitas as fotos das placas com bactérias para a contagem eletrônica

3 – Equipamento de laser em baixa intensidade, com comprimento de onda de 660nm, com potência média de saída do feixe de 103,1mW, área do feixe 1,5cm², modelo Quantum, Fabricante: Ecco Fibras Brasil (FIG.4.2).



FIGURA 4.2 – Laser em baixa intensidade Quantum -Ecco (Laser nº1)

4 – Equipamento de Laser em baixa intensidade, com comprimento de onda 660nm, semicondutor com potência média de 40mW, marca TWIN LASER, Fabricante: *mmoptics*, São Paulo. (FIG. 4.3) (Laser nº2).



FIGURA 4.3 – Laser em baixa intensidade Twinlaser - *mmoptics* (Laser n.2)

5 – Equipamento de LEDs, com comprimento de onda de 630nm (\pm 10nm), semicondutor de InGaAlP, potência média de saída de 100mW sem a ponteira de acrílico, sistema de entrega do feixe por manopla com 1cm², marca FISIOLED, Fabricante: *mmoptics* São Paulo (FIG.4.4)



FIGURA 4.4 – Equipamento de LEDs – FISIOLED – *mmoptics* – São Paulo

6 – Espectrofotômetro - JEN WAY Spectrophotometer 640, EUA. (FIG. 4.5)



FIGURA 4.5 – Espectrofotômetro - JEN WAY Spectrophotometer 640, EUA

7 – Medidor de Potência (Power Meter) NOVA – Analogic Performance Report, Laser Power/Energy Monitor. Fabricante: Ophir Optronics – Science Based Industry Park, Jerusalém – Israel. (FIG 4.6)



FIGURA 4.6 – Power Meter - NOVA – Ophir Optronics, Jerusalém – Israel

8 – MICROORGANISMOS: Foi utilizada uma amostra de referência *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29525), uma amostra de *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e uma amostra de *Prevotella intermedia* (ATCC 25611) isolados e pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

*Actinobacillus
actinomycetemcomitans*

Fusobacterium nucleatum

Prevotella intermedia



Figura 4.7 – Bactérias utilizadas no experimento (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* - ATCC 29525, *Fusobacterium nucleatum* - ATCC 25586 e *Prevotella intermedia* - ATCC 25611).

9 – Fotossensibilizante: O fotossensibilizador utilizado foi o azul de ortotoluidina (TBO) (Sigma, St. Louis, MO, USA), na concentração final de 0,01% p/v. A absorção óptica foi analisada por espectroscopia, apresentou-se ressonante com o comprimento de onda emitido pelo equipamento testado.

(FIG. 4.8)

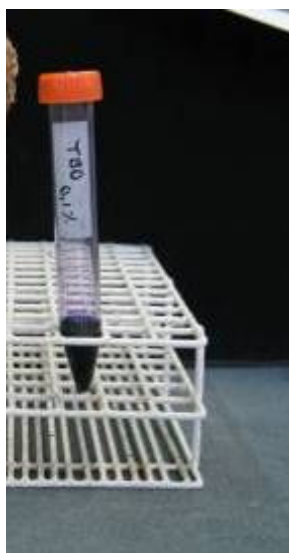


FIGURA 4.8 – Azul de Toluidina a 0,1% (TBO) - Sigma, St. Louis, MO, EUA.

4.2 – MÉTODOS

A metodologia foi dividida em duas partes. A primeira parte do experimento foi a avaliação da linearidade de absorção dos corantes pelos equipamentos a serem utilizados, verificando principalmente se o corante a ser usado (TBO a 0,01%) é bem absorvido pelos equipamentos usados e se a potência desses equipamentos é importante nessa absorção. A segunda fase executada é o procedimento laboratorial desde o crescimento bacteriano passando pelas etapas de irradiação com posterior contagem e análise estatística dos dados obtidos.

4.2.1 – EXPERIMENTO Nº 1 – Avaliação da linearidade de absorção dos corantes pelos equipamentos de luz (Lasers e LED)

O objetivo é determinar a absorção dos comprimentos de onda dos lasers 1 e 2 e do LED (grupos 6, 7 e 8) pelos corantes verde de malaquita (VM), azul de metileno (MB) e azul de toluidina (TBO), todos na concentração de 0,01% e o coeficiente de absorção ótica dos corantes utilizando-se a *Lei de Beer*.

$$I = I_0 \cdot \exp(-aL) \quad (1)$$

onde:

I é a intensidade transmitida em [w/cm²]

I_0 é a intensidade inicial em [w/cm²]

a é o coeficiente de absorção ótica [cm⁻¹]

L é a espessura de cubeta plástica em [cm] – caminho ótico a ser percorrido pelo feixe de luz.

Os corantes foram depositados em uma cubeta de acrílico com também a água (FIG. 4.9). A seguir a cubeta foi apoiada em uma placa de isopor, onde de um lado ficou localizada a ponteira dos equipamentos e do outro lado o sensor do *Power Meter* (FIG. 4.10 e 4.11).



Figura 4.9 – Cubas de acrílico com água e com os corantes avaliados.

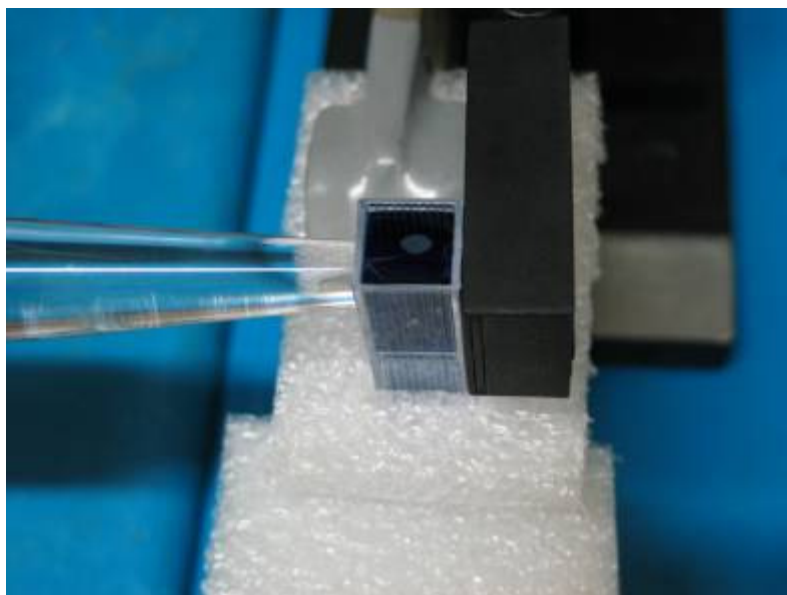


Figura 4.10 - Colocação da ponteira em acrílico do equipamento de LED em posição e do outro lado da cuba o *Power Meter* para mensurar a potência transmitida.



Figura 4.11 - Imagem do experimento mostrando além do sensor o equipamento de medição (*Power Meter*)

Colocando-se o corante na cuba de acrílico, avaliou-se a penetração do feixe de luz no recipiente achando-se assim a quantidade de luz absorvida³ pelo corante e o resíduo de luz transmitida ao *Power Meter*. (FIG. 4.12). Lembrando que foi feita uma Linha de Base utilizando a água como veículo na cuba de acrílico.

Para o Laser 2 (potência de 40mw) variou-se a potência de 10 em 10mW até atingir a potência máxima do equipamento (FIG 4.12).

Para o experimento com o Laser 1 (potência de 100mW) e o LED (potência de 100mW), por terem a potência fixa, foi utilizado um filtro de transmissão de 20 a 100% para as medições.

Os resultados foram obtidos no display digital do *Power Meter* (FIG. 4.13) e estão disponíveis no ANEXO 3.

³ Quantidade de radiação absorvida pelo caminho óptico percorrido pela luz dentro da cubeta com o corante.

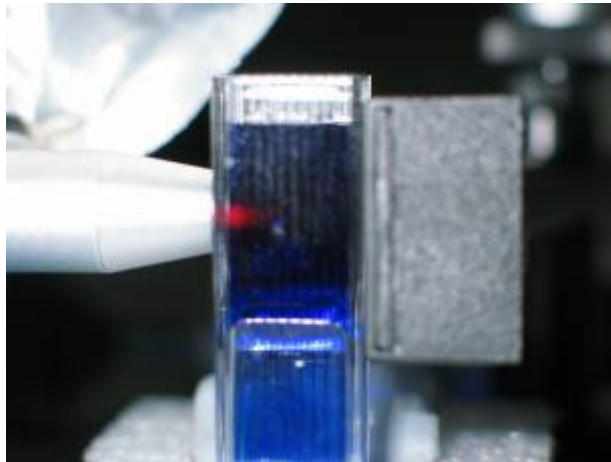


Figura 4.12 – Imagem do laser 2 (grupo 7) com a ponta encostada na cuba de acrílico com TBO a 0,01% mostrando o feixe sendo absorvido.



Figura 4.13 – Imagem do display digital do *Power Meter* medindo a potência transmitida pela cuba com o corante.

4.2.2 – EXPERIMENTO Nº 2 - Procedimento para avaliação da fotossensibilização letal das bactérias pelos lasers e LED:

1º PASSO

PREPARO DO INÓCULO: A amostra das bactérias foi cultivada (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* em ágar BHI + extrato de levedura), (*Prevotella intermédia* em ágar Brucella + hemina, menadiona e extrato de levedura) e (*Fusoacterium nucleatum* em BHI + L-cistina + extrato de leveduras) e incubada em anaerobiose a 35°C por 48 horas, para obter colônias bacterianas em fase de crescimento exponencial. Foram utilizados 18ml de salina peptonada esterilizada para preparar uma suspensão de células. Após homogeneização em vórtex, a concentração final do inóculo foi ajustada para $1-5 \times 10^8$ UFC/ml, de acordo com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland. (FIG.4.14)



Bactérias inseridas no meio dentro do *Falcon*



Análise visual em contraste mostrando que o meio com a bactéria ainda está mais denso que o controle (tubo de ensaio)



Análise visual – ideal, onde o meio está na mesma densidade do controle visualmente

FIGURA 4.14 – Análise Visual para Mc Farland 0,5, onde a densidade óptica do meio no Falcon tem que coincidir visualmente com o tubo padrão da Escala de Mc Farland

2 ° PASSO

Espectroscopia (ANEXO 2) do meio e do inóculo com e sem corante (TBO, 0,1%) (FIG.4.15)

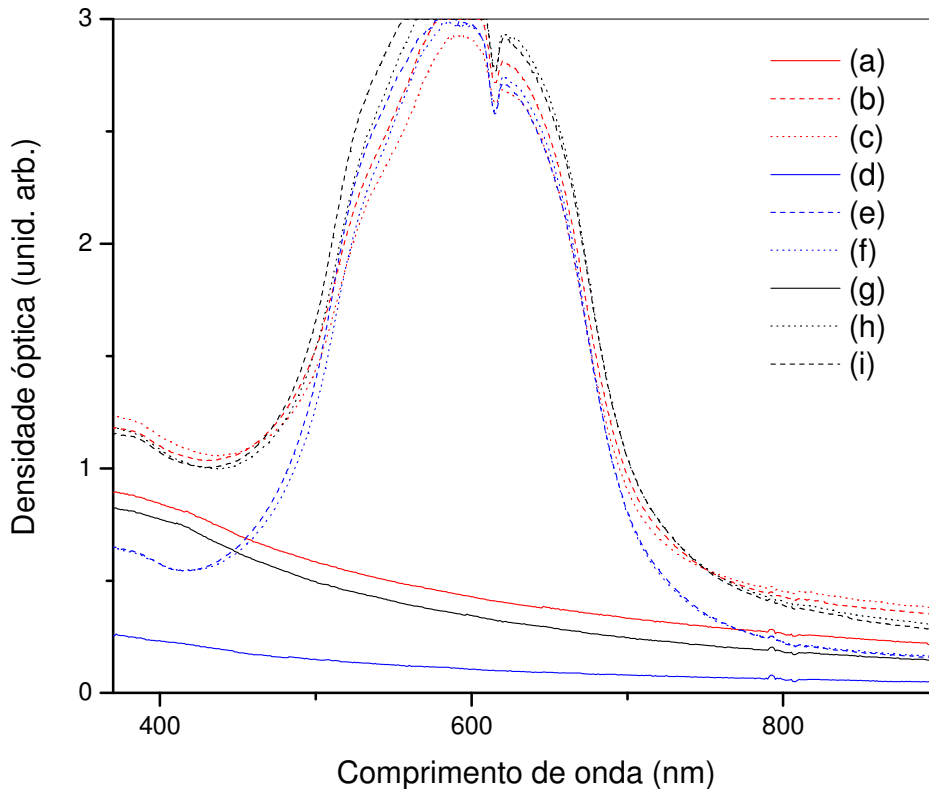


Figura 4.15 – Gráfico com as curvas de absorbância⁴ (densidade óptica) das bactérias envolvidas no experimento em relação aos comprimentos de onda entre 380 e 900nm, onde: a – Meio com salina peptonada e *Actinobacillus actinomicetecomitans* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml, b- Meio com salina peptonada, *Actinobacillus actinomicetecomitans* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml e TBO, c – Meio com salina peptonada, *Actinobacillus actinomicetecomitans* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml, TBO pós PDT com $\Delta=3$ min, d - Meio com salina peptonada e *Prevotella intermedia* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml , e- Meio com salina peptonada, *Prevotella intermedia* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml e TBO, f – Meio com salina peptonada, *Prevotella intermedia* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml, TBO pós PDT com $\Delta=3$ min, g - Meio com salina peptonada e *Fusobacterium nucleatum* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml , b - Meio com salina peptonada, *Fusobacterium nucleatum* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml e TBO, c – Meio com salina peptonada, *Fusobacterium nucleatum* $1-5 \times 10^8$ UFC/ml, TBO pós PDT com $\Delta=3$ min

⁴ Quantidade de radiação que é absorvida por uma superfície

3° PASSO

Foram utilizados 08 tubos de ensaio de 10 x 10mm contendo um volume final de suspensão de 2ml, que foram separados em oito grupos (FIG.4.16 e TAB. 4.1).

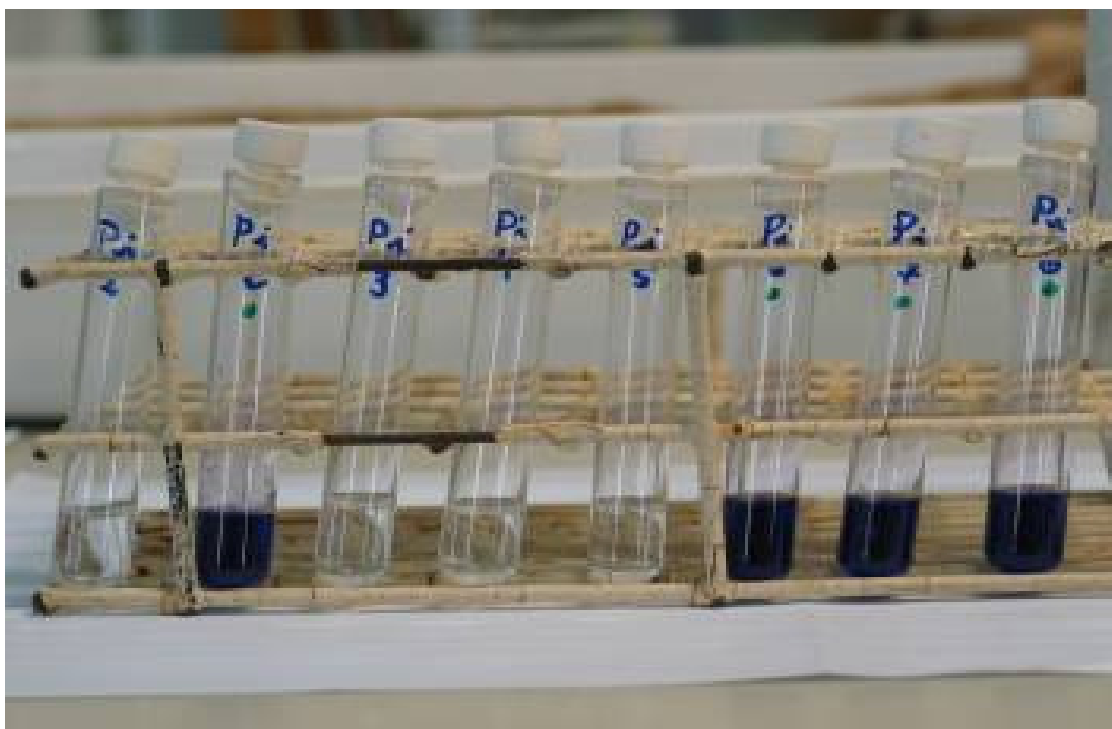


Figura 4.16 – Foto mostrando os 08 grupos, onde os grupos 1,3,4,5 contém 2ml de suspensão sem TBO (tubos com líquido incolor) e os grupos 2,6,7,8 onde foram adicionados o corante TBO (proporção 1:10).

Tabela 4.1 – Tabela dos grupos utilizados no experimento e sua descrição e simbologia utilizada

Grupos	-	Descrição do procedimento
Simbologia		
Grupo 1		Inóculo – sem nenhum tratamento
Controle		(controle)
Grupo 2		Meio com bactérias e corante TBO a
TBO		0,01%
Grupo 3		Meio com bactérias sem corante TBO a
Laser 1		0,01% e irradiados com laser 1 por 3
		minutos
Grupo 4		Meio com bactérias sem corante TBO a
Laser 2		0,01% e irradiados com laser 2 por 3
		minutos
Grupo 5		Meio com bactérias sem corante TBO a
LED		0,01% irradiados com LED por 3 minutos
Grupo 6		Meio com bactérias e corante TBO a
PDTL1		0,01% irradiados com laser 1 por 3
		minutos
Grupo 7		Meio com bactérias e corante TBO a
PDTL2		0,01% irradiados com laser 2 por 3
		minutos
Grupo 8		Meio com bactérias e corante TBO a
PDTLED		0,01% irradiados com LED por 3 minutos

4° PASSO

No grupo 1, correspondente ao controle de crescimento bacteriano, o inóculo não sofreu nenhum tratamento. No grupo 2, 0,2ml de TBO foram adicionados a 1,8ml do inóculo, sem a exposição às fontes de luz. Nos grupos 3, 4 e 5, 2ml do inóculo em cada grupo foram irradiados por 3 minutos, respectivamente, pelo Laser nº1, Laser nº2 e pelo LED. Nos grupos 6, 7 e 8, 0,2ml de TBO foram adicionados a 1,8ml do inóculo e irradiados por 3 minutos, pelo Laser nº1, Laser nº2 e pelo LED sucessivamente. Para os grupos 2, 6, 7 e 8, foi estabelecido um período de pré-irradiação (PIT) de 5 minutos para absorção do fotossensibilizante (TBO). (FIG.4.17)

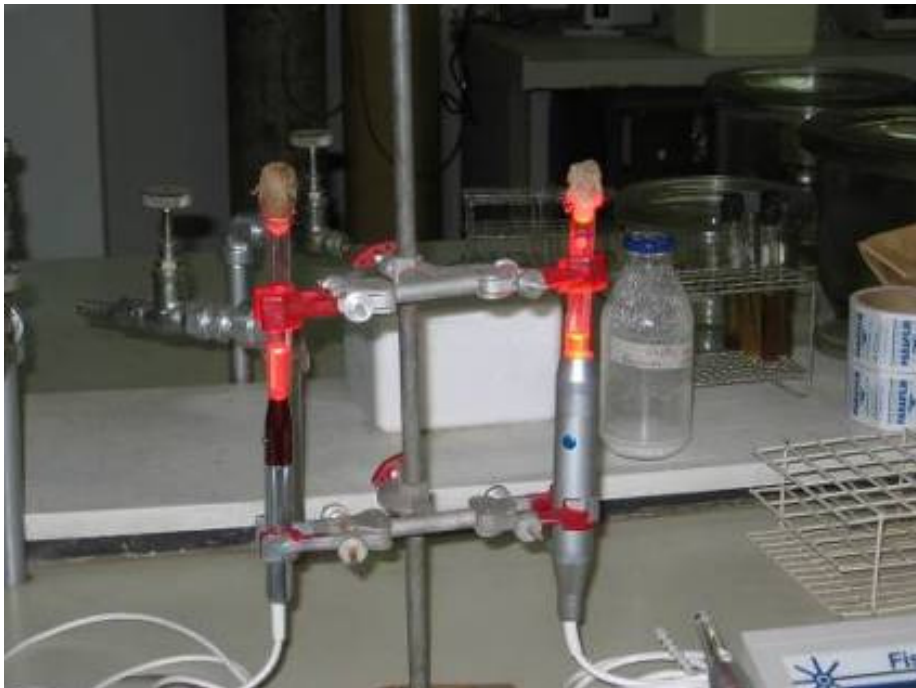


Figura 4.17 – Tubos de ensaio sendo irradiados com laser 2 e LED apoiados em um suporte de laboratório.

5° PASSO

Posteriormente, o inóculo de cada grupo foi diluído para 10^3 UFC/ml, exceto o grupo 1 cujo inóculo foi diluído para 10^2 e 10^3 UFC/ml, e semeado, em triplicata, em placas de *Petri* contendo *agar Brucella* suplementado com extrato de leveduras (FIG.4.18a, FIG.4.18b e FIG.4.19).



Figura 4.18a – Procedimento mostrando o momento das diluições de 10^8 UFC/ml para 10^3 UFC/ml dentro da câmara do fluxo laminar para manter o meio sem contaminação



Figura 4.18b – Diluição até 10^3 UFC/ml sendo mostrado em um tubo do Tipo Eppendorf (com tampa), antes de ser levado à placa de *Petri*



Figura 4.19 – Procedimento de sementeira do meio com as bactérias na placa de *Petri*, procedimento este também feito na câmara do fluxo laminar. Após a sementeira o meio é espalhado em toda a placa com auxílio de um *Drigausk* (bastão de vidro).

6° PASSO

As placas foram incubadas em anaerobiose a 35°C por 48 horas e após este período realizadas a contagem das colônias bacterianas (FIG.4.20).



Figura 4.20 - Câmara de anaerobiose onde as placas de *Petri* ficam incubadas por 48 horas a 35°C e após este período é então feita a contagem visual dos pontos com UFCs.

7° PASSO

Contagem das colônias (UFC) visual e digital (ANEXO 4) (FIG.4.21a e FIG.4.21b)

A contagem visual foi feita utilizando-se uma caneta hidrográfica com as marcações feitas diretamente sobre a placa e para a contagem digital a aquisição e tratamento das imagens foram obtidas através das imagens fotográficas, utilizando-se uma câmera *Canon G3*, com auxílio da estativa, dentro da câmara de fluxo laminar, com o objetivo de padronização das imagens.

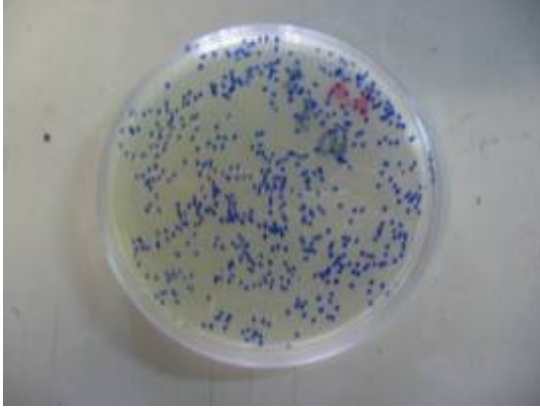


Figura 4.21a – Marcação com caneta hidrográfica azul para contagem visual das UFCs

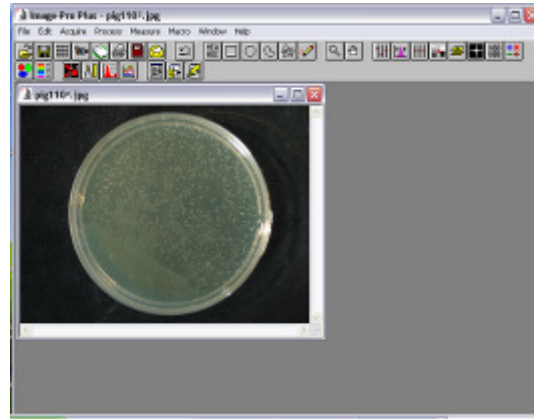


Figura 4.21b – Contagem eletrônica – Programa Image Pro-plus 6.0

8° PASSO

ANÁLISE ESTATÍSTICA: Foi utilizado o programa estatístico *Microsoft Office Excel* – *Teste t student* entre duas amostras presumindo variâncias semelhantes, com uma probabilidade de significância ($p < 0,05$), tendo, portanto 95% de confiança nas conclusões apresentadas. (Utilizou-se um nível de significância de 0,05 ($p=0,05$), onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados diferentes. Comparou-se os grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 com o grupo 1 (controle).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - EXPERIMENTO 1

No Anexo 3 está apresentada a relação de calibração entre a potência declarada no equipamento e a potência efetivamente irradiada nas soluções dentro da cubeta de acrílico nas condições de teste.

As Figuras 5.1, 5.2, 5.3, mostram os resultados obtidos no experimento para determinar a absorção dos comprimentos de onda dos lasers 1 e 2 e do LED pelos corantes verde de malaquita (VM), azul de metileno (MB) e azul de toluidina (TBO).

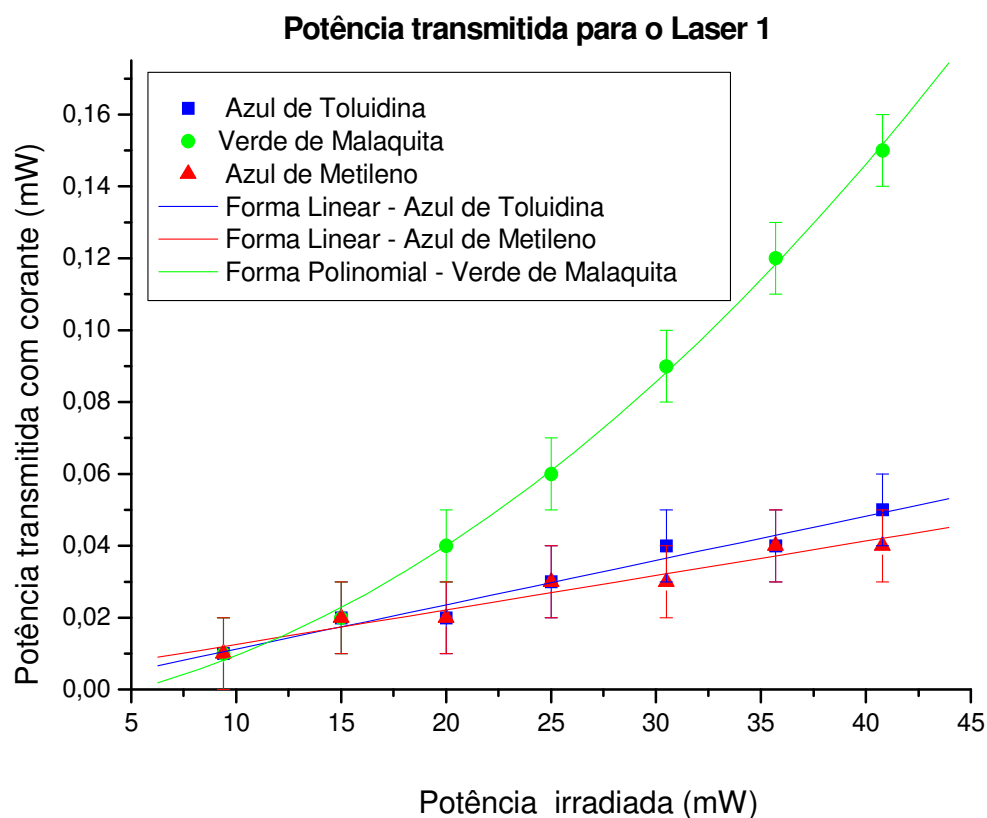


Figura 5.1 – Potência aplicada e potência transmitida para o Laser 1, com seus respectivos desvios padrões.

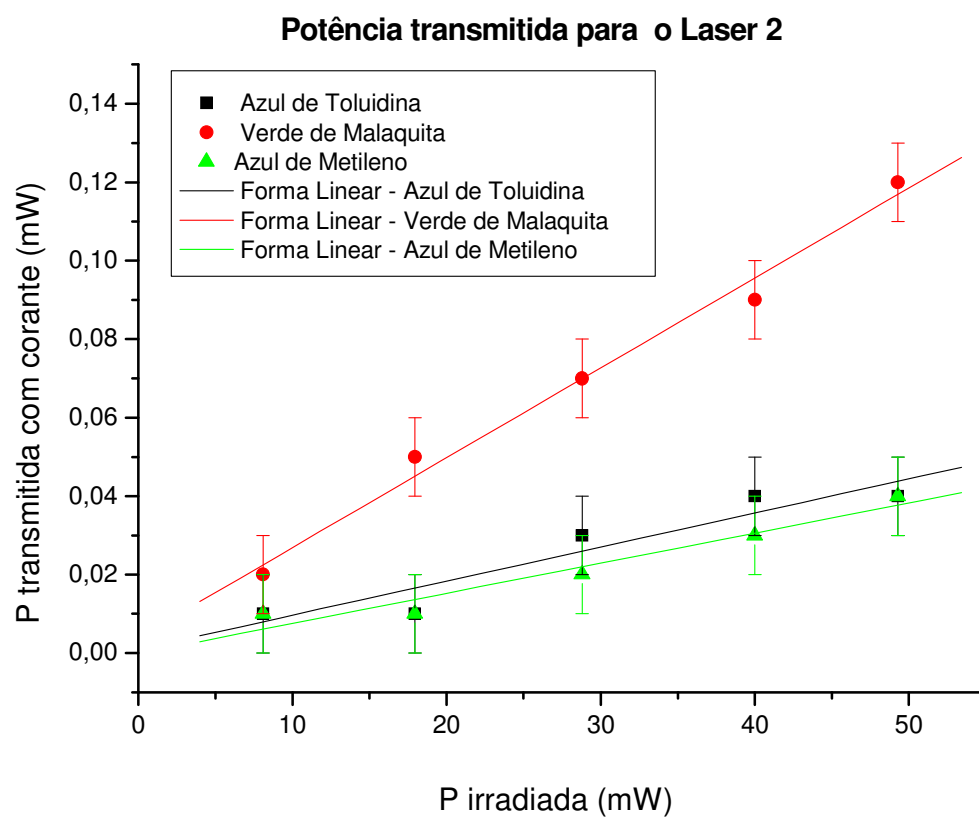


Figura 5.2 – Potência aplicada e potência transmitida para o Laser 2, com seus respectivos desvios padrões.

Potência transmitida para LED

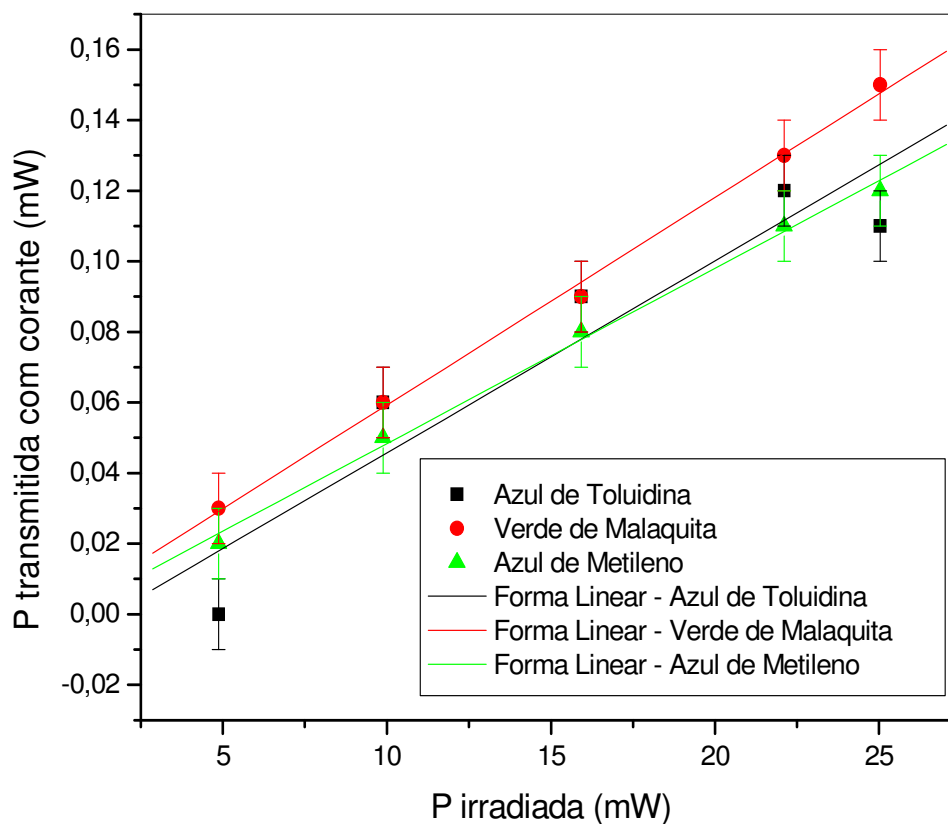


Figura 5.3 – Potência aplicada e potência transmitida para o LED, com seus respectivos desvios padrões.

Nas potências de irradiação apontadas observa-se nas Figuras (5.1, 5.2, 5.3) uma dependência clara entre a potência aplicada e a potência absorvida para todos os equipamentos e corantes, com exceção de uma medida para o verde de malaquita (FIG 5.1 em verde), na qual o ajuste dos gráficos não foi uma reta e sim uma curva do tipo quadrática. Como se tem a luz absorvida no eixo x, isso indica que para este corante já se está fora dos regimes lineares e próximos da saturação.

Com os resultados obtidos pode-se concluir que o comportamento dos três corantes analisados em relação aos equipamentos mostra-se com um adequado potencial de absorção e somente o verde de malaquita vai se saturar à medida que se aumenta a potência do laser 1.

5.1.1 - Cálculo para coeficiente de absorção ótica

Foi utilizado para o cálculo do coeficiente a de absorção ótica da amostra de TBO a 0,01% utilizando-se a Equação (1).

Na Tabela 5.1 estão os resultados médios das medidas de transmissividade (quantidade de luz que ultrapassou a cubeta plástica e incidiu sobre o *power meter*) tendo a água com *Linha de Base* e as médias obtidas usando o corante Azul de Toluidina a 0,01% quando irradiados como os equipamentos (Laser 1, Laser 2 e LED). Todos os valores encontrados estão no Anexo 3, juntamente com os resultados obtidos pelos outros corantes (Verde de Malaquita e Azul de Metileno).

Tabela 5.1 – Potência transmitida (τ) da linha de base e do corante obtida pelo experimento 1 com o corante TBO a 0,01% avaliado para os equipamentos (Laser 1 – Grupo 6, Laser 2 – Grupo 7 e LED – Grupo 8).

	(a) Baseline (água) em mW	(b) TBO a 0,01% em mW (média)	τ [%] (b)/(a)X100
Laser 1 (Grupo 6)	49,3	0,10	0,2
Laser 2 (Grupo 7)	40,8	0,05	0,1
LED (Grupo 8)	55,4	0,29	0,5

Sabendo-se que para a água (Linha de Base) o I_0 é 55,4W/cm² e o I é 0,29W/cm² para o equipamento de LED e a espessura da cubeta de 1cm e utilizando-se a equação (1) têm-se que o α é igual a 5,25cm⁻¹

Para o Laser 1 o coeficiente óptico de absorção é de: $\alpha = 6,20\text{cm}^{-1}$

Para o Laser 2 o coeficiente óptico de absorção é de: $\alpha = 6,70\text{cm}^{-1}$

O coeficiente de absorção óptica dos lasers é maior do que o do LED pelo fato destes equipamentos terem um feixe de irradiação com coerência espacial e temporal e o LED o feixe de irradiação ser divergente e mais estudos são necessários para corroborar com os resultados encontrados.

Pode-se dizer também que para os comprimentos de onda de 640 a 660nm (comprimentos dos equipamentos usados no experimento) têm-se uma transmissão máxima em 55,4 (Linha de Base da água) que equivale a 100% e 0,29 para o TBO a 0,01%, que equivale a 0,52% de transmissividade tendo com parâmetro a água. Nota-se que para esses comprimentos de onda o TBO a 0,01% tem um alto índice de absorção (99,48%).

A escolha pelo corante TBO a 0,01% em relação aos outros corantes fotossensibilizadores avaliados foi devido ao bom comportamento do TBO a 0,01% no experimento, mostrando uma boa regularidade com alto índice de absorção da luz (laser e LED utilizados no experimento) sendo também o mais utilizado pelos autores de acordo com a literatura utilizada (Bhatti *et al.* 1998; Wilson, 1993; Wilson, Dobson e Sarkar,1993; Wilson e Dobson,1993; Soukos *et al.*, 1996, Bhatti *et al.*, 1997 e Dortbudak *et al.*, 2001).

Pode-se deduzir também que a potência dos equipamentos (mW) tem uma importância muito grande nesta absorção e que valores baixos de potência resultariam em um tempo maior de exposição da luz, explicando assim porque o laser n.2 de 40mW (grupo 7) com o mesmo tempo de exposição ($\Delta t=3\text{min}$) do que o laser n.1 (100mW, grupo 6) e o LED de 100mW (grupo 8), entregaria ao agente fotossensibilizador uma quantidade de energia menor, tendo assim uma menor sensibilização letal.

Isso significa que a intensidade medida em W/cm^2 é um fator a ser considerado relevante para a técnica de sensibilização letal para as bactérias avaliadas nos tempos de irradiação utilizados.

5.2 - EXPERIMENTO 2

Contagem das UFC/ml nas placas de Petri (visual e digital) ANEXO 4

Foi utilizado nos resultados a contagem visual de acordo com os dados avaliados no ANEXO 4, através de uma caneta marcadora e marcação dos pontos na placa de *Petri* de todos os grupos avaliados (Grupo 1-10², Grupo 1-10³, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4, Grupo 5, Grupo 6, Grupo 7 e Grupo 8) para as três bactérias (TAB. 5.2).

Tabela 5.2 - Medidas descritivas visuais das UFCs para todas as bactérias em triplicata (Aa1, Aa2 e Aa3 - *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*), (Fn1, Fn2 e Fn3 - *Fusobacterium nucleatum*) (Pi1, Pi2 e Pi3 - *Prevotella intermedia*); dos grupos de G1-10² a G8.

Grupos/Bactérias	Aa1	Aa2	Aa3	Fn1	Fn2	Fn3	Pi1	Pi2	Pi3
G1- 10 ²	57	89	83	70	58	100	100	100	100
G1- 10 ³	1000	1000	1000	1000	1000	572	1000	1000	1000
G2	1000	1000	1000	73	197	97	1000	1000	1000
G3	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G4	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G5	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G6	0	0	4	23	60	61	736	726	749
G7	129	141	143	107	141	116	608	636	597
G8	1	3	0	2	0	3	512	487	516

Na figura abaixo (FIG 5.4) estão demonstrados na figura os resultados obtidos na contagem visual estabelecida na tabela acima (TAB 5.2).

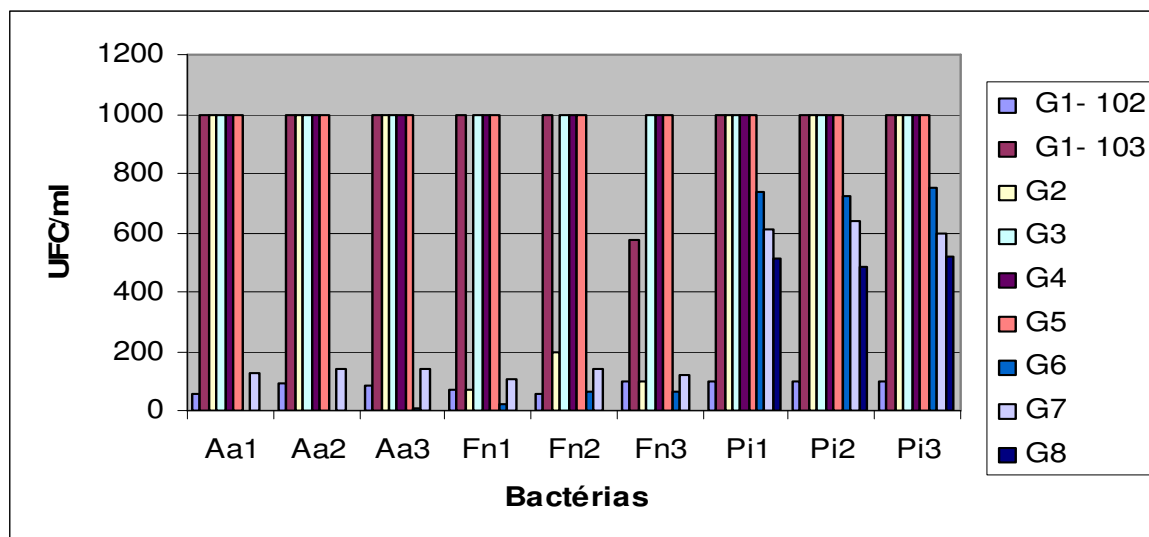


Figura 5.4 - Contagem das UFC/ml dos grupos avaliados, para as bactérias onde Aa1, Aa2, Aa3 são as medidas para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em triplicata, Fn1, Fn2 e Fn3 para o *Fusobacterium nucleatum* em triplicata e Pi1, Pi2 e Pi3 para a *Prevotella intermedia* em triplicata.

5.2.1 - Resultados obtidos para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

A (TAB 5.3) apresenta os resultados das medidas da contagem visual da quantidade de colônias viáveis e o percentual de redução para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e na Tabela 5.4 a estatística da redução em UFC/ml.

Tabela 5.3 – Medidas descritivas da contagem visual para os grupos em triplicata mostrando percentualmente as colônias viáveis e sua redução para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

1,00E+03 UFC/ml			1,00E+02 UFC/ml			Quota	Viáveis %	Redução %
1	2	3	1	2	3			
1000	1000	1000	57	89	83	1	100	0
1000	1000	1000	57	89	83	1	100	0
1000	1000	1000	57	89	83	1	100	0
1000	1000	1000	57	89	83	1	100	0
1000	1000	1000	57	89	83	1	100	0
0	0	4	0	0	0,4	0,0017	0,2	99,8
129	141	143	12,9	14,1	14,3	0,18	18,01	81,9
1	3	0	0,1	0,3	0	0,0017	0,27	99,8

Tabela 5.4 - Medidas descritivas da média, desvio padrão e erro padrão para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Aa		Estatística Redução UFC/ml	
Grupos	Media	Desvio Padrão	Erro padrão
Controle	76,3	17,00	9,82
TBO	76,3	17,00	9,82
LASER 1	76,3	17,00	9,82
LASER 2	76,3	17,00	9,82
LED	76,3	17,00	9,82
PDT L1	0,13	0,23	0,13
PDT L2	13,76	0,75	0,43
PDT LED	0,13	0,15	0,08

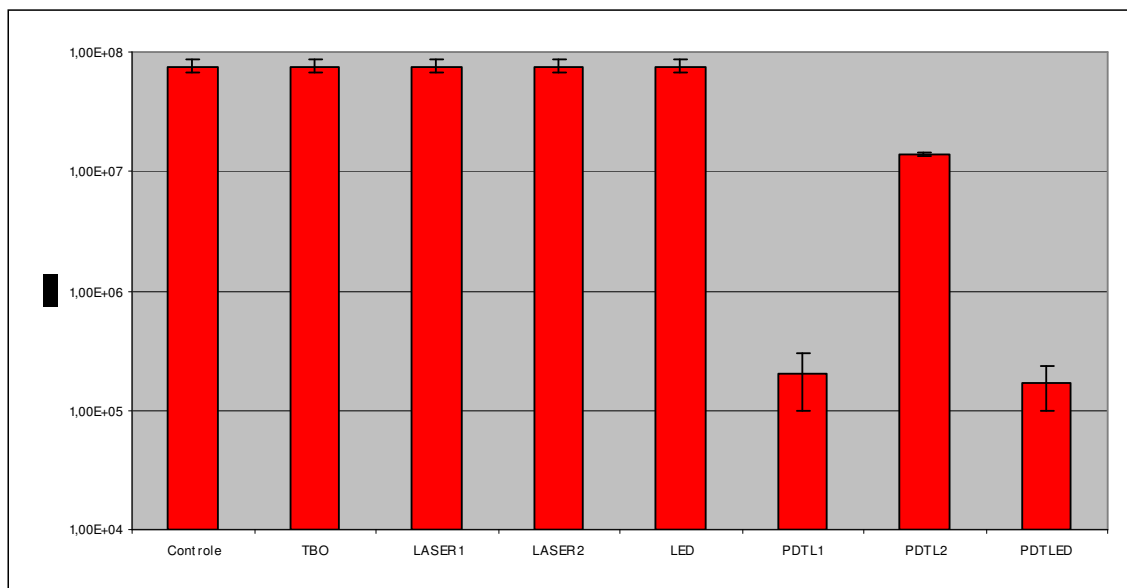


Figura 5.5 - Redução bacteriana do *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em escala logarítmica e os desvios padrões para os grupos analisados.

De acordo com os resultados alcançados no gráfico acima (FIG 5.5) pode-se notar uma redução bastante relevante para os grupos PDT (grupos 6, 7 e 8) quando comparados ao controle (grupo 1) e grupos 2, 3, 4, 5. Nos grupos 6 e 8 os resultados foram melhores tendo uma diminuição logarítmica de mais de dois logs e no grupo 7 houve também uma redução menor (um log).

5.2.2 - Resultados obtidos para o *Fusobacterium nucleatum*

A (TAB 5.5) apresenta as medidas descritivas da contagem visual da quantidade de colônias viáveis e o percentual de redução para o *Fusobacterium nucleatum* e na Tabela 5.6 a estatística da redução em UFC/ml.

Tabela 5.5 – Medidas descritivas da contagem visual para os grupos em triplicata mostrando percentualmente as colônias viáveis e sua redução para o *Fusobacterium nucleatum*

1,00E+03 UFC/ml			1,00E+02 UFC/ml			Quota	Viáveis %	Redução %
1	2	3	1	2	3			
1000	1000	572	70	58	100	1	100	0
73	197	97	7,3	19,7	7,3	1	100	0
1000	1000	1000	70	58	100	1	100	0
1000	1000	1000	70	58	100	1	100	0
1000	1000	1000	70	58	100	1	100	0
23	60	61	2,3	6	6,1	0,063	6,3	93,7
107	141	116	10,7	14,1	11,6	0,15	16	84
2	0	3	0,2	0	0,3	0,002	0,2	99,8

Tabela 5.6 - Medidas descritivas da média, desvio padrão e erro padrão para o *Fusobacterium nucleatum*.

Fn		Estatística Redução	
Grupos	Media	Desvio Padrão	Erro Padrão
Controle	76	21,63	12,48
TBO	11,43	7,15	4,133
LASER 1	76	21,6	12,48
LASER 2	76	21,6	12,48
LED	76	21,63	12,48
PDT L1	4,8	2,16	1,25
PDT L2	12,13	1,76	1,01
PDT LED	0,16	0,15	0,087

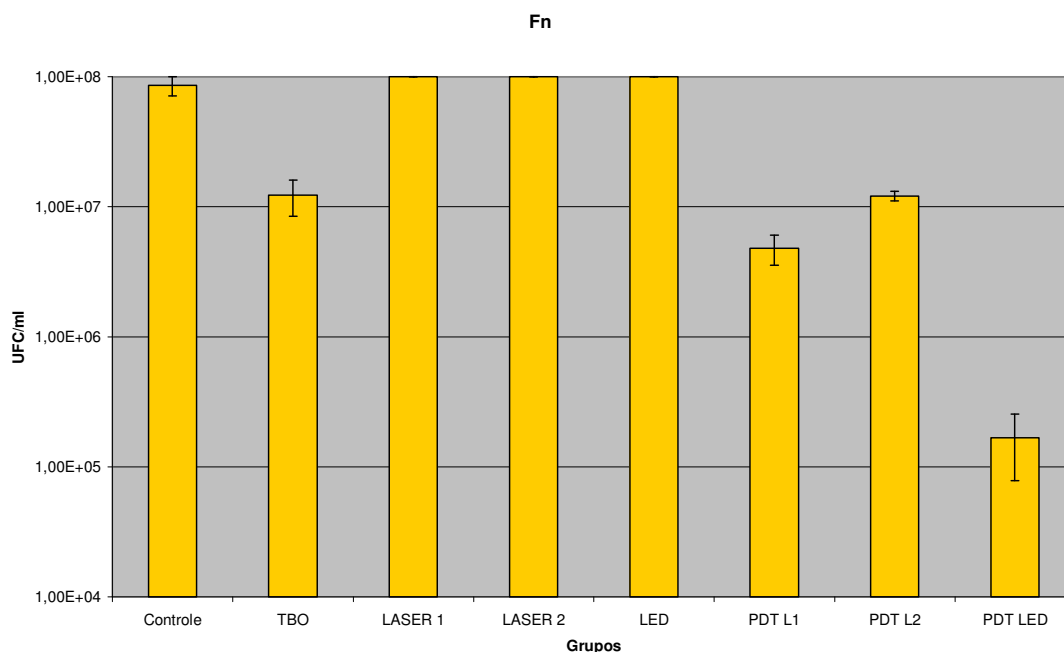


Figura 5.6 - Redução bacteriana do *Fusobacterim nucleatum* em escala logarítmica e os desvios padrões para os grupos analisados.

De acordo com os resultados alcançados no gráfico acima (FIG 5.6) pode-se notar uma redução bastante evidente para os grupos PDT (grupos 6, 7 e 8) quando comparados ao controle (grupo 1) e grupos 3, 4, 5. No grupos 6 obteve-se uma redução de mais de um log, no 8 uma diminuição logarítmica de mais de dois logs e no grupo 7 houve também uma redução menor (um log). No grupo 2 pode-se observar que somente o TBO é bactericida para esta amostra de *Fusobacterim nucleatum* tendo uma redução de aproximadamente um log.

5.2.3 - Resultados obtidos para a *Prevotella intermedia*

A (TAB 5.7) apresenta as medidas descritivas da contagem visual da quantidade de colônias viáveis e o percentual de redução para a *Prevotella intermedia* e na Tabela 5.8 a estatística de redução em UFC/ml.

Tabela 5.7 – Medidas descritivas da contagem visual para os grupos em triplicata mostrando percentualmente as colônias viáveis e sua redução para a *Prevotella intermedia*

1,00E+03			1,00E+02			Quota	Viáveis %	Redução %
1	2	3	1	2	3			
1000	1000	1000	100	100	100	1	100	0
1000	1000	1000	100	100	100	1	100	0
1000	1000	1000	100	100	100	1	100	0
1000	1000	1000	100	100	100	1	100	0
1000	1000	1000	100	100	100	1	100	0
736	726	749	73,6	72,6	74,9	0,73	73,7	26,3
608	636	597	60,8	63,6	59,7	0,61	61,4	38,6
512	487	516	51,2	48,7	51,6	0,50	50,5	49,5

Tabela 5.8 - Medidas descritivas da média, desvio padrão e erro padrão para *Prevotella intermedia*

	Estatística Redução		
	Media	Desvio Padrao	Erro padrao
Controle	100	0	0
TBO	100	0	0
LASER 1	100	0	0
LASER 2	100	0	0
LED	100	0	0
PDT L1	73,7	1,15	0,66
PDT L2	61,36	2,01	1,16
PDT LED	50,5	1,57	0,90

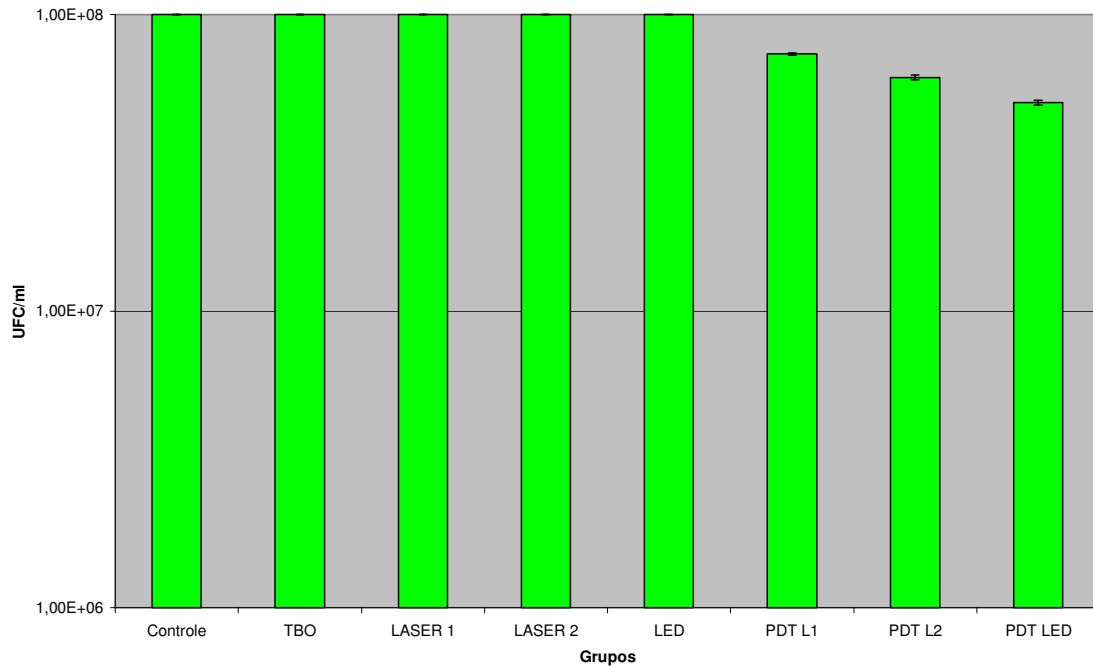


Figura 5.7 – Redução bacteriana da *Prevotella intermedia* em escala logarítmica e os desvios padrões para os grupos analisados.

De acordo com os resultados alcançados no gráfico acima (FIG 5.7) pode-se notar uma redução para os grupos PDT (grupos 6, 7 e 8) quando comparados ao controle (grupo 1) e grupos 2, 3, 4, 5. Em relação às bactérias anteriores analisadas, o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* os resultados foram em termos logaritmos mais pobres, mas mesmo assim houve redução bacteriana nos grupos PDT (grupos 6,7,8).

No gráfico que se segue podem-se observar as três bactérias envolvidas no experimento e o grau de sensibilização letal dos grupos avaliados onde houve uma significativa redução no número de unidades formadoras de colônias (UFCs) nos grupos testados com PDT (FIGURA 5.8).

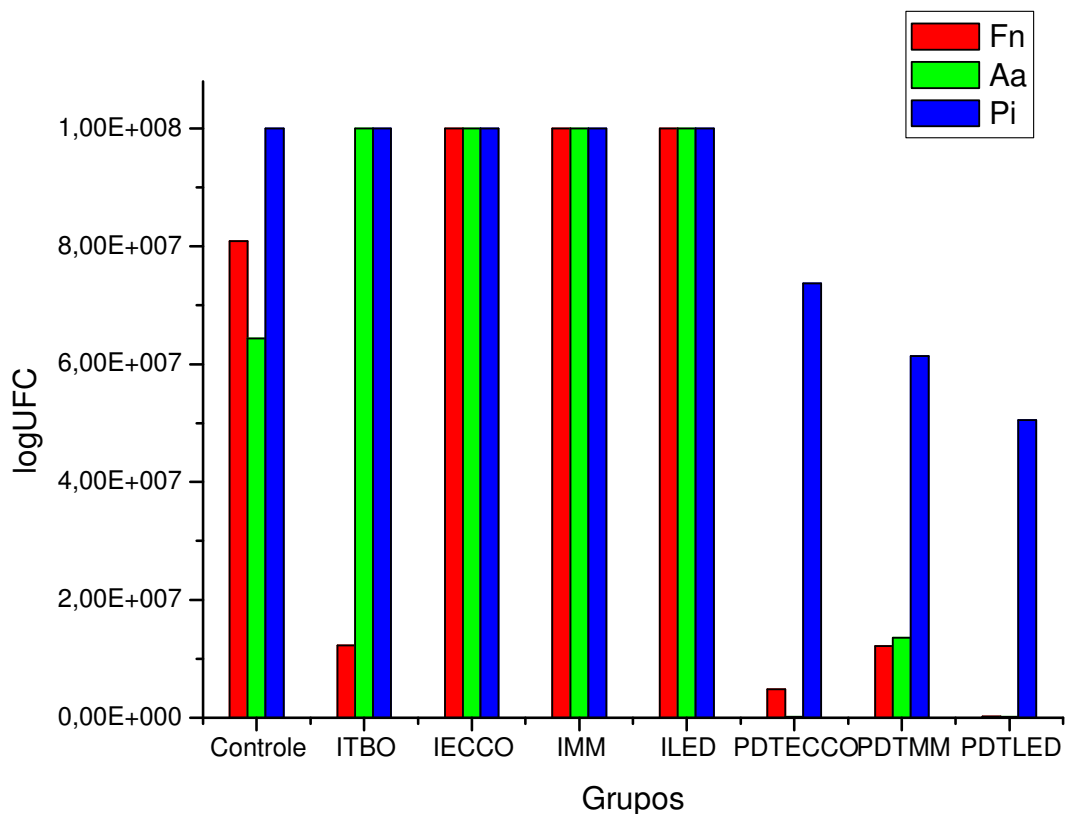


Figura 5.8: Número de células viáveis nos grupos de bactérias (*Fusobacterium nucleatum* em vermelho, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em verde e *Prevotella intermedia* em azul) para os grupos investigados.

O grupo 1 (controle – inóculo), sem qualquer tratamento, apresentou ótimo crescimento bacteriano ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Nos grupos 2, 3, 4, 5, não houve redução bacteriana, mostrando que somente o corante (grupo 2) e apenas a irradiação sem o corante (grupos 3,4,5) não alteraram a viabilidade das espécimes testadas. No entanto, os grupos que foram irradiados associados ao corante (grupos 6,7,8) pela técnica de PDT com o tempo de 3 minutos ($\Delta t = 3 \text{ min}$), mostraram-se sensíveis à terapia proposta, apresentando um número muito menos expressivo de crescimento bacteriano. Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) das bactérias em relação ao número inicial de unidades formadoras de colônias (UFCs) (FIG. 5.8).

Nas amostras ficou evidente que nos grupos que se submeteram à técnica de sensibilização letal (grupos 6,7,8) o número de colônias é visualmente menor que os grupos controle/inóculo (grupo 1) e nos grupos 2,3,4 e 5.

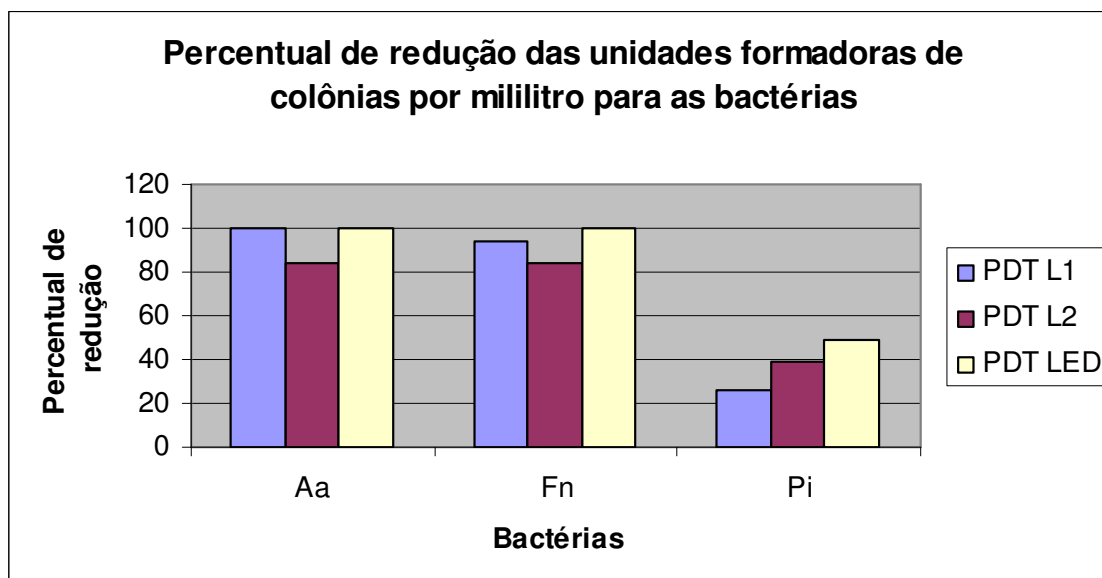


Figura 5.9 - Percentual de redução bacteriana atingida no experimento para as três bactérias *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* nos Grupos 6 (PDT L1), Grupo 7 (PDT L2) e Grupo 8 (PDT LED).

De acordo com a Figura 5.9 se obteve uma redução bacteriana de 99,8% no grupo 6, 81,9% no grupo 7 e 99,8% no grupo 8 para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, de 93,7% no grupo 6, 84% para o grupo 7 e 99,8% no grupo 8 para o *Fusobacterium nucleatum* e 26,3% no grupo 6, 38,6% no grupo 7 e 49,5% no grupo 8 para a *Prevotella intermedia*.

Há de se ressaltar que no grupo 2 do *Fusobacterium nucleatum* houve uma significativa redução da viabilidade das colônias mostrando que o corante TBO a 0,01% é efetivo para a morte dessa bactéria mesmo na ausência de luz (laser ou LED emitindo entre 640 e 660nm) (FIG 5.8 – Grupo 2 - ITBO).

Os resultados estatísticos entre os grupos 1 (controle) e os grupos 6, 7 e 8 estão descritos na (TAB.5.9), utilizando o Teste *t student* entre duas amostras presumindo variâncias semelhantes, com uma probabilidade de

significância ($p < 0,05$), tendo portanto 95% de confiança nas conclusões apresentadas.

Tabela 5.9 – Medidas descritivas para a probabilidade de significância ($p < 0,05$) para as bactérias *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Prevotella intermédia* (Pi) dos grupos 6, 7 e 8 em relação ao grupo 1 (controle) utilizando-se o Teste *t student* entre as amostras avaliadas presumindo variâncias semelhantes. (Utilizou-se um nível de significância de 0,05 ($p = 0,05$), onde os valores de $p < 0,05$ são considerados diferentes).

Grupos/ $p < 0,05$	Aa	Fn	Pi
Grupo 6	$2,00801 \times 10^{-6}$	0,038	0,0009
Grupo 7	$6,79195 \times 10^{-7}$	0,045	0,001
Grupo 8	$1,12838 \times 10^{-6}$	0,033	0,0004

De acordo com os valores encontrados, pode-se afirmar que existe diferença significativa entre as amostras dos grupos 6, 7 e 8 das bactérias *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Prevotella intermédia* (Pi) em relação ao grupo controle, lembrando também que em relação aos grupos 2, 3, 4 e 5 todos os resultados para ($p < 0,05$) comparados com o grupo controle, os resultados foram superiores a $p = 0,05$ não existindo diferença significativa entre os grupos a exceção para o grupo 2 (TBO) do *Fusobacterium nucleatum* (Fn), que apresentou um $p = 0,05$ demonstrando uma equivalência com a probabilidade de significância para $p = 0,05$.

Com os resultados alcançados é lícito afirmar que existe diferença significativa entre os grupos PDT (grupos 6, 7 e 8) em relação aos outros grupos (1, 2, 3, 4, 5) e que a redução microbiana nos grupos 6, 7, 8 são relevantes quando comparadas com o grupo 1 (controle) para $p = 0,05$.

Abaixo nas figuras 5.10, 5.11 e 5.12 está demonstrado através de imagens feitas no fluxo laminar com a câmera Canon G3 e estativa para

padronização das fotos, uma imagem de cada grupo nas placas de *Petri* para que seja feita a contagem digital (ANEXO 4).

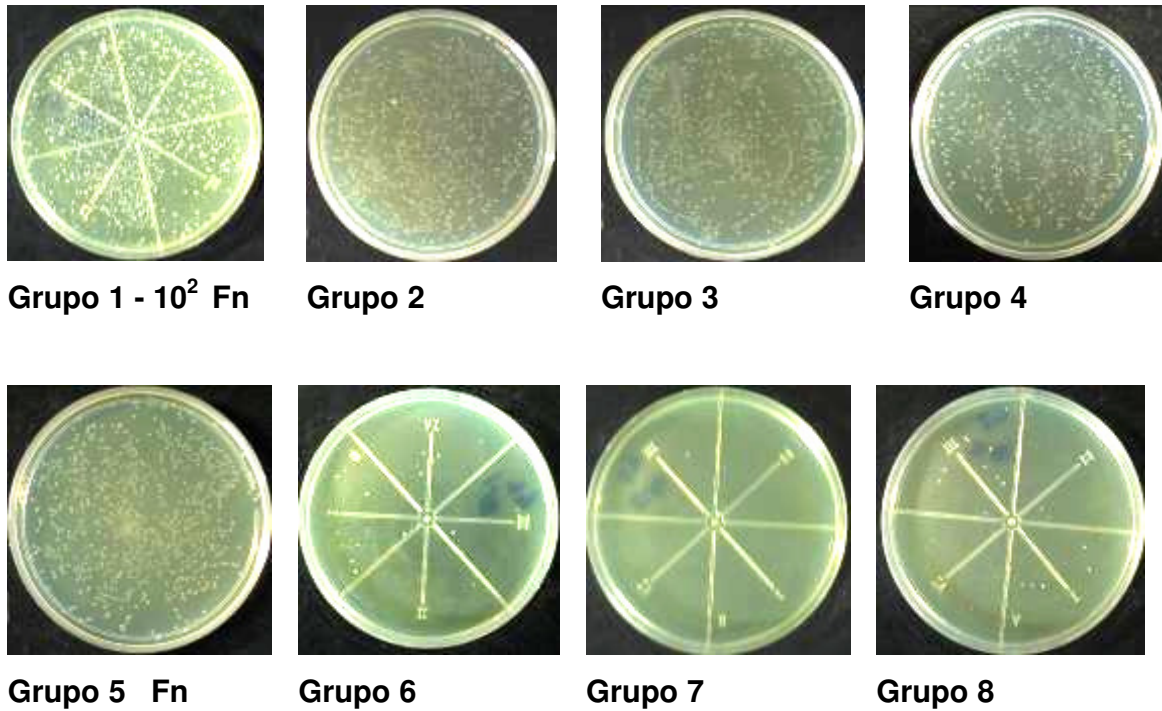


Figura 5.10 – Amostras para contagem de *Fusobacterium nucleatum* na placa de *Petri* onde se observa que nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 o número de pontos correspondentes às colônias bacterianas é muito maior que nos grupos PDT (grupos 6,7,8)



Grupo 1 - 10² Aa



Grupo 2 Aa



Grupo 3 Aa



Grupo 4 Aa



Grupo 5 Aa



Grupo 6 Aa



Grupo 7 Aa



Grupo 8 Aa

Figura 5.11 – Amostras para contagem de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* na placa de Petri onde se observa que nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 o número de pontos correspondentes às colônias bacterianas é muito maior que nos grupos PDT (grupos 6,7,8) ressaltando que no grupos 6 praticamente não foi constatado nenhuma colônia e no grupo 8 somente uma.

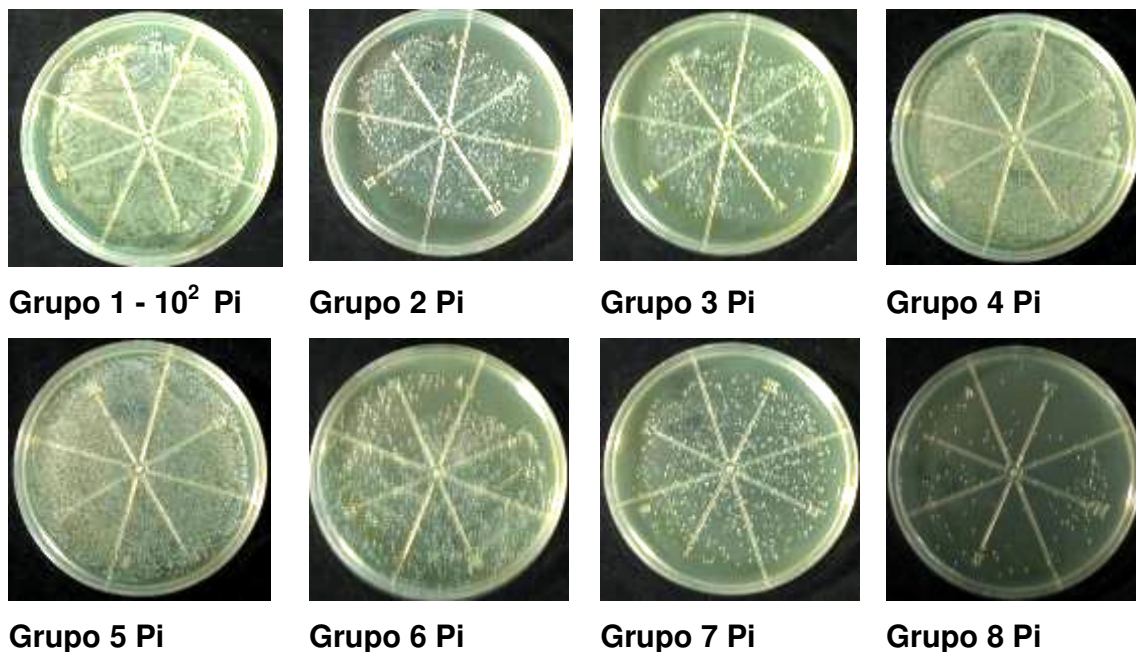
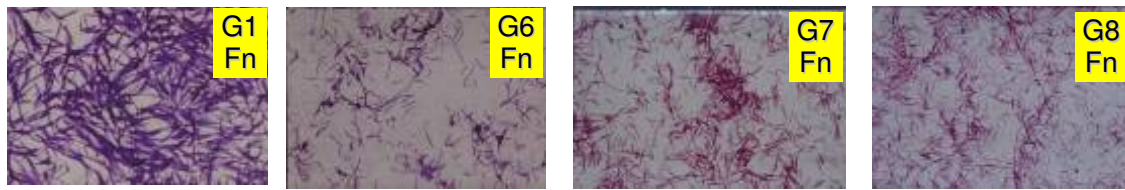


Figura 5.12 – Amostras para contagem de *Prevotella intermedia* na placa de *Petri* onde se observa que nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 o número de pontos correspondentes às colônias bacterianas é maior que nos grupos PDT (grupos 6,7,8) e o grupo 8 o número de colônias é bem menor do que os outros dois grupos PDT (grupos 6 e 7)

Mesmo através do método visual nas imagens ilustrativas abaixo nota-se uma redução significativa de bactérias viáveis nos grupos 6, 7 e 8 (após a PDT) em relação ao grupo 1 (inóculo). Pode-se observar também diminuição da concentração celular nos campos observados, sugerindo uma alteração do volume dessas células nos grupos 6,7,8 em relação ao grupo 1 (inóculo). (FIG. 5.13)

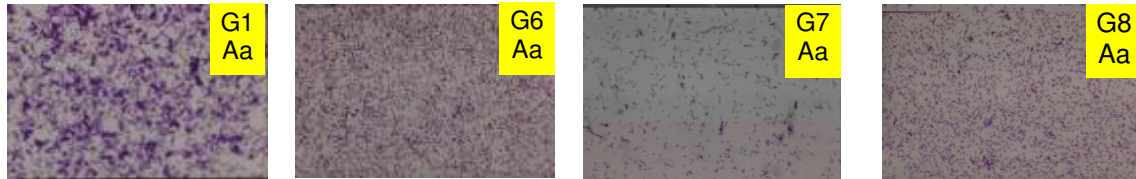


Grupo 1

Grupo 6

Grupo 7

Grupo 8

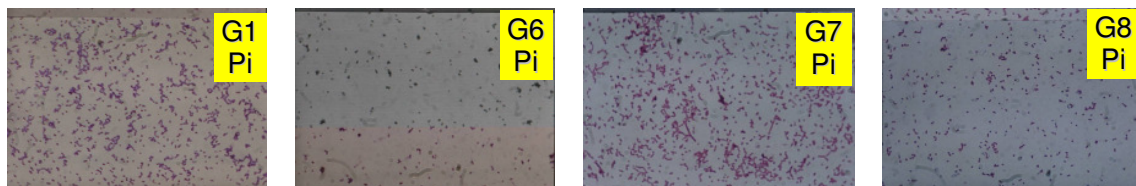


Grupo 1

Grupo 6

Grupo 7

Grupo 8



Grupo 1

Grupo 6

Grupo 7

Grupo 8

Figura 5.13 – Imagens de microscopia ótica das lâminas coradas pelo método de *gram* das amostras de *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) e *Prevotella intermedia* (Pi) dos grupos 1 (inóculo) e dos grupos PDT (grupos 6,7 e 8) onde pode-se avaliar pela imagem que os grupos 6,7 e 8 quando comparados com o grupo 1 (inóculo) vê-se um número muito menor de pontos corados demonstrando menos bactérias viáveis.

Na Figura 5.14 (a e b) pode-se ver que a presença do corante ressonante com o comprimento de onda da luz é importante para a absorção seletiva da luz e isto pode ser demonstrado pela gaussiana da figura 5.14b, sendo que na Figura 5.14a o feixe de luz do laser é transmitido pelo meio com bactérias sem aparentar absorção.



Grupo 3 – Irradiação com Laser 1 mostrando a transmissão da luz no meio (5.14a)



Grupo 7 – Irradiação com Laser 1 mostrando a absorção da luz no meio (gaussiana) (5.14b)

Figura 5.14 – As imagens mostram a transmissão da luz no grupo sem corante (5.14a) e a absorção da luz pelo corante TBO a 0,01% (5.14b) para o Laser 1.

Os resultados mostram percentualmente que o Laser nº1 e o LED foram mais eficientes na redução bacteriana que o Laser nº2, principalmente para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, onde no grupo 7 sobraram muitos mais colônias do que no grupo 6 e 8, e isto pode ser explicado pelo fato desses equipamentos (Laser 1 e LED) possuírem uma potência de saída do feixe em torno de 100mW +-2nm e o Laser nº2 apenas 40mW. Em termos de densidade de energia irradiada (fluência – J/cm²) aplicada nos tubos de ensaio com as amostras, verificou-se que com o Laser nº1 foram utilizados 18,54J/cm², o Laser nº2 foi de 7,2J/cm² e o LED 36J/cm².

Apesar da fluência do LED ter sido muito maior do que os lasers é importante ressaltar que o LED possui uma dispersão maior do feixe de luz devido às suas características de divergência em relação aos lasers, onde a luz tem características de coerência espacial e temporal, como também paralelismo, mas segundo Karu (2003), a coerência da luz não é importante nos resultados clínicos esperados pela fototerapia. Portanto, a radiação emitida por LEDs pode ser caracterizada como monocromática, não coerente e

espontânea e de acordo com os resultados obtidos e analisados pode-se corroborar com essa consideração.

Uma vantagem deste tratamento é sua ação local e restrita, assegurando uma manutenção na ecologia entérica que, normalmente é muito afetada pelos antibióticos, e mesmo a microflora de vários sítios na própria que também não é afetada pelo tratamento local (Wilson, Burns, Pratten, 1996).

Se pequenas doses de laser associadas a um corante ressonante são eficientes para eliminar as bactérias periodontopatogênicas *in vitro*, a terapia fotodinâmica é um meio útil para eliminação destas bactérias nas bolsas periodontais (Wilson e Yanni, 1993 e Wilson, Dobson e Sarkar, 1993). E, como as periodontites crônicas e agressivas são infecções localizadas, esta terapia apresenta-se como uma opção de tratamento em que não há necessidade de administração sistêmica de agentes de sensibilização, porque estes podem ser aplicados diretamente, pela irrigação subgengival.

Diversas fontes de luz (lasers, luz policromática e outras) foram utilizadas ao longo dos anos, usando-se principalmente comprimentos de onda no espectro visível e mais especificamente no vermelho associados a vários corantes, devido à boa penetração deste comprimento de onda nos tecidos biológicos (Karu, 2003). Além disso, alguns trabalhos mostram que o tratamento com luz vermelha, ou azul, pode ser empregado como método terapêutico, para inativar determinadas bactérias periodontopatogênicas, que sintetizam porfirinas, cromóforos endógenos naturais, sem o uso de um fotossensibilizador externo (Henry *et al.*, 2000 e Konig *et al.*, 2000). Portanto, ambas as técnicas (luz ou luz + fotossensibilizador) podem ser propostas como potenciais terapias, de baixo custo, para o tratamento e prevenção de doenças. O importante na terapia fotodinâmica é a capacidade de excitar o fotossensibilizador em seu alvo com um mínimo efeito circunvizinho (Ribeiro *et al.*, 2005).

Frente ao exposto acima, se constata que as características de coerência e paralelismo dos lasers não são relevantes para a PDT, tendo em vista que os resultados obtidos com o LED não tiveram diferença estatística significativa em relação aos lasers.

A terapia fotodinâmica é um eficiente método de redução bacteriana, sendo o seu uso na Odontologia bem indicado, visto que a terapia fotodinâmica se mostra muito eficiente em infecções localizadas, de pouca profundidade e de microflora conhecida. Os trabalhos encontrados na literatura mostram a viabilidade de uso desta terapia, como auxiliar no tratamento de infecções na cavidade oral, por ser a PDT uma terapia de baixo custo e, principalmente, com mínimos efeitos colaterais sem efeitos sistêmicos, além de não haver o risco de provocar resistência bacteriana.

Os LEDs também são uma nova e boa opção para a sensibilização letal das bactérias avaliadas.

6 – CONCLUSÃO

Os corantes azul de toluidina e azul de metileno tiveram melhor comportamento em relação à avaliação de linearidade de absorção pelos equipamentos de luz (lasers e LED) do que o verde de malaquita.

Em relação aos corantes testados, o corante azul de toluidina (TBO) a 0,01% associado aos lasers e ao LED apresenta adequado potencial para a utilização em PDT na sensibilização letal das bactérias *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* nos parâmetros utilizados no experimento ($\Delta t=3$ minutos).

Os resultados estatísticos obtidos pelo Teste *t-student* demonstraram que os grupos PDT (grupos 6, 7, 8) são diferentes do grupo controle para $p=0,05$ e os valores percentuais de redução bacteriana dos grupos PDT foram de 99,8% no grupo 6, 81,9% no grupo 7 e 99,8% no grupo 8 para o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, de 93,7% no grupo 6, 84% para o grupo 7 e 99,8% no grupo 8 para o *Fusobacterium nucleatum* e 26,3% no grupo 6, 38,6% no grupo 7 e 49,5% no grupo 8 para a *Prevotella intermédia*.

7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação da redução bacteriana para as bactérias periodontopatogênicas utilizadas no experimento em relação a vários tempos de irradiação.
- Analisar o índice de efetividade de sensibilização letal das bactérias testadas em relação à dosimetria
- Estudar qual o mecanismo de destruição bacteriana que acontece nas bactérias avaliadas em termos estruturais e moleculares e se esta morte é por necrose ou apoptose e quais as estruturas lesadas.
- Conhecer os mecanismos físicos dos corantes utilizados no experimento e determinar uma concentração ideal que fotossensibilize os microorganismos e que não interfira nos sistemas biológicos.
- Aprimorar a leitura digital das UFCs na placa de *Petri*.

ABSTRACT

The aim of the present study is to evaluate *in vitro* lethal sensibilization of periodontopathogenic bacteria: *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) and *Prevotella intermedia* (Pi) by using toluidine blue (0.01% w/v) as photo sensitizer and comparing the irradiation of identical solutions of bacteria with photo sensitizer by three light sources: two lasers systems of different companies (660 nm) and one LED equipment (light emitting diode, 630 nm). For each species, they were established a control group and different test groups, among them: Group 6 (Fn, Aa and Pi) – bacteria solution irradiated by laser 1; Group 7 (Fn, Aa and Pi) – bacteria solution irradiated by laser 2 and Group 8 (Fn, Aa and Pi) – bacteria solution irradiated by LED. Irradiation protocol followed the literature recommendations: 5 minutes of pre-irradiation time and 3 minutes of irradiation. Results reveal that the bacteria reduction for the irradiated groups (6, 7 and 8) in comparison with control group is statistically significant ($p < 0.05$). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* presented important level of reduction (99.8% for Group 6Aa, 81.9% for Group 7Aa and 99.8% for Group 8Aa) as well as *Fusobacterium nucleatum* (93.7% for Group 6Fn, 84% for Group 7Fn and 99.8% for Group 8Fn). *Prevotella intermedia* presented low level of reduction (26.3% for Group 6Pi, 38.6% for Group 7Pi and 49.5% for Group 8Pi). Toluidine blue at concentration of 0.01% w/v is an effective photosensitizer for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* when irradiated with the light wavelength in the range of 630 to 660 nm using laser or LED light sources.

Keys words - periodontopathogenic bacteria, Photodynamic Therapy, lethal sensibilization

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Abergel, R.P.; Lyons, R.F.; Castel, J.C.; Dwyer, R.M., Uitto, J. Bioestimulation of wound healing by lasers: Experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures, apud: Skinner, S.M.; Gage, J.P.; Wilce, P.A.; Shaw, R.M. A preliminary study on the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Australian Dental Journal.*, v. 41, n.3, p.188-189, 1996
2. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001 Feb; 74(5):656-69.
3. Beck J.D. Methods of assessing risk for periodontites and developing multifactorial models. *J. Periodontology* 1994; 65 p.468-478
4. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol* 1997;65(6):1026-31.
5. _____. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol* 1998 Sept; 68(3):370-76.
6. Borissevitch I, Schaberle F. A. Fotoquimioterapia – Um Novo Método de Tratamento de Doenças Graves. Princípios Básicos. Disponível em URL: <http://dfm.ffclrp.usp.br/fabio/fotoquimioterapia.htm>. Acesso em 24 outubro de 2006.
7. Brugnera Jr A., Villa R. G., Genovese, W.J. Laser em Odontologia. São Paulo: 1991, p-19-20.

8. Bunge, A.V. "Introdução à Quântica Química", Ed. Edgard Blücher Ltda, 1977.
9. Carranza F.A. Jr, Saglie R, Newman M.G., *et al.*: Scanning and transmission electron microscopic study of tissue-invading microorganisms in localized juvenile periodontitis. J Periodontol 1983; 54:598.
10. Cecchini, S.C.M. Estudo *in vitro* das aplicações do laser de Hólmio:YLF em esmalte e dentina, visando a realização de cirurgia de acesso endodôntico e preparo cavitário. São Paulo, 1995 Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
11. Christersson LA, Zambon JJ, Genco RJ: Dental bacterial plaques. Nature and role in periodontal disease. J Clin Periodontol 1991; 18:441.
12. Cooper G.M. A célula – Uma abordagem molecular 2^a ed. Ed Artmed 2001 cap 13; p.547.
13. Cruañes, J. C. La Terapia laser, Hoy. Barcelona: Centro de Documentación Laser de Meditec, 1984, p.39-69.
14. Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. Clin Oral Implants Res 2001 Apr;12(2):104-08.
15. Doria Filho, U. Introdução à Bioestatística. Negócio Editora, 5^a ed. 2001, p-91.
16. Dzink J.L., Socransky S.S., Haffajee A.D: The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988; 15:316.

17. Ferreira MVL, Ferreira LF. Patente requerida - Agente Fotossensibilizador: Processo de Preparação e sua Utilização, PI0603621-0, 2006.
18. Francisco, J.S. *et al.* Evaluation and Image Pro-plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. Brazilian Oral Res. vol.18nº2. São Paulo, April/June, 2004.
19. Garcez Segundo A.S. Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2002.
20. Garcez Segundo AS, Souza FR, Nunez SC, Kather JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. Rev. APCD 2003 maio/jun; 57(3):223-26.
21. Genco R., Cohen D.W. Goldman H.M. Periodontia Contemporânea. 1ª ed. Livraria Ed. Santos, 1996 p.63
22. Grossi S.G. *et al.* Assessment of risk for periodontal disease I. Risk indicators of attachment loss. J. Periodontology, 1994: 65 p.360-267.
23. Guillet H., Miro, L. Aplicações do Laser em Medicina. In: Maillet H. O laser – Princípios e técnicas de aplicação. São Paulo: Ed. Manole, 1987.p.153.
24. Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser: Atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence; 2004. p. 19-23 e 232.
25. Haake S.K. Microbiologia periodontal In: Carranza FA, Newman MG. Periodontia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 87.

26. Hanna, M.W. "Mecânicas de quantum em Química"; 2^o ed., W. A. Benjamim, Inc., Califórnia 1969, pág., 51.
27. Henry CA, Dyer B, Wagner M, Judy M, Matthews JL. Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilms of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. J Photochem Photobio B 1996; 34:123-28.
28. Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. Lasers Med Sci 1999;14:150- 57.
29. Jolkovsky DL, Ciancio SC. Antimicrobianos e outros agentes quimioterápicos no tratamento periodontal. In: Carranza FA, Newman MG. Periodontia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 542.
30. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 127-32.
31. Kawamoto K, Senda N, Shimada K, Ito K, Hirano Y, Murai S. Antibacterial effect of yellow He-Ne laser irradiation with crystal violet solution on *Porphyromonas gingivalis*: an evaluation using experimental rat model involving subcutaneous abscess. Lasers Med Sci; Mar; 2000; 15:257-62.
32. Karu, T. Low-Power Laser Therapy. Biomedical Photonics Handbook. Fev. 2003. p.48-20
33. Kolenbrander PE, London J: Adhere today, here tomorrow: oral bacteria adherence. J. Bacteriol 1993; 175:32-47.
34. König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. Cell Mol Biol 2000; 46(7):1297-303.

35. Kornman KS, Robertson PB: Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. J Periodontol 1985; 56:443.
36. Lai CH, Listgarten MA, Shirakawa M, *et al.*: *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1987; 2:152.
37. Li-Chan E. C. Y., A Aplicação da Espectroscopia Raman em Ciências; Science & Technology, Nov. 1996 V.7 p.361.
38. Loesche W.J., Syed S.A., Schmidt E, *et al.*: Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J Periodontol 1985; 56:447.
39. Lotufo R, et al., Tratamento Antimicrobiano em Periodontia – Tratamento Não Cirúrgico. Revista Periodontia. Vol 15, nº4, 2005. p.109-11.
40. Mailliet, H. O laser – Princípios e técnicas de aplicação. São Paulo: Ed. Manole, 1987. p.1.
41. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. New trends in photobiology (invited review) bactericidal effects of photoactivated porphyrins-an alternative approach to antimicrobial drugs. J Photochem Photobiol B 1990; 5:281-93.
42. Marsh & Martin. Microbiologia Oral, São Paulo Editora Santos, 4ª Ed. 2005, P.20-9.
43. Michalowicz BS, Ronderos M, Câmara-Silva R, *et al.* Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. J Periodontol 2000; 71:981.
44. Moore W.E.: Microbiology of periodontal disease. J Periodontal Res 1987; 22:335.

45. Newman M.G., Socransky S.S., Savitt E.D., *et al.*: Studies of the microbiology of periodontitis. *J Periodontol* 1976; 47:373.
46. Newman M.G., Socransky S.S., Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res* 1977; 14:120.
47. Oliveira, H.P.M, Machulek Jr. A, Legendre A. O. and Gehlen M.H. Transferência de energia entre corantes catiônicos em sistemas homogêneos. *Quimica Nova*, vol 26, nº4, Julho/Agosto, São Paulo 2003.
48. Pazos M.C., Soares C.P., Silva N.S., Matta R.A., Pacheco M.T. Ultrastructural effects of two phalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. *Biocell* 2003;27(3):301-09.
49. Pfitzner A, Sigusch W, Albrecht V, Glockmann E. Killing of Periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J. Periodontology* 2004, 75: 1343-1349.
50. Prates, R.A., *et al.* Bacterial effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 86, 2006
51. Ribeiro M.S., Groth E.B., Yamada A.M., Garcez A.S., Suzuki L.C., Prates R.A., Nunez, S.C.: Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na odontologia. Cap 07; Livro Virtual; 25º CIOSP; São Paulo; 2005.
52. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 1993 May; 28 (3):204-10.
53. Slots J: The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 1977; 85:114.

54. Slots J: Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol 1979; 6:351.
55. Soukos N.S., Wilson M, Burns T, Speight P.M. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. Lasers Sug Med 1996 Jun; 18; 253-59.
56. Sousa GR. Reparação óssea de lesões perirradiculares tratadas ou não com laser em baixa intensidade ($\lambda=904$ nm): estudo radiográfico em humanos. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2001.
57. Sthal, F. Ashworth S.H., Jandt K.D., Mills R.W. Light Emitting Diode (LED) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. Biomaterials, 2000; 21:1379-1385.
58. Taylor, J.R. French, P.M.W. How Laser Are Made. New York: Facts on file publications threshold books limited. 1987. p.32
59. Ten Cate A.R. Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 54.
60. Trelles, M.A.; Mayayo, E. Mast cells are implicated in low power laser effect on tissue. A preliminary study. Lasers in Medical Science, n.7, 1992; p. 73-77.
61. Turnér, J.; Hode, L. Low Level Laser Therapy – Clinical Practice and Scientific Background. Estocolmo: Suécia. Prisma Books. 1999. p. 59-60.
62. Usacheva M.N, Maththew C. Biel, M.A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. J. Photochemistry and Photobiology B: Biology, 71. 2003 p.87-98

63. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol* 1993 Oct; 75 (4):299-306.
64. Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrobial Chemother* 1996 Feb; 37 (2):377-81.
65. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol* 1995 May; 78 (5):559-74.
66. Wilson M, Dobson J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 1993; 16 (4):414-15.
67. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol* 1992; 25:77-81.
68. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol* 1993 Jun; 8 (3):182-18.
69. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitization of *Staphylococcus aureus*. *Microbios* 1995 Feb; 78:163-68.
70. _____. Sensitization of *Staphylococcus aureus* to killing by low-power laser light. *J Antimicrobial Chemother* 1994; 33:619-24.
71. Wilson M, Yianni C. Killing of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. *J Med Microbiol* 1995; 42:62-6.

72. Zanin I.C.J., Gonçalves R.B. Novas perspectivas do uso do laser terapêutico In: Brugnera Júnior A, Santos A.E.C., Bologna E.D., Ladalardo T.C.C.G. Laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos; 2003. p. 99-102.
73. Zanin F., Brugnera Júnior, A. Clareamento Dental com Luz-Laser. Atlas Colorido. RGO, Rio Grande do Sul. 2002 p 8: 10 -12: 26.
74. Zambo J.J., Reynolds HS, SlotsJ: Blackpigmented Bacteróides spp -. In the human oral cavity. Infect Immun 1981; 32:198.

ANEXO 1

Fontes de luz

Nos 20 anos de história das comunicações ópticas, viu-se uma notável evolução na tecnologia das fibras, dos Lasers, dos LEDs (Light Emitting Diodes) e fotodetectores que permitem aos sistemas ópticos não apenas substituir os elétricos com vantagens operacionais, mas também realizar funções que eram antes impossíveis. Existem várias fontes ópticas que podem ser utilizadas em odontologia como os Lasers e os LEDs.

De acordo com Ackroyd *et al.* (2001), as primeiras fontes de luz utilizadas eram lâmpadas convencionais, com luz não-coerente, policromática e forte componente térmico associado. Com o desenvolvimento do laser, este se mostrou mais eficiente que lâmpadas comuns, para uso em terapia fotodinâmica. O laser produz luz monocromática com comprimento de onda bem conhecido, o que o torna altamente seletivo aos corantes. A dose de radiação é facilmente calculada e a área da radiação pode ser bem controlada. Além disso, a radiação pode ser transmitida por fibra óptica e esta pode receber adaptações para melhor acesso à lesão, como microlentes e difusores.

O laser apresenta características particulares que o diferem das demais fontes luminosas, como monocromaticidade, caracterizada pela emissão de fótons com o mesmo comprimento de onda e, portanto, apenas uma cor; coerência, resultante de mesmo comprimento de onda e mesma fase, além da direcionalidade, definida pela capacidade da luz de se propagar em uma única direção (SOUSA, 2001).

Laser

“A palavra LASER é o acrônimo de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, isto é: “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”.

A emissão estimulada foi descrita pela primeira vez em 1917, por *Einstein*, de forma teórica. A primeira possibilidade de aplicação desse

fenômeno à amplificação de ondas ultracurtas (*maser - microwave amplification stimulated emission of radiation*) foi definida por *C. H. Townes* em 1951 e recebeu a confirmação experimental em 1954 (MAILLET, 1987).

A primeira publicação em matéria de Lasers foi o artigo de *A. L. Schawlow* e *C.H. Townes*, em dezembro de 1958, tendo repercussão mundial nos meios científicos (MAILLET, 1987).

O primeiro laser construído foi um laser de rubi ($\lambda = 694,3\text{nm}$), por *Theodore Maiman*, na Califórnia-USA, em 1960 (MAILLET, 1987)”.

Em 1963, equipes médicas americanas comandadas por *Zweng* e *Vassiliadis* em São Francisco e *Campbell* em Nova York, divulgaram os primeiros resultados clínicos obtidos com Lasers, despertando interesse entre outros profissionais como *Goldman* em dermatologia, *Stern* em odontologia, *Klein, Fine* e *Mac Guff* em oncologia.

Contudo, os primeiros aparelhos ao alcance dos médicos não eram suficientemente dignos de confiança, levando a alguns acidentes, que vieram deter o avanço do laser em medicina, de forma que à euforia inicial, sucedeu-se o desinteresse por essa nova técnica.

A partir de 1968, *Esperance*, nos USA, substituiu o laser de rubi por um laser contínuo de argônio, aparentemente menos perigoso, crescendo de novo o interesse da comunidade médico-científica nos Lasers (GUILLET e MIRO,1987)”.

Propriedades do Laser

A luz laser apresenta características particulares que a difere das demais fontes luminosas, como:

Monocromaticidade

É caracterizada por emissão de fótons, todos com o mesmo comprimento de onda, e, portanto, com uma única cor (FIG. 2), diferindo-se da

luz proveniente de filamentos incandescentes ou lâmpadas, que por sua vez, são constituídas de vários comprimentos de onda (FIG. 1) (CECCHINI, 1995)

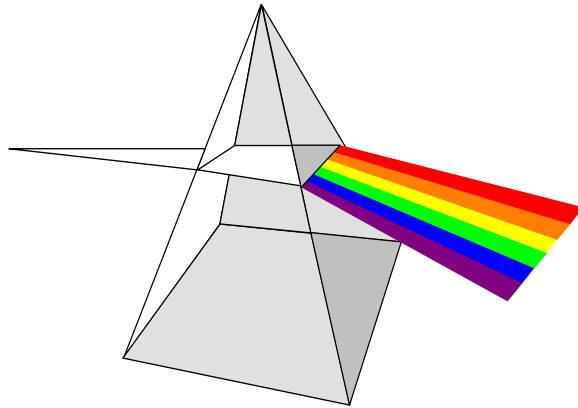


FIGURA 1 – Representação artística da dissociação da luz policromática quando emitida sobre um prisma

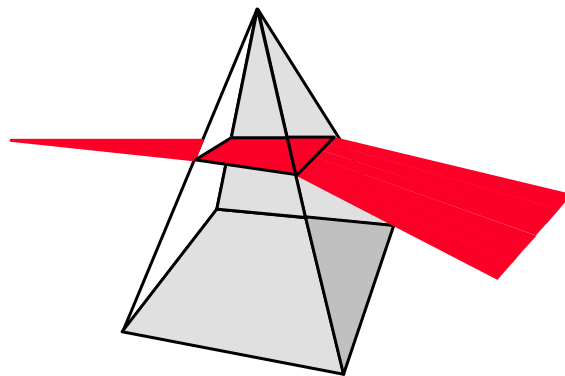


FIGURA 2 - Representação artística da luz monocromática (por ex. um laser) sobre um prisma, mostrando que não ocorre a sua dissociação, mantendo as características.

Coerência

A coerência ocorre quando se tem ondas de mesmo comprimento e em fase, isto é, as ondas caminham de forma similar no espaço e no tempo, como um exército marchando com movimentos sincronizados. Tal característica não ocorre com a luz comum, onde diversas ondas são emitidas, cada qual com sua frequência e seu comprimento de onda característicos, de forma a viajar no espaço e no tempo incoerentemente, como um grupo de indivíduos andando de forma aleatória (CECCHINI, 1995).

As oscilações são uniformes, quando caminham no espaço de modo ordenado sem perda de energia, possuindo ondas justapostas, cuja amplitude tem valores iguais, e sua trajetória apresenta-se ordenada em relação ao tempo, onde deve haver coincidência de cristas e vales das ondas, bem como, mesma frequência (FIG.3) (BRUGNERA *et al.*, 1991)

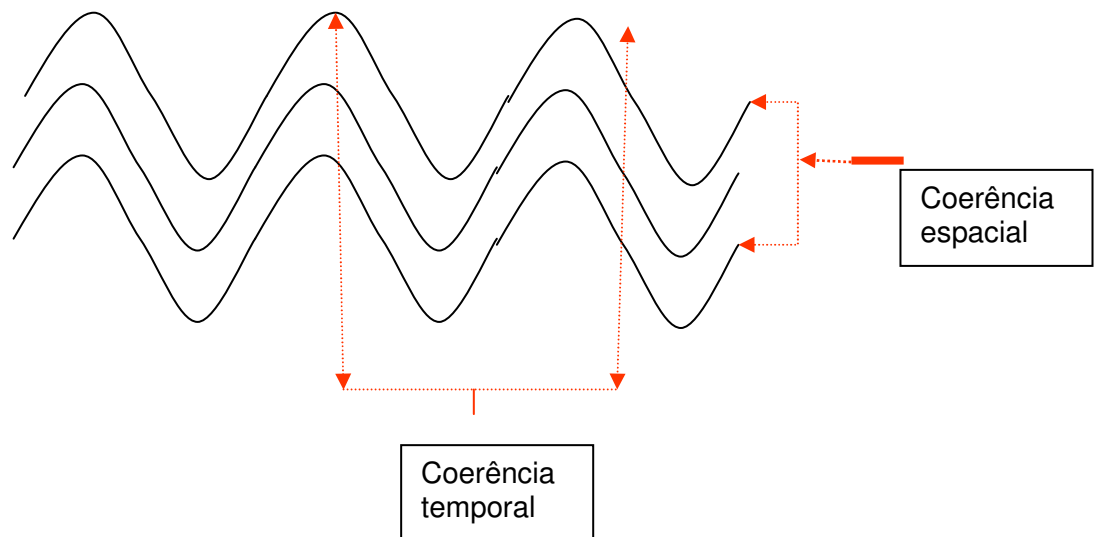


FIGURA 3 - Representação artística de ondas ilustrando coerência espacial e temporal

Direcionalidade

É definida pela capacidade que a luz laser possui de se propagar em uma única direção (FIG. 4 e.5) (TAYLOR e FRENCH, 1987).

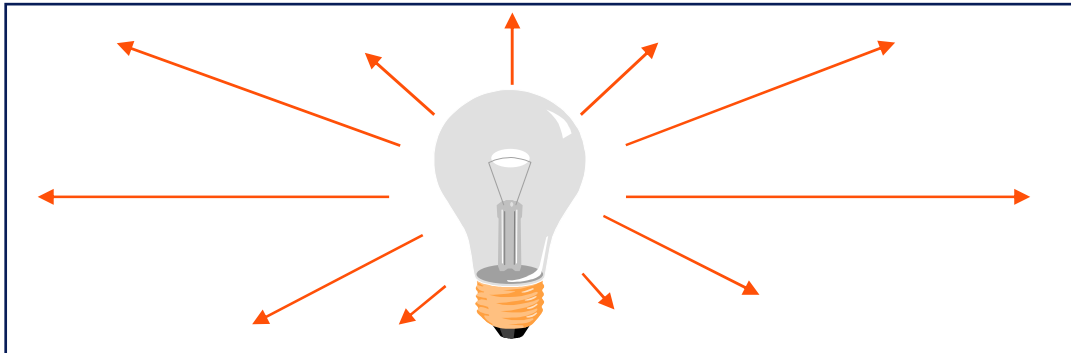


FIGURA 4 – Representação artística de ondas gerada por uma luz incandescente e emitida em todas as direções



FIGURA 5 – Representação artística de ondas geradas por um laser, mostrando paralelismo

Classificação dos Lasers

Os Lasers são classificados em Lasers em baixa intensidade, que são Lasers que têm efeitos teciduais não térmicos e Lasers em alta intensidade com efeitos térmicos sobre os tecidos biológicos.

A utilização dos Lasers em baixa intensidade tem sido estudada desde os anos 60, principalmente pelo grupo do *Prof. Endre Mester* que foi um dos pioneiros no uso do laser nos tecidos biológicos, objetivando um aumento da velocidade de reparação tecidual (TURNER e HODE, 1999).

Nas pesquisas feitas até o momento atual, constatou-se que os Lasers em baixa intensidade promovem vários efeitos terapêuticos como: efeitos analgésicos, antiinflamatórios e trófico-regenerativos.

Os efeitos demonstrados levam ao aumento da microcirculação local, aumento da drenagem linfática, proliferação celular e dos fibroblastos, levando a um aumento na síntese de colágeno (CRUAÑES 1984, TRELLES & MAYAYO 1992; ABERGEL *et al.* 1996) entre outros.

LEDs (Light Emitting Diode)

Os LEDs, são estruturas compostas por dois materiais semicondutores nos quais, em sua junção, por diferença de cargas, ocorre a emissão de luz, sem aumento de temperatura (TALES *et. al*, 1998), e emissão é espontânea diferindo-se dos Lasers, que produzem emissão estimulada de radiação (ZANIN & BRUGNERA, 2002).

Um LED ou diodo emissor de luz é um componente eletrônico formado por material semicondutor que emite luz quando uma corrente elétrica passa através desse. Os LEDs emitem luz por meio da movimentação de elétrons através de diferentes materiais semicondutores, produzindo uma emissão espontânea de fótons não coerentes.



Figura 6 - LED que emite luz azul

LEDs (Light Emitting Diode) (FIG 6) são diodos especiais que emitem luz quando conectados em um circuito. Eles são freqüentemente usados como luz “piloto” em equipamentos eletroeletrônicos indicando quando o circuito está fechado ou não. Os dois filamentos que existem debaixo do LED indicam como eles deveriam ser conectados num circuito. O lado negativo de um LED é indicado de duas maneiras: 1) pelo lado plano do bulbo 2) pelo mais curto dos dois fios que estendem dos LEDs. A parte anterior negativa do LED deveria ser conectada na parte negativa da bateria. LEDs operam em tensões relativamente baixas, entre aproximadamente de um a quatro volts e com correntes de aproximadamente 10 a 40 milliamperes. Tensões e correntes acima desses valores podem derreter o *chip* de um LED. A parte mais importante de um LED é o *chip* de um semiconductor localizado no centro do bulbo. O *chip* tem duas regiões separadas por uma junção. A região *p* é dominada por cargas elétricas positivas e a região *n* é dominada por cargas elétricas negativas. A junção age como uma barreira ao fluxo de elétrons entre a região *p* e a região *n*. Somente quando suficiente tensão é aplicada no *chip* do semiconductor, pode a corrente fluir com os elétrons transitando para a região *p* (FIG.7).

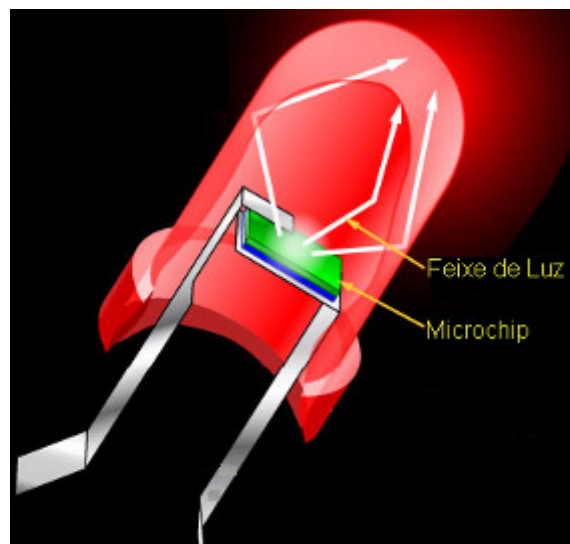


Figura 7 - *Microchip* do LED

Entre os dispositivos usados como fonte de luz, os LEDs são os mais simples e baratos, e sua principal desvantagem em relação aos Lasers reside no espectro mais largo de luz gerada. Mas são extremamente mais eficazes do que a luz halógena, por possuírem um espectro de emissão bem mais estreito que estas, (STAHL *et al.*, 2000).

A diferença básica entre LEDs e Lasers é que nos primeiros predomina o mecanismo da emissão espontânea de radiação e nos Lasers a emissão da luz é estimulada. Desta distinção básica decorrem as diferenças estruturais entre os dois dispositivos, nem sempre acentuados, gerando diferenças funcionais, que dão aos Lasers um desempenho geralmente superior, porém, mais cara e complicada (KARU, 2003).

Os Lasers precisam de grande quantidade de energia para sua geração, enquanto os LEDs necessitam de pouca energia para a geração de luz. Entre os dispositivos utilizados como fonte de luz em odontologia, os LEDs são os mais simples e baratos. Apresentam um largo espectro de luz sendo mais utilizados em sistemas de transmissão de menor capacidade. Embora sejam umas fontes de luz divergente e não coerente semelhante à luz halógena, apresentam um espectro de emissão bem mais estreito, tendo um aproveitamento bem melhor que a luz halógena (STHAL *et al.*, 2000).

Os Lasers precisam de grande quantidade de energia para sua geração enquanto os LEDs necessitam de pouca energia para a geração de luz. (STHAL *et al.*, 2000).

Quando é aplicada tensão suficiente ao *chip* no plano anterior do LED, elétrons podem mover em uma única direção através da junção entre a região *p* e *n*. Na região *p* existem muito mais cargas positivas do que negativas. Na região *n* os elétrons negativos são mais numerosos do que os com carga positiva. Quando uma tensão é aplicada e uma corrente começa a fluir, elétrons da região *n* apresentam energia suficiente para moverem-se através da junção até a região *p*. Uma vez na região *p* os elétrons são imediatamente atraídos pela carga positiva (atração mútua das forças de Coulomb) devido a atração entre cargas elétricas opostas. Quando um elétron move suficientemente próximo a uma carga positiva na região *p*, as duas cargas se recombinam. A cada momento um elétron recombina com uma carga positiva

sendo que uma energia potencial elétrica é convertida em energia eletromagnética. Para cada recombinação de carga positiva e negativa, um quantum de energia eletromagnética é emitido na forma de fóton de luz com uma frequência característica de um material semiconductor (usualmente uma combinação de elementos químicos como gallium, arseneto e fósforo). Somente fótons com frequências muito baixas podem ser emitidos por qualquer material. LEDs que emitem cores diferentes são feitos de materiais semicondutores diferentes requerendo diferentes energias para iluminarem.

A energia elétrica é proporcional à tensão necessária para fazer fluir elétrons através da junção *p-n*. Os diferentes LEDs coloridos emitem predominantemente luz de uma única cor. A energia da luz emitida por um LED esta relacionada a carga elétrica de um elétron e a tensão exigida para iluminar um LED que é dada pela expressão; $E=qV$ joules. Esta expressão simplesmente diz que a tensão é proporcional à energia elétrica e é uma declaração geral que aplica a qualquer circuito, como também para LEDs. A constante q é uma carga elétrica de um único elétron, $-1,6 \times 10^{-19}$ coulomb. Suponha que você mediu a tensão através do plano anterior de um LED e você deseja achar a energia requerida para iluminar o LED. Se tivermos um LED vermelho, por exemplo, e a tensão medida entre os planos anteriores é 1,71 volts, então a energia requerida para iluminar o LED é dada pela expressão $E=qV$ ou $E= -1,6 \times 10^{-19} (1,71)$ joule, desde que um coulomb volt é um joule. Multiplicando esses números temos então $2,74 \times 10^{-19}$ joule. A frequência da luz é relacionada ao comprimento de onda de um modo muito simples. O espectrômetro pode ser usado para examinar a luz dos LEDs e calcular o pico máximo de luz emitido pelo comprimento de onda do equipamento. O comprimento de onda é relacionado à frequência de luz por: $f=c/\lambda$ onde c é a velocidade da luz (3×10^8 m/s) e λ é o comprimento de onda de luz de leitura do espectrômetro (em unidade de nanômetros). Observando um LED vermelho através de um espectrômetro, e achando a gama de cores que os LEDs emitem com intensidade máxima correspondendo ao comprimento de onda de leitura no espectrômetro de $\lambda= 660$ nm, a frequência com qual o vermelho emite a maioria da sua luz é $4,55 \times 10^{14}$ hertz.

ANEXO 2

Espectroscopia

Espectroscopia, em física e físico-química, significa o estudo dos espectros. Baseia-se no fato de que cada elemento químico tem seu espectro característico. Esse fato foi observado em 1859 pelos cientistas alemães *Gustav Robert Kirchhoff* e *Robert Wilhelm Bunsen*. *Kirchhoff* e *Bunsen* desenvolveram o espectroscópio de prisma em sua forma moderna e o aplicaram às análises químicas. Esse instrumento é formado por uma fenda, pela qual entra a luz procedente de uma fonte externa, um conjunto de lentes, um prisma e uma ocular. No espectrógrafo, a ocular é substituída por uma câmera. O espectrofotômetro é usado para medir a intensidade da luz em comparação com a de uma luz procedente de uma fonte padrão. Essa comparação permite determinar a concentração da substância que produz esse espectro. A luz é emitida e absorvida em unidades minúsculas ou corpúsculos chamados fótons ou quanta. O átomo emite ou absorve um quanta de luz de uma cor determinada quando um dos seus elétrons salta de uma órbita para outra. Os componentes de uma molécula são os núcleos dos diferentes átomos que a formam e os elétrons que rodeiam cada núcleo. A emissão e a absorção de luz por parte de uma molécula correspondem a seus diferentes modos de rotação, aos modos de oscilação de seus núcleos atômicos e aos movimentos periódicos de seus elétrons nas distintas órbitas. Só é possível medir o comprimento da onda dos fótons emitidos por uma molécula ou átomo, é possível deduzir uma considerável quantidade de informações sobre sua estrutura e sobre os distintos modos de movimento periódico de seus componentes. A maioria das informações que os físicos têm sobre a estrutura do átomo foi obtida mediante espectroscopia. Os dois principais usos da análise espectral estão na química e na astrofísica. O espectro de um determinado elemento é absolutamente característico desse elemento. Quando se estimula uma substância desconhecida mediante uma chama, um arco voltaico, uma fagulha ou outro método apropriado, uma análise rápida com um espectrógrafo costuma ser suficiente para determinar a presença ou a ausência de um determinado elemento. Os espectros de absorção são, muitas vezes,

úteis para identificar compostos químicos. Os métodos magnéticos de espectroscopia na região do espectro das radiofrequências são muito úteis para proporcionar informação química sobre as moléculas e mostrar sua estrutura detalhada. (BUNGE, 1977, HANNA, 1969, LI-CHAN, 1996).

ANEXO 3

Medidas descritivas da transmissividade do Laser 1, Laser 2 e LED para a água (baseline) e os corantes azul de toluidina (TBO), verde de malaquita (VM) e azul de metileno (MB) utilizados no experimento 1, simulando as condições de teste e eliminando as possíveis conseqüências da atenuação da irradiação na cubeta.

Nas tabelas a seguir estão os valores obtidos pelo *Power Meter* para os Laser 1, Laser 2 e LED, onde foi encontrada a Linha de Base (água) que serviu como parâmetro para os corantes e a relação da calibração entre a potência declarada pelo fabricante nos equipamentos e a potência efetivamente irradiada na solução na cubeta de acrílico. O Laser 1 e o LED têm a potência fixa e para tal avaliação foi necessário um filtro de transmissão para variação da potência e para o Laser 2 não houve necessidade do filtro porque este equipamento tem uma regulação da potência.

Laser 1 (Ecco) 100mW	Água (a1)
100%	49,3
80%	40
60%	28,8
40%	17,95
20%	8,1
s/filtro	76,7

Laser 2 (mmoptics) 40mW	Água (a2)
40mW	40,8
35	35,7
30	30,5
25	25
15	15
10	9,4
s/filtro	40,8

LED	Água (a3)
100%	25,04
80%	22,11
60%	15,92
40%	9,87
20%	4,87
s/filtro	55,4

E nas tabelas a seguir do lado direito estão os valores percentuais encontrados para todos os corantes TBO (b), VM (c) e MB (d), tendo como parâmetro a linha de base da água (a) e no centro os valores das medidas descritivas da transmissividade dos corantes no experimento.

Laser 1 (Ecco) 100mW	TBO (b)	(b/a1) x 100%
100%	0,04	0,08
80%	0,04	0,10
60%	0,03	0,10
40%	0,01	0,05
20%	0,01	0,12
s/filtro	0,10	0,12

Laser 1 (Ecco) 100mW	VM (c)	(c/a1) x 100%
100%	0,12	0,24
80%	0,09	0,22
60%	0,07	0,24
40%	0,05	0,27
20%	0,02	0,24
s/filtro	0,2	0,26

Laser 1 (Ecco) 100mW	MB (d)	(d/a1) x 100%
100%	0,04	0,08
80%	0,03	0,07
60%	0,02	0,06
40%	0,01	0,05
20%	0,01	0,12
s/filtro	0,1	0,13

Laser 2 (mmoptics) 40mW	TBO (b)	(b/a2) x 100%
40mW	0,05	0,12
35	0,04	0,11
30	0,03	0,09
25	0,02	0,08
15	0,02	0,13
10	0,02	0,21
s/filtro	0,01	0,02

Laser 2 (mmoptics) 40mW	VM (c)	(c/a2) x 100%
40mW	0,15	0,42
35	0,12	0,33
30	0,09	0,29
25	0,06	0,24
15	0,04	0,26
10	0,02	0,20
s/filtro	0,01	0,02

Laser 2 (mmoptics) 40mW	MB (d)	(d/a2) x 100%
40mW	0,04	0,09
35	0,04	0,11
30	0,03	0,09
25	0,03	0,12
15	0,02	0,13
10	0,02	0,21
s/filtro	0,01	0,02

LED	TBO (b)	$(b/a3) \times 100\%$
100%	0,11	0,43
80%	0,12	0,54
60%	0,09	0,56
40%	0,06	0,60
20%	0	0
s/filtro	0,29	0,52

LED	VM (c)	$(c/a3) \times 100\%$
100%	0,15	0,59
80%	0,13	0,58
60%	0,09	0,56
40%	0,06	0,60
20%	0,03	0,61
s/filtro	0,31	0,55

LED	MB (d)	$(d/a3) \times 100\%$
100%	0,12	0,47
80%	0,11	0,49
60%	0,08	0,50
40%	0,05	0,50
20%	0,02	0,41
s/filtro	0,27	0,48

ANEXO 4

Medidas descritivas pelo Método Visual e Digital utilizadas no experimento

Na contagem visual em determinadas situações onde se tem uma saturação das UFCs na placa de *Petri* é utilizado como critério de avaliação considerar o número de colônias semeadas, que neste experimento foi considerado como 10^2 para o grupo 1 e 10^3 para os demais grupos.

Tabela 1 - Contagem de UFC/ml das três bactérias utilizando-se o método visual.

VISUAL	<i>Aa1</i>	<i>Aa2</i>	<i>Aa3</i>	<i>Fn1</i>	<i>Fn2</i>	<i>Fn3</i>	<i>Pi1</i>	<i>Pi2</i>	<i>Pi3</i>
G1- 10^2	57	89	83	70	58	100	100	100	100
G1- 10^3	1000	1000	1000	1000	1000	572	1000	1000	1000
G2	1000	1000	1000	73	197	97	1000	1000	1000
G3	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G4	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G5	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G6	0	0	4	23	60	61	736	726	749
G7	129	141	143	107	141	116	608	636	597
G8	1	3	0	2	0	3	512	487	516

Tabela 2 - Contagem de UFC/ml das três bactérias utilizando-se o método digital. Programa IMAGEPROPLUS versão 6.0 (Nos campos pontilhados não foi possível a contagem digital).

DIGITAL	Aa1	Aa2	Aa3	Fn1	Fn2	Fn3	Pi1	Pi2	Pi3
G1- 10 ²	44	73	71	41	52	557	---	---	---
G1- 10 ³	499	548	528	1198	---	---	4059	---	---
G2	595	739	571	64	44	80	2628	---	---
G3	559	581	602	1048	1056	803	---	---	---
G4	634	532	538	1040	1280	1624	4366	---	---
G5	1347	738	816	28	750	808	458	1597	---
G6	0	0	4	17	38	2	91	1701	475
G7	238	141	128	128	32	128	516	---	---
G8	1	3	1	2	0	3	80	604	7

Tabela 3 - Contagem de UFC/ml das três bactérias utilizando-se o método META-VISUAL, (> ou = a 749 considera-se 1000)

META-VISUAL	Aa1	Aa2	Aa3	Fn1	Fn2	Fn3	Pi1	Pi2	Pi3
G1- 10 ²	44	73	71	41	52	557	100	100	100
G1- 10 ³	499	548	528	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G2	595	739	571	64	44	80	1000	1000	1000
G3	559	581	602	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G4	634	532	538	1000	1000	1000	1000	1000	1000
G5	1000	738	816	28	1000	1000	458	1000	1000
G6	0	0	4	17	38	2	91	1000	475
G7	238	141	128	128	32	128	516	1000	1000
G8	1	3	1	2	0	3	80	604	7

As tabelas acima (TAB. 1, 2 e 3) foram elaboradas a partir dos resultados colhidos na contagem das UFC/ml das placas de *Petri* dos grupos avaliados, onde na tabela 1 têm-se os resultados obtidos na contagem visual, na tabela 2 os resultados obtidos pela contagem digital, utilizando-se o programa IMAGEPROPLUS versão 6.0 e a tabela 3 uma tabela meta-visual

onde todos os números acima de 749, que foi o número máximo de UFCs na contagem visual foram considerados como 1000.

A contagem visual (TAB 1) é feita utilizando-se uma caneta marcadora e só se consegue fazer esta contagem quando existe um número pequeno de pontos na placa de *Petri*.

Em relação à contagem digital (TAB 2) utilizando-se o programa IMAGEMPROPLUS versão 6.0 é uma tarefa em relação ao programa feita facilmente, só que existem algumas considerações que limitam a confiabilidade (FRANCISCO *et al.*, 2004).

Entre estas limitações pode-se considerar: A seleção do(s) filtro(s) adequado(s) depende apenas das características de cada grupo de fotos, ou mesmo das fotos individualmente, e seu erro teve de ser identificado visualmente durante a contagem e corrigido, aplicando-se outros filtros ou alterando a superfície limite.

A representatividade da área dos objetos a serem contados com relação à área da superfície limite afeta a interpretação do programa. Por exemplo, se houver poucos objetos de áreas relativamente pequenas em relação à superfície, o programa “refina” sua contagem, pegando pequenas variações de cor e considera também como objetos, gerando “erro grosseiro”, sendo assim, se tiver quatro objetos numa placa estes podem acabar sendo contados como mais de 8500. A correção neste caso pode ser feita por: análise segundo a área média, considerando apenas o número de objetos que se enquadravam numa dada classe de áreas; redução da superfície limite até o mínimo possível que englobasse toda a amostra; aplicação de filtros mais “suaves” ou mais “contrastantes”; ou, por fim, se nada disso der a devida confiabilidade, a contagem visual será a única saída.

Os erros considerados mais comuns do programa, excluindo os grosseiros citados acima, foram à superposição de objetos, quando dois objetos justapostos foram contados como apenas um, e a consideração de pequenas alterações de cor do fundo (geradas na aplicação de filtros) também como objetos (FIG. 8).

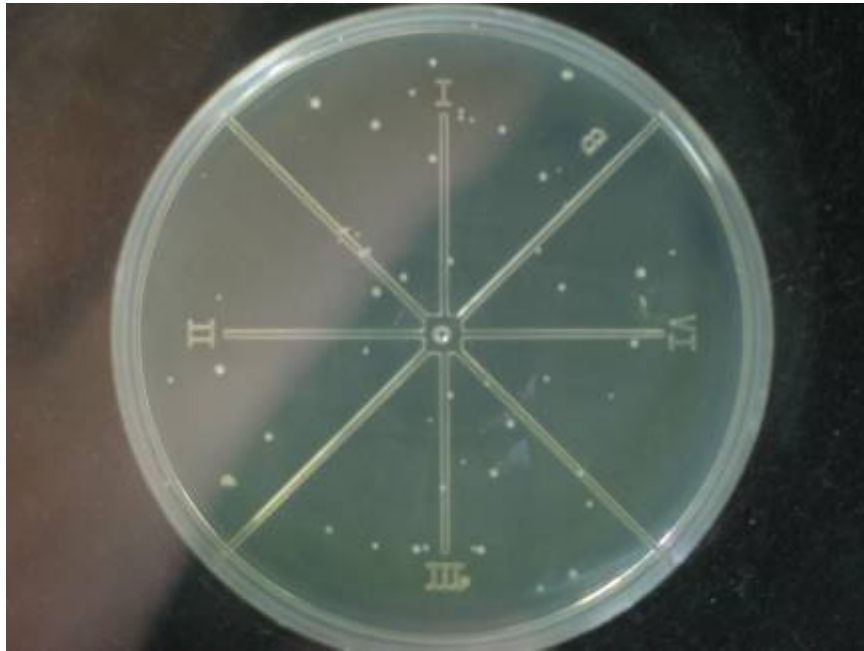


Figura 8 – Placa de *Petri* com alterações no fundo.

O uso de macros, ou automações, não foi possível. Essa facilidade funciona bem somente quando as fotos das amostras são tiradas em condições rigidamente iguais e homogêneas (luz bem distribuída, posição placa/câmera sempre igual) e também há similaridade entre as fotos em ordem de grandeza do número de objetos (como exemplos podem usar mesmas configurações para placas com 10 objetos e outras com 1000 certamente mostrarão grande erro, que pode ser minimizado separando-as em grupos por ordem de grandeza).

No caso das placas de *Petri* com demarcações no fundo, houve necessidade de definição da superfície que não as englobasse. Foi feita a análise de 1/8 do recipiente, o equivalente a uma divisão, com multiplicação pelo fator oito para estimativa do total (FIG.9).

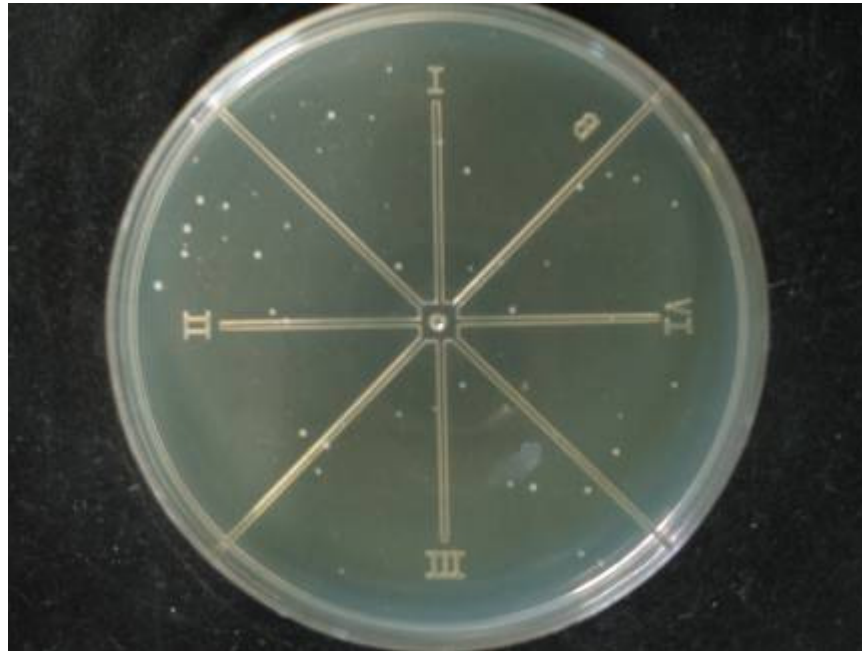


Figura 9 – Modelo de Placa de *Petri* com 8 divisões.

Algumas fotos da "*Prevotella intermedia*" possuíam resolução baixa dos objetos, dificultando a definição de seu contorno, o que não foi satisfatoriamente sanado com filtro algum e, portanto, a contagem não pôde ser efetuada (FIG. 10).

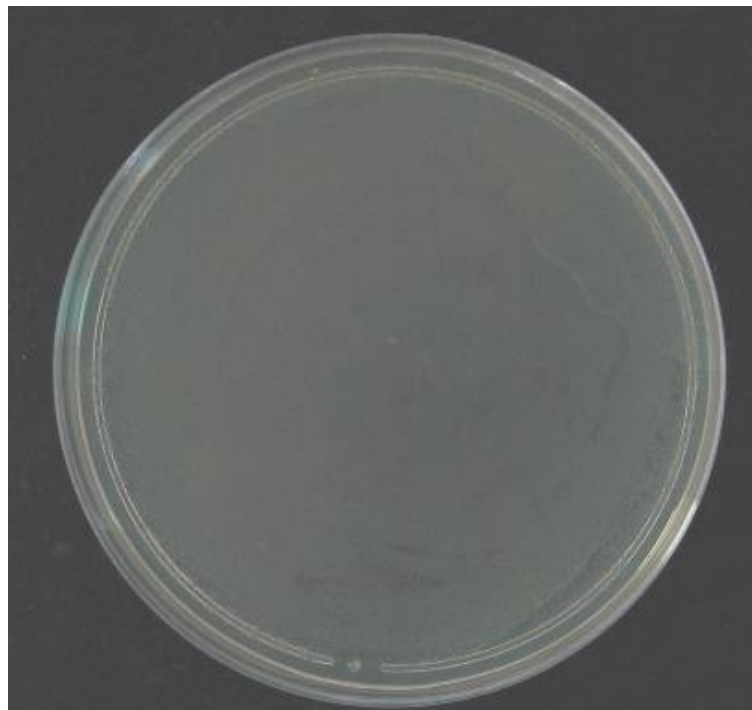


Figura 10 – Placa de *Petri* do Grupo1 com uma quantidade incontável de UFCs/ml

Leitura Visual e Metavisual para Aa

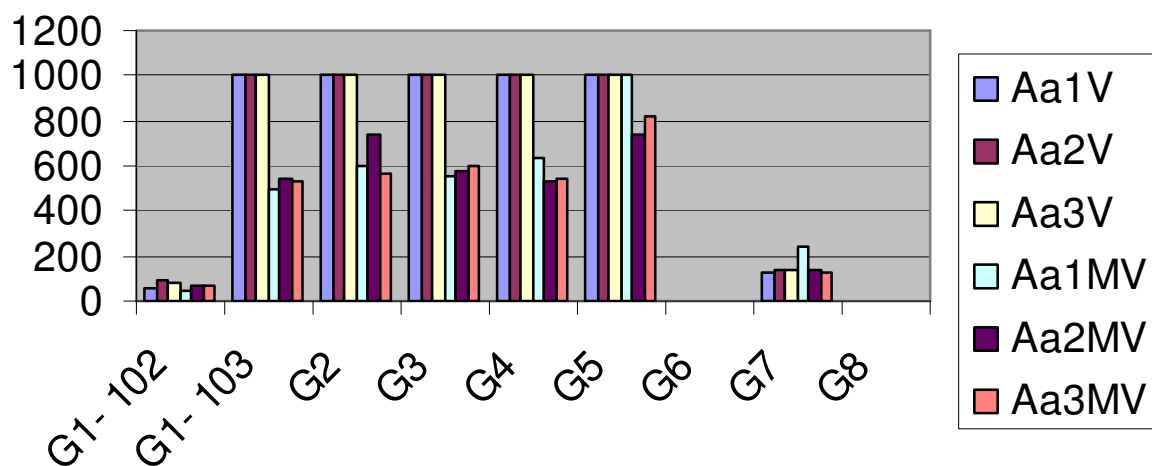


Gráfico comparativo entre a leitura visual e meta-visual para o *Actinobacillus actinomycetencomitans*, onde Aa1V, Aa2V, Aa3V são medidas visuais em triplicata para todos os grupos e Aa1MV, Aa2MV e Aa3MV são as medidas meta-visuais em triplicata para todos os grupos.

O gráfico acima mostra uma análise comparativa entre os grupos avaliados por contagem visual e meta-visual onde os resultados para os grupos com poucas colônias (Grupos 5, 6, 7, 8) são similares e os grupos com maior número de colônias (Grupos 1, 2, 3, 4) os resultados não são tão parecidos.

Leitura Visual e Meta-visual para Fn

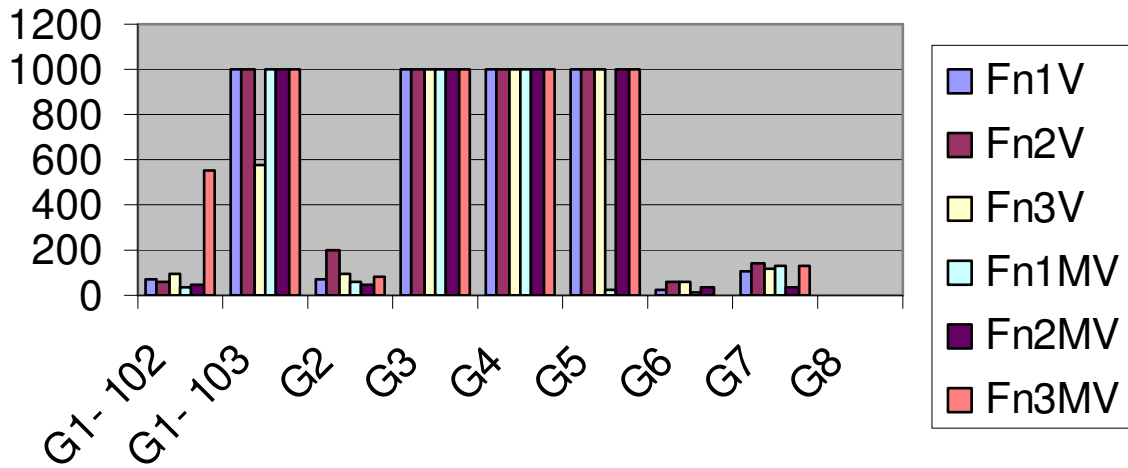


Gráfico comparativo entre a leitura visual e digital para o *Fusobacterium nucleatum*, onde Fn1V, Fn2V, Fn3V são medidas visuais em triplicata para todos os grupos e Fn1MV, Fn2MV e Fn3MV são as medidas meta-visuais em triplicata para todos os grupos.

O gráfico acima mostra uma análise comparativa entre os grupos avaliados por contagem visual e meta-visual onde os resultados obtidos são similares a não ser para o grupo 5 (Fn1MV) e grupo 1 (10³-Fn3MV).

Leitura Visual e Meta-visual para Pi

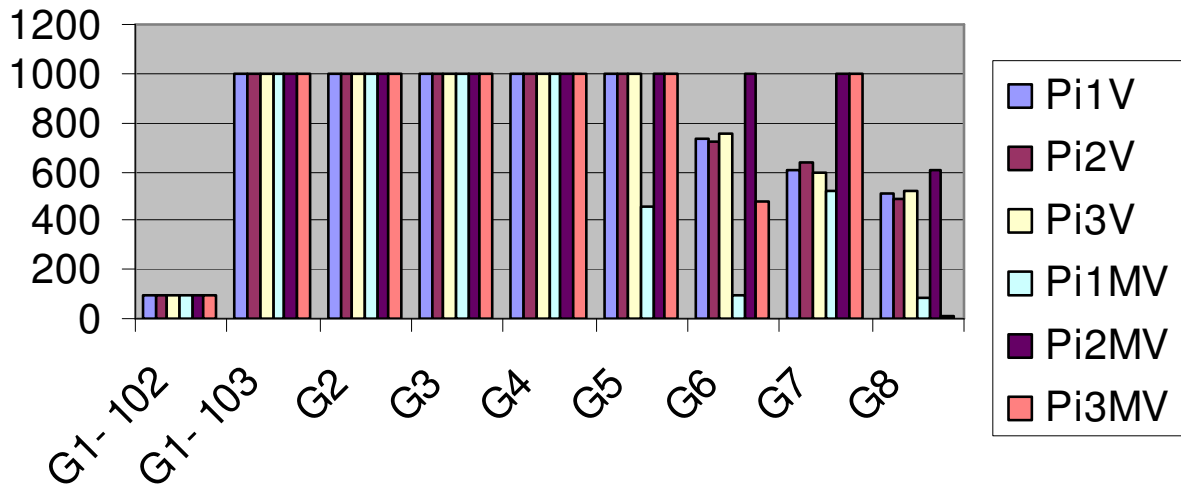


Gráfico comparativo entre a leitura visual e digital para a *Prevotella intermedia*, onde Pi1V, Pi2V, Pi3V são medidas visuais em triplicata para todos os grupos e Pi1MV, Pi2MV e Pi3MV são as medidas meta-visuais em triplicata para todos os grupos.

O gráfico acima mostra uma análise comparativa entre os grupos avaliados por contagem visual e meta-visual onde os resultados para os grupos 1, 2, 3, e 4 os resultados são iguais, porque na contagem digital foi impossível a contagem do número de colônias e então foi considerado máximo na contagem meta-visual para (10^3). Para os grupos 5, 6, 7 e 8 os resultados avaliados são diferentes.

De acordo com a avaliação comparativa entre as contagens visual e digital pode-se concluir que os resultados obtidos na contagem digital ficaram aquém das expectativas e para que se tenha um melhor aproveitamento das imagens nesta contagem, as fotos devem estar mais bem padronizadas e mesmo assim as limitações são relevantes. Diante dos resultados encontrados e após criteriosa análise foi feita a opção para a utilização dos dados obtidos na contagem visual.