

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

"Estudo da ação bactericida da terapia fotodinâmica do raio laser de baixa intensidade (AsGaAl) sobre bactérias causadoras de cárie de sulcos e fissuras de dentes humanos."

Marcelo José Pereira Zampieri

Dissertação de Mestrado apresentada no
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia,
como complementação dos créditos necessários para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

São José dos Campos, SP

2001

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

"Estudo da ação bactericida da terapia fotodinâmica do raio laser de baixa intensidade (AsGaAl) sobre bactérias causadoras de cárie de sulcos e fissuras de dentes humanos."

Marcelo José Pereira Zampieri

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr José Carlos Cogo.
Co-orientador: Prof. Dr Walter João Genovese.

São José dos Campos, SP

2001

Z29e

Zampieri, Marcelo José Pereira

Estudo da ação bactericida da terapia fotodinâmica do raio laser de baixa intensidade (AsGaAl) sobre bactérias causadoras de cárie de sulcos e fissuras de dentes humanos / Marcelo José Pereira Zampieri. -- José dos Campos : Univap, 2001.

52p. : il. ; 31cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2001.

1. Laser de baixa potência 2. Terapia fotodinâmica 3. Odontologia 4. Carie dentária 5. Engenharia Biomédica I. Cogo, José Carlos, Orient. II. Genovese, Walter João, Co-orient. III. Título

CDU: 539.12.04

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:

Data:

“Estudo da ação bactericida da terapia fotodinâmica do raio laser de baixa intensidade (AsGaAl) sobre bactérias causadoras de cárie de sulcos e fissuras de dentes humanos.”

Marcelo José Pereira Zampieri

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Carlos Cogo (Orientador)_ (UNIVAP) _____

Prof. Dr. Walter João Genovese (co-orientador)_ (UNICSUL) _____

Prof. Dr. Airton Vialta (ITAL) _____

Prof. Dr. Rodrigo Martins (UNIVAP) _____

Prof Dr Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D
São José dos Campos, 03 de dezembro de 2001

Dedicatória

Aos meus pais, com carinho, a quem devo tudo que tenho, tudo que sou, e de quem me orgulho muito.

A minha esposa que além de tornar minha vida mais doce me incentivou em todos os momentos.

A Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Cogo que me favoreceu integralmente em minha dissertação, abrindo mão muitas vezes de valores pessoais para que eu fosse favorecido.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Walter João Genovese, homem do mais puro senso científico a quem devo minha carreira acadêmico-científica ainda em fase de construção.

Ao Prof. Desidério Barbosa pelos ensinamentos desde a graduação até sua franca colaboração em minha dissertação.

Agradeço também ao Prof. Dr. Paulo José Bordini pelo grande incentivo e as bibliotecárias Rosangela R.C.Taranger, Rúbia Gravito de Carvalho Gomes , Rebeca Barbosa e a amiga Inês Macedo Confuorto .

Resumo

O presente trabalho tem como objetivos avaliar “*in vitro*” a atividade bactericida da terapia fotodinâmica com laser de baixa intensidade de diodo AsGaAl sobre as principais bactérias que constituem a microflora da cárie dental de humanos, além de verificar as melhores densidades energéticas e potências para esta atividade bactericida dos aparelhos laser. Das análises foram isoladas e identificadas por métodos microbiológicos e provas bioquímicas as cepas: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus acidophilus*(*sp*). Estas em seguida foram adquiridas em padrão ATCC das bactérias acima identificadas onde padronizou-se os inóculos, com a finalidade de se obter um número provável e contável das bactérias citadas de acordo com a literatura mundial. Nesta fase da pesquisa foi associada a diluição o uso de um corante a orto toluidina, visto que este, tem a propriedade de aumentar a capacidade de absorção da luz laser sobre estas bactérias. As cepas de bactérias foram submetidas a avaliação bactericida “*in vitro*” utilizando-se para tanto três lasers de baixa intensidade de AsGaAl da marca ODONTOFLEX KC 610 –15mW, KC 611- 30 e 50mW de potência com densidades energéticas variando em 3J, 6J e 9J cm² (joules por cm²).

Os tempos de aplicação variam para cada laser, sendo regulados automaticamente por cada aparelho dependendo da variação de densidade de energia a ser aplicada em relação a potencia do aparelho laser. Resultados obtidos pelos setups para bactéria *Streptococcus mutans* em 15mW de potência e 3J/cm² de densidade de energia indicam 88,7% de efetividade de morte bacteriana; 6J/cm² 99,2%; 9J/cm² 99,7%; resultados em 30mW: 3J/cm² 93,5%; 6J/cm² 98,2%; 9J/cm² 90,5%; resultados 50mW: 3J/cm² 89%; 6J/cm² 98%; 9J/cm² 99,5%. Resultados para cepas de *Lactobacillus acidophilus* (*sp*) 15mW: 3J/cm² 87,5%; 6J/cm² 75%; 9J/cm² 99,3%; resultados em 30mW: 3J/cm² 100%; 6J/cm² 99,8%; 9J/cm² 100%; resultados 50mW: 3J/cm² 100%; 6J/cm² 99,8%; 9J/cm²100%. Resultados para cepas de *Streptococcus mitis* 15mW: 3J/cm² 76,3%; 6J/cm² 60,3%; 9J/cm² 60,3%; resultados em 30mW: 3J/cm² 83,3%; 6J/cm² 84,9%; 9J/cm² 77,6%; resultados 50mW: 3J/cm² 73,6%; 6J/cm² 79,5%; 9J/cm²71,5%. Resultados para cepas de *Streptococcus sanguis* 15mW: 3J/cm² 74,2%; 6J/cm² 92,6%; 9J/cm² 67,3%; resultados em 30mW: 3J/cm² 98,9%; 6J/cm² 92,6%; 9J/cm² 94,3%; resultados 50mW: 3J/cm² 88,3%; 6J/cm² 53,3%; 9J/cm²78,3%. Conclusão: De acordo com os dados obtidos nesta pesquisa podemos afirmar que a terapia fotodinâmica do laser de baixa intensidade possui um efeito bactericida.

Palavras chave: Laser, Bactericida, Densidade energética, Cáries de sulcos e fissuras

Abstract

The present study aims at evaluating the bactericide activity “*in vitro*” of the photodynamic therapy with low level of diode AsGaAl upon the main bacteria which constitute the microflora of dental caries in human beings, as well as verifying the best energetic densities and potencies to this bactericide activity of laser appliances. From the analysis, types of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* and *Lactobacillus sp.* were isolated and identified by microbiological methods and biochemical tests. These were then acquired in ATCC of the bacteria identified above where the inocula were standardised in order to obtain a probable and countable number of the cited bacteria. In this phase of the research, the dilution and use of a dying substance was associated: the orto toluidine blue. This is because it has the property of increasing the capacity of absorbing the laser light upon these bacteria. The types of bacteria were submitted to bactericide evaluation “*in vitro*” using three different appliances of AsGaAl low level laser by ODONTOFLEX KC 610 –15mW, 670nm, KC 611- 30 and 50mW of potency with energetic density varying in 3J ,6J,9J cm² (joules per cm²). The time of application varied for each laser, in 15mW 3J, in 147s; 6J, in 228s; 9J in 277s., to 30mW 3J in 114s; 6J 228s, 9J 343s, to 50mW 3J in 62s, 6J 123s, 9J 185s. Results for the set-ups to bacterium *Streptococcus mutans* in 15mW of potency and 3Jcm² f energy density indicate 88,7% of effectiveness of bacteria death and the other set-ups as follows: 6Jcm² 99,2%; 9Jcm² 99,7%; results in 30mW 3Jcm² 93,5%; 6Jcm² 98,2%; 9Jcm² 90,5%; results 50mW 3Jcm² 89%; 6Jcm² 98%; 9Jcm² 99,5%. Results for types of *lactobacillus sp* 15mW 3Jcm² 87,5%; 6Jcm² 75%; 9Jcm² 99,3%; results in 30mW 3Jcm² 100%; 6Jcm² 99,8%; 9Jcm² 100%; results 50mW 3Jcm² 100%; 6Jcm² 99,8%; 9Jcm²100%. Results for types of *Streptococcus mitis* 15mW 3Jcm² 76,3%; 6Jcm² 60,3%; 9Jcm² 60,3%; results in 30mW 3Jcm² 83,3%; 6Jcm² 84,9%; 9Jcm² 77,6%; results 50mW 3Jcm² 73,6%; 6Jcm² 79,5%; 9Jcm²71,5%. Results for types of *Streptococcus sanguis* 15mW 3Jcm² 74,2%; 6Jcm² 92,6%; 9Jcm² 67,3%; results in 30mW 3Jcm² 98,9%; 6Jcm² 92,6%; 9Jcm² 94,3%; results 50mW 3Jcm² 88,3%; 6Jcm² 53,3%; 9Jcm²78,3%. Conclusion: According to the data obtained in this research, it can be assured that the photodynamic therapy of low level laser has bactericide effect.

Key-words: Laser, bactericide, energetic density, slot and fissure caries
Knowledge area: Bioengineering.

SUMÁRIO

	Página
Introdução	1
Revisão da Literatura	5
Objetivo	11
Material e Métodos	12
Resultados	19
Discussão	35
Conclusões	40
Referências Bibliográficas	41
Anexo 1	46

INTRODUÇÃO

Um grande número de evidências tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” confirmam que as cáries só ocorrem se houver microrganismos. Em primeiro lugar; animais *germ-free* somente desenvolvem cáries na presença de bactérias; segundo, as bactérias orais podem causar desmineralização do esmalte “*in vivo*”, e em terceiro, estudos histológicos demonstraram bactérias no interior do esmalte e dentina nas lesões cariosas. Entretanto, não está completamente esclarecido quais são as espécies bacterianas envolvidas como agentes etiológicos primários nos vários tipos de cáries dentais (NEWBRUN, 1988).

Para WOLINSKY (1984) a cárie dental é uma decomposição lenta do dente, resultante da perda de cristais de hidroxiapatita. Essa dissolução da matriz mineralizada reduz a integridade estrutural do dente. A natureza bacteriana deste processo pode resultar numa infecção crônica do dente, com eventual perda deste e do suporte ósseo alveolar. Os conhecimentos atuais suportam a teoria “*placa-hospedeiro-substrato*”, em que a cárie apresenta uma etiologia bacteriana interdependente de (1) sistemas de defesa do hospedeiro, (2) fatores da dieta e (3) tempo. A cárie somente irá ocorrer com a atuação de todos esses fatores em conjunto.

As cáries de sulcos e fissuras são os tipos mais comuns de lesões nos humanos. Entretanto, sua microbiologia permanece pouco esclarecida. Além disso, ainda não existe um bom modelo de estudo disponível para essas lesões. Espera-se encontrar uma grande diversidade de tipos bacterianos devido à existência de um ambiente bem variado. Entretanto, a microbiologia tem permanecido apenas alusiva, em decorrências das dificuldades em se obter uma amostragem acurada dessa área. “Fissuras artificiais” têm sido criadas com tiras de *mylar* dobradas inseridas na cavidade oral e com sua posterior remoção para coleta da amostragem bacteriana. Formas cocóides constituem de 75 a 95% dos microrganismos, sendo o *Streptococcus sanguis* a bactéria predominante. Com o envelhecimento da placa, o número relativo de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* aumenta. A validade deste tipo de modelo para a formação de placas de sulcos e fissuras é questionável, pois essa superfície de *mylar* possui características muito diferentes daquelas apresentadas pelo esmalte. Das diversas espécies bacterianas isoladas dessas lesões, os maiores suspeitos de serem os agentes etiológicos são *Streptococcus mutans* e os *lactobacillus* (WOLINSKY, 1984).

Nem todos os microrganismos estão qualificados como capazes de induzir lesões cariosas; isto inclui o *Streptococcus mutans* (diversas linhagens), uma linhagem de *S. Salivarius* uma linhagem de *Streptococcus mileri*, *Streptococcus sanguis*, *Peptostreptococcus intermedius*, uma linhagem de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus Casei*, *Actinomyces viscosus*, entretanto nem todos estes microrganismos são igualmente virulentos (NEWBRUN, 1988). As análises de NEWBRUN (1988) demonstram que a cárie não ocorre na ausência de microrganismos; que a maior parte dos microrganismos não é cariogênica e que a cárie pode ocorrer em ratos que possuem somente um único tipo de microrganismo.

Sabe-se exatamente o que determina a cariogenicidade de um microrganismo. O gênero *Streptococcus*, com potencial cariogênico, é de um certo modo um grupo heterogêneo de microrganismos.

Segundo o próprio NEWBRUN (1988), cárie de sulco e fissura é o tipo mais comum encontrado no homem e é promovido pelo tipo de retenção mecânica para bactérias existentes neste sítio.

A grande variação da microflora em tais sítios mostra que cada fissura é um sistema ecológico separado, onde geralmente predominam cocos Gram-positivos (70% a 90% da flora), especialmente *S. Sanguis*, enquanto fusiformes, espirilares e espiroquetas estão ausentes, *S.mutans* tem sido freqüentemente isolados em grandes números de placas de superfícies lisas e lesões de fissura.

Trabalhos têm sido desenvolvidos na intenção de promover o controle na prevenção e cura da cárie. Assim pesquisadores vêm se dedicando à procura de novas terapias que possam diminuir o risco de cárie, já que esta tem uma característica endêmica.

Vem se destacando no meio científico uma terapia chamada de terapia fotodinâmica , que é uma terapia experimental para tratamento de lesões pré-malignas e malignas similar a quimioterapia convencional, porém tendo a capacidade de ser seletiva a tecidos neoplásicos com mínima ação sistêmica. Esta técnica consiste na administração de um corante fotossensibilizador no organismo por três vias: intravenosa , ingestão oral e tópica seguindo de irradiações em determinado e adequado comprimento de onda. Através de luz não térmica será irradiada para regiões ativando o fotossensibilizador gerando produtos tóxicos que modificam o ambiente local da célula podendo levá-las a diminuição de seu crescimento ou a morte.(WIEMAN 1992)

O mecanismo de ação da terapia fotodinâmica envolve reações fotoquímicas iniciadas pela absorção de fótons por fotossensibilizadores. Após a absorção da luz em presença de oxigênio existente no meio, vários processos fotoquímicos envolvendo espécies reativas excitadas que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (O_2 , $OH\cdot$, H_2O_2) que atingem centros específicos dentro dos sistemas celulares (membrana celular, mitocôndrias e estruturas nucleares) desencadeando a morte das células por apoptose celular.(WIEMAN 1992).

O termo fotossensibilização letal por laser (FLL) se refere ao processo de emissão de radiação por um dispositivo de laser de baixa potência que ativa o agente sensibilizante (cromóforo) que por sua vez causa um efeito letal em células específicas, no caso bactérias.(STRINGER *et al.* 1998)

Em sua pesquisa KOMATSU (1991) mostra a utilização e comparação do emprego da terapia fotodinâmica com o uso de um laser de baixa intensidade associado ao alumínio clorotetrasulfonato phtalocyanina, comparado ao uso de hematoporfirina derivada, onde células KK47 foram expostas a esta terapia, Os resultados traduzem que fotossensibilizadores são transmissores na terapia fotodinâmica, com vantagens na redução da toxicidade das células.

Em um trabalho muito amplo SIBATA *et al.* (2000) descreveram os tratamentos nas mais diversas áreas médicas utilizando a terapia fotodinâmica como emissores de luz lasers de baixa intensidade(entre 600 e 800 nm) e um grande número de fotossensibilizadores e suas diversas densidades de energia, destacando-se assim o tratamento de câncer de boca com laser de baixa intensidade (652 nm) associado ao fotossensibilizador FOSCAN. (porfirina derivada).

Algumas aplicações na odontologia, têm sido investigadas por DOBSON e WILSON (1992), que descobriram que o laser vermelho de HeNe λ de 623nm e 7.3mW associados ao azul de toluidina ou azul de metileno tiveram efeito bactericida sobre *Streptococcus sanquis*, *Porphyromonas gengivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em placas de agar. Em outros estudos com azul de toluidina com laser de λ de 623nm alcançaram uma fotossensibilização letal por laser em bactérias cariogênicas: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*.

DOBSON e WILSON (1992) tinham o objetivo de determinar uma fotossensibilização letal por laser de baixa intensidade (670nm) associado ao corante azul de toluidina, pretendendo alcançar a eliminação de uma determinada quantidade de *S.mutans* absorvidos em slices de dentina e esterilizar cavidades de cárie, os resultados foram de grande significância.

Propomos a realização de uma pesquisa que pudéssemos contemplar a ação bactericida da terapia fotodinâmica, para que no futuro próximo poder aplicá-la em um módulo clínico preventivo.

REVISÃO DE LITERATURA

Embora existam varias pesquisas no elo formado pelo laser e pela odontologia, ainda não é clara a ação do laser de baixa potência sobre microorganismos existentes na cavidade bucal, visto que alguns autores relatam que ainda não está completamente esclarecido quais são as espécies bacterianas envolvidas como agentes etiológicos primários dos vários tipos de caries dentais.

DAVEY E ROGERS (1984) monitoraram por seis meses membros de 10 famílias com a finalidade de identificar o potencial de infecções de cáries. Após este período concluíram que 93% das bactérias encontradas eram linhagens *Streptococcus mutans* e suas diversas linhagens.

Para NEWBRUN (1988), cárie de sulco e fissura são os tipos mais comuns encontrados no homem, promovido pelo tipo de retenção mecânica para bactérias existentes neste sítio.

Em pesquisa VAN HOUTE (1994) analisou os microrganismos da etiologia da cárie e notou a exuberante existência de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* e notou que associado a este microrganismos, está uma dieta rica em carboidratos que favorece a formação de placa bacteriana.

MASH *et al.* (1995), investigaram a placa dental em se tratando de um biofilme e descreveram que a placa dental é uma matriz de polímeros de bactérias e saliva originalmente, e que a superfície dental gera condições para que este biofilme seja aderido rapidamente ao dente. O autor enfatiza que a melhor estratégia no controle da placa dental é interferir na sua formação.

Em amplo estudo onde foram monitoradas trinta (30) crianças de até 5 anos de idade STREATEMANS (1998) verificou a colonização de microrganismos em cárie, notando a significativa presença de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*.

MASH (1999) afirmou que a placa dental é um biofilme com grande diversidade de microrganismos na sua composição e completa que o potencial cariogênico está ligado a uma dieta freqüente constituída de açúcares ligada à viscosidade da saliva condicionando o potencial cariogênico das bactérias. Confirma o autor que deve-se alterar as dietas constituídas de carboidratos e açúcares, ou interferir no metabolismo bacteriano através de fluoretos ou outros métodos antibacterianos.

Com a erupção dos dentes, novos habitats são introduzidos, como fóssulas, fissuras e sulco gengival e os primeiros microorganismos a fixem-se são *Streptococcus sanguis* e a seguir *Streptococcus mutans*. Obviamente as superfícies sujeitas a auto limpeza por movimentos de lábios, bochechas e língua oferecem menores condições de fixação de bactérias. Por essa mesma razão, os espaços interproximais assim como as fóssulas e fissuras são pontos críticos de colonização bacteriana e formação de placa (FERREIRA, 2000).

No que se diz respeito a lasers, em 1961, no Hospital Presbiteriano de Nova York, praticou-se com êxito a primeira intervenção cirúrgica com o laser, sendo retirada de um pequeno tumor de retina que impedia a visão. A partir dessa data, foram incrementadas as experiências cirúrgicas e em todas elas começou-se a observar, ainda de maneira empírica que a cicatrização e a epitelização estavam aumentadas. Os efeitos biológicos produzidos incrementam as investigações a respeito das propriedades bio-estimulativas da estimulação da radiação a laser. (GENOVESE, 2000).

JAVAN *et al.* (1961) apud. (GENOVESE, 2000) desenvolveram o laser de (He-Ne) e JOHSON o de Nd:Yag. Em 1962 foi criado o primeiro laser semiconductor, enquanto PATEL *et al.* (1961) apud. (GENOVESE, 2000) apresentaram o laser de dióxido de carbono, que emitia radiação na faixa infravermelha do espectro e o laser de argônio com seu duplo espectro de emissão.

No campo da odontologia, alguns trabalhos merecem destaque, pois demonstram o interesse, desta especialidade medica em relação a utilização de laser como terapêutica efetiva.

Pesquisas realizadas com lasers de baixa intensidade revelam o aumento na vitalidade funcional das mitocôndrias, capacidade maior de regeneração e cicatrização dos tecidos e ação não degenerativa provocadas pela luz de He-Ne nos tecidos irradiados (GENOVESE, 2000).

Através de trabalhos sobre a ação da luz laser na bioestimulação de tecidos, BENEDICENTI (1983) verificou que um aumento de ATP mitocondrial determinado por este tipo de energia radiante não tem capacidade de produzir células neoplásicas, acarretando, porém, um efeito analgésico. Esse efeito é resultado do aumento de beta-endorfina no liquido cefalorraquidiano.

TAKEDA (1988) apud. (GENOVESE, 2000) verificou a ação da aplicação do laser de baixa intensidade em alvéolos de ratos após extração dentária, observando seu efeito sobre o

processo de reparação alveolar. Sugeriu a formação de tecido osteóide trabecular com uma ossificação mais rápida .

Segundo NICOLO FILHO (1991) apud (GENOVESE 2000) a neoformação óssea com remodelação mais precoce das cristas alveolares, após o tratamento com laser He-Ne em ratos com feridas ocasionais por extrações dentárias.

DUARTE *et al.* (1993) apud (GENOVESE 2000) apontam a ação terapêutica favorável do soft laser no pós - operatório, reduzindo a reação inflamatória com efeitos analgésicos adicionais.

Após uma completa revisão literária efetuada até esta data sobre o soft laser, segundo FERREIRA (1996) apud (GENOVESE 2000) concluiu que os métodos tradicionalmente usados para combater a inflamação, ainda são indicados devido à pequena quantidade de trabalhos comprobatórios da eficácia da terapêutica laser nas várias afecções bucais; porém pode ser útil como método coadjuvante no controle e combate as inflamações.

BRUGNERA *et al.* (1998), empregaram o laser para a bioestimulação óssea, acelera o tempo de cicatrização, melhorando a sua qualidade . Além disso recomendaram dosimetria de 2,5 a 4 J/ cm² sobre a região, em sessões intercaladas de 48 horas durante duas semanas.

Dentre as habilidades do laser de baixa potência, estudos indicam a ação bactericida em bactérias cariogênicas irradiados com laser He-Ne, desde que associados a corantes específicos.

É sugerido que lasers associados a corantes também chamados de fotossensibilizadores desencadeiem uma terapia conhecida como terapia fotodinâmica, e satisfatória para aplicações clínicas em odontologia preventiva.

A terapia fotodinâmica é uma terapia experimental para tratamento de lesões pré-malignas e malignas similar à quimioterapia convencional , mas tendo a capacidade de ser seletiva a tecidos neoplásicos com mínima ação sistêmica. Esta técnica consiste na administração de um corante fotossensibilizador no organismo por três vias: intravenosa , ingestão oral e tópica seguida de irradiação em determinado e adequado comprimento de onda. Através de luz não térmica será irradiada para regiões ativando o fotossensibilizador gerando produtos tóxicos que modificam o ambiente local da célula, podendo levá-las à diminuição de seu crescimento ou a morte (WIEMAN, 1992).

Com relação aos corantes utilizados, segundo DOUGHERTY *et al.* (1990) apud (STRIGER *et al.*, 1998) empregaram em suas investigações uma luz policromática em combinação com

fotossensibilizadores como as hematoporfirinas, desenvolvidas para uso em terapia fotodinâmica para tumores. Entretanto, segundo HOWEVER *et al.* (1966) apud (STRIGER *et al.*, 1998) corantes como azul de toluidina podem causar efeito deletério em bactérias sob a ação da luz laser.

Segundo KLEIN *et al.* (1965) apud (OKAMOTO 1990), a morte de microorganismos ou a inibição parcial do crescimento como resultado de 60-250 J de irradiação de laser de rubi.

MACGULFF e BELL (1966) apud (OKAMOTO 1990) estudaram o efeito da irradiação laser de He-Ne (onda contínua) (CW) (0.5 m W) em *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgares*, *Staphylococcus aureus*, e *Bacillus subtilis*, mas não obtiveram efeito bactericida.

MACMILLAN *et al.* (1966) apud (OKAMOTO 1990) afirmaram que foram eliminados microorganismos de sete espécies com laser de gás He-Ne com um comprimento de onda de 632,8 nm, 21-30 mW CW, quando eles foram irradiados em toluidina, solução azul.

VENEZIO *et al.* (1985), investigando a ação da substância derivada da hematoporfirina utilizada na terapia fotodinâmica em tumores, associada a luz laser com comprimento de onda específico, observaram um efeito bactericida de 99,9% em relação ao *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus intermedius* M-G, *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptococcus magnus* e *Clostridium perfringes*.

Os estudos de SCHULTZ *et al.* (1986) mostram que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Escherichia coli* foram eliminados através da irradiação de laser cirúrgico quando a densidade de energia era maior que 1,667 J/cm². A sensibilidade de *P.aeruginosa* à luz de laser foi aumentada na presença de uma tintura colorida escura.

DOBSON e WILSON (1992) sensibilizando biofilmes de *Streptococcus sanguis*, *Phorphiromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, preparados em superfícies de agar, para sensibilizar estas bactérias utilizou-se de um laser de HeNe em 7.3mW com diâmetro de 1.3mm e 632.8 nm por 30 segundos, associados a corantes como azul de toluidina, azul de metileno, Phitalocyanine, hematoporfirina HCL e hematoporfirina éster, os autores descrevem bons resultados para eliminação através da sensibilização destas cepas.

O propósito de OKAMOTO *et al.*(1990, 1992) era investigar o efeito bactericida do laser de He-Ne em microorganismos cariogênicos e desvendar o mecanismo da ação do laser

sobre bactérias. O efeito bactericida era determinado pela formação de uma inibição do crescimento de colônias bacterianas viáveis. *Streptococcus sobrinus* AHT que é um micorganismo Gram positivo sensível ao laser He-Ne, e *Echerichia coli*, um micorganismo Gram negativo, foram resistentes. O efeito bactericida de várias tinturas foram instigadas e observada a inibição no crescimento frente a 10 tipos de tinturas, azuis, roxas, ou verdes que eram principalmente à base de fenil-metano foi observado. O vazamento de potássio na irradiação de *S sobrinus* AHT foi determinado usando um espectrofotômetro de absorção atômica. O vazamento começou a aumentar na radiação para 2 min, e alcançou um platô no intervalo de até 30-60 min do tratamento.

IWASE *et al.* (1989) verificando o acúmulo de placa dentária em hamsters foi prevenido por irradiação de laser He-Ne.

O propósito de investigação de BURNS *et al.* (1992) era determinar se os organismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus frementum* poderiam ser aniquilados por um laser de baixa potência após sensibilização pelos corantes apropriados. Estes seriam o azul de toluidina e Fitalocianina disulfonato alumínio. Usando um laser HeNe de 8mW e um laser de diodo de Arsenieto de Gálio. Com concentrações idênticas dos corantes 0,005% em 60 segundos de exposição laser, os autores concluíram os dois lasers conjugados com apropriados corantes são efetivos na eliminação de bactérias cariogênicas.

Nas pesquisas desenvolvida por SARKAR e WILSON (1993) onde utilizaram de um laser de HeNe em 7,3mW por 30 segundos na presença de 50µg de azul de toluidina como fotossensibilizador, ficou demonstrada a eliminação de 91,1% das bactérias aeróbias e 96,6% das bactérias anaeróbias.

BURNS e WILSON (1994) utilizaram suspensões de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinobacillus viscosus*, sendo estas expostas a luz laser de AsGa Al em presença de alumínio disulfonato fitalicianina. Cada uma das quatro micorganismos, receberam exposições de 30 a 90 segundos e os resultados demonstram que a fotossensibilização letal é uma técnica eficaz na eliminação de bactérias de lesões de cárie.

Em estudo para avaliar o potencial uso do efeito bactericida da luz laser para tratamento de placas dentais, WILSON (1994), descreveu a necessidade da eliminação de micorganismos presentes em placas dentais e lesões periodontais, e neste estudo confirma como efetivo o

uso da terapia fotodinâmica para bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas demonstradas através do uso de lasers de baixa potência de HeNe e AsGaAl, conjugados respectivamente com corante de azul de toluidina e fitalocianina como fotossensibilizadores e que se pode atingir bons resultados em irradiações com tempos próximos a sessenta segundos (60s).

BURNS et al (1995) partiram de uma suspensão de bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans*) tratadas com azul de toluidina e alumínio disulfonato fitalicianina e expostas a luz laser de HeNe e As GaAl respectivamente. Para o laser de HeNe utilizaram se irradiações de 875 , 1.782 e 3.504 segundos, para o laser AsGaAl os tempos de irradiação foram 1.188, 2.376 e 4.752 segundos. Os resultados mostram que o fotossensibilização letal é efetiva para bactérias cariogênicas.

Nesta pesquisa WILSON *et al.* (1995) utilizaram de lasers de baixa potência em presença de fotossensibilizadores para tratar placas subgengivais de dez (10) voluntários da seguinte forma: azul de toluidina e alumínio disulfonato fitalicianina e lasers de de HeNe e AsGaAl respectivamente, Sendo assim bactérias das espécies *Streptococcus* e *Actinomyces* foram irradiadas e como resultados afirmam que ambos os setups tiveram ótimos resultados na fotossensibilização, porém com uma performace melhor nos resultados do setup HeNe/azul de toluidina.

Quando SOUKOS *et al.* (1996) utilizaram-se de laser de He-Ne de 7.3 mW associado ao corante de azul de toluidina 2,5 µg/ml, observaram o efeito da fotossensibilização letal sobre o *Streptococcus sanguis*.

BATTHI (1998) tentou determinar a distribuição do fotossensibilizador azul de toluidina em células de *Porphiromonas gingivalis* e o envolvimento deste corante na fotossensibilização letal do organismo celular. Concluiu que realmente o corante consegue se ligar a elementos celulares porém não foi possível confirmar sua concentração.

Em um trabalho muito amplo SIBATA *et al.* (2000) descreveram tratamento nas mais diversas áreas médicas utilizando a terapia fotodinâmica tendo como emissores de luz lasers de baixa intensidade entre 600 e 800 nm e um grande número de fotossensibilizadores e suas diversas densidades de energia destacando-se assim o tratamento de câncer de boca com laser de baixa intensidade 652 nm associado ao fotossensibilizador FOSCAN. (porfirina derivada).

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo:

Avaliar “*in vitro*” a atividade bactericida da terapia fotodinâmica através de lasers de baixa intensidade de diodo AsGaAl sobre as principais bactérias que constituem a microflora da cárie dental humana, verificar as melhores densidades energéticas do raio laser e as potências dos aparelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1) Equipamentos.

Estufa bacteriológica, QUIMIS MOD 316.12 .

Contador de colônias, PHOENIX MOD CP 608.

Microscópio binocular, NIKON MOD YS2

Autoclave, FANEM MOD 415.

Geladeira, ELETROLUX MOD R 280.

Sistema de filtro milipore (descartável)

Laser de AsGaAl de 15Mw 670 nm KROMAN MOD 610

Laser de AsGaAl de 30mW 670nm KROMAN MOD 611

Laser de AsGaAl de 50mW 670nm KROMAN MOD 611

Suporte para laser desenvolvido pelo autor.

Jarras para anaerobiose.

1.2) Vidrarias.

100 placas de Petri (150 mm de diâmetro).

200 tubos de ensaio (12 x 160 mm) com tampa rosqueável.

1 caixa de lâminas .

30 pipetas de 1 ml.

10 pipetas de 10 ml.

20 alças de DRIGALSKY.

1.3) Meios de cultura.

500g de caldo tioglicolato.OXOID

500g de agar mitis salivaris.DIFCO

500g de agar suco de tomate.(tomato juice agar, seg Rugosa) DIFCO

500g de base de agar sangue (blood base agar).DIFCO

500g de agar tríplice Açúcar –Ferro.(triple Sugar-Iron) DIFCO

500g de cistine triptose Agar (cystine triptose Agar) DIFCO

500g de caldo tripticaseína de soja (triptic soy broth) DIFCO

1.4) Reagentes.

Telúrito de potássio.ALLIED SIGNAL

H₂O₂ (10 volumes). DINÂMICA

Reativo de kovacs.

1 rolo de papel kraft.

1.5) Açúcares

Manitol. SYNTH

Sorbitol. SYNTH

Rafinose. SYNTH

Arabinose. SYNTH

Xilose. SYNTH

1.6) Outros

Cloreto de sódio (PA). LAFAN

Fita crepe indicadora de EST.

Hemácias de carneiro. EBE FARMA

Orto toluidina. SYNTH

Corantes para Gram. SYNTH

Estantes para tubos de ensaio.

2. MÉTODOS

2.1) CULTURAS BACTERIANAS

Foram utilizadas amostras de culturas bacterianas adquiridas da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação de Pesquisa e Tecnologia André Tosello,–Campinas SP e do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo- SP, descritas na literatura como causadoras de cáries de sulcos e fissuras em dentes humanos.

CCT N.	Microorganismo	Referência
3258	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4365
3440	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175
1497	<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 9811
IAL	<i>Strptococcus snguis</i>	ATCC 10557

2.2) PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS DE BACTÉRIAS.

Partindo-se de uma cultura de bactéria com crescimento de 24hem meio de cultura apropriado, fez-se uma diluição em solução fisiológica estéril visando obter uma turvação equivalente ao tubo 1 da escala de Mac Farland (10^8 UFC/ml) de meio. Em seguida fez-se diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) utilizando-se soro fisiológico estéril com 50µl do corante azul de **ORTO TOLUIDINA** (75µg/ml), para potencializar a luz laser. Utilizou-se dos protocolos de (DOBSON e WILSON, 1992; OKAMOTO *et al.*, 1992; BURNS *et al.*, 1994) modificado por nós.

Após obter as diluições, alíquotas de 10 µl foram distribuídas na superfície de agar sangue, espalhando-se de maneira homogênea com uma alça de Drigalsky. Apos incubação de 37°C em anaerobiose, durante 48h fez-se a contagem de colônias, expressando-se o resultado em Unidades Formadoras de Colônias por 10 µl (UFC/10 µl); e a diluição de escolha foi a de 10^{-2} por apresentar um numero em torno de 600 UFC/10 µl; permitindo a contagem de colônias com maior segurança. Os teste foram realizados em triplicata.

2.3) AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIANA “IN VITRO”.

Após obter as suspensões de bactéria em soro fisiológico estéril contendo o corante **ORTO TOLUIDINA** na concentração citada no item 2.2. , alíquotas de 10 µl foram transferidas para o centro da placa de Petri contendo agar sangue, agar mitis salivarius ou agar suco de tomate. Em seguida, fez-se a irradiação com raio laser de baixa intensidade **AsGaAl 670nm, 15mW** de potência variando as densidades de energia em **3J, 6J e 9J/cm²**.

Apos a irradiação e utilizando-se uma alça de Drigalsky, a gota de suspensão bacteriana foi espalhada de maneira homogênea na superfície do meio de cultura. Para cada amostra de bactéria analisada fez-se o experimento em triplicata, sempre acompanhado de um controle (amostra não irradiada) também em triplicata. As placas foram incubadas durante 48h em anaerobiose a 37°C, Em seguida fez-se a contagem do número de colônias (**UFC/ 10 µl**) das placas irradiadas com laser e das não irradiadas (controle).O mesmo procedimento foi realizado com laser de **AsGaAl 670nm, 30mW e 50mW** de potência com densidades de energia de **3J, 6J e 9J /cm²**.

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas pelo método “T” Student.



Figura 1. Encubação de 37°C em anaerobiose, durante 48h



Figura 2. Testes bioquímicos

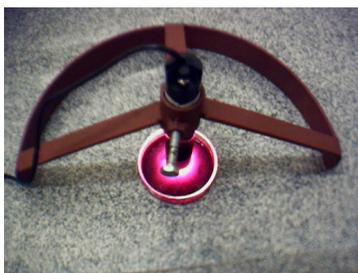
Seqüência de eventos segundo a metodologia (Figura 3 de a) a m)



a) Escala Mac Farland.



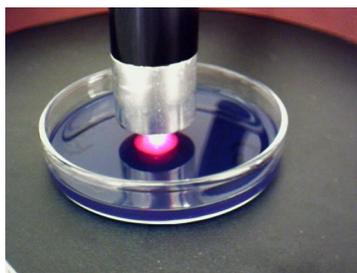
b) e c) Gotejamento da diluição na placa de Petri



d) Dispositivo de irradiação.



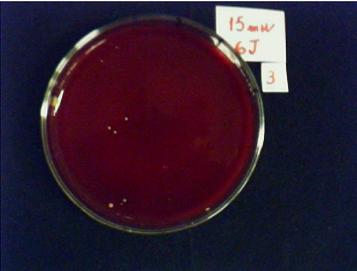
e) e f) Procedimento de irradiação das cepas



g) Espalhamento do inóculo irradiado



h) Incubação

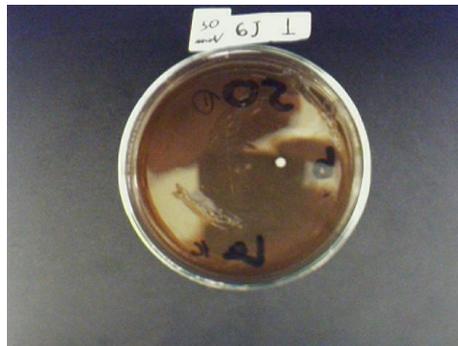


i) Análise e contagem das colônias irradiadas

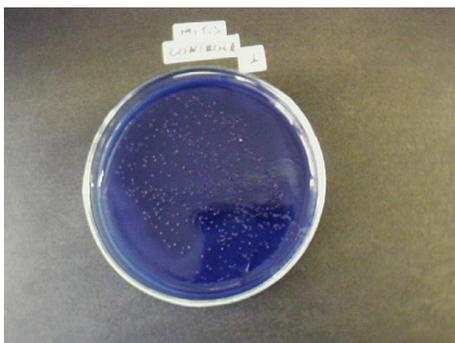


j), l) e m) Lasers de 15mW, 30mW e 50mW de potência utilizados na pesquisa

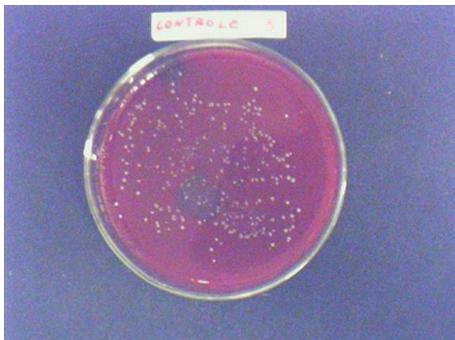
Figuras 4 de a) a h).

Grupo controle *Lactobacillus ac.*

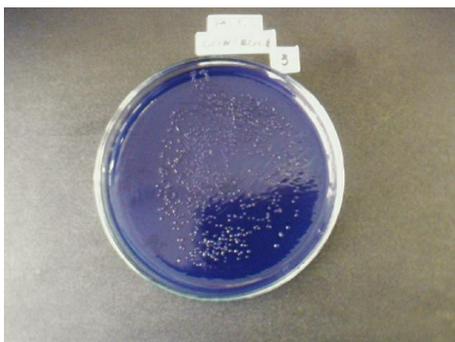
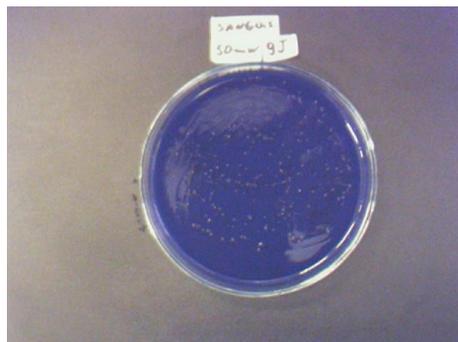
Grupo irradiado 30mW; 6J

Grupo controle *Streptococcus mitis*

Grupo irradiado 50mW; 6J

Grupo controle *Streptococcus mutans*

Grupo irradiado 15mW; 3J

Grupo controle *Streptococcus sanguis*

Grupo irradiado 50mW; 9J

RESULTADOS

Os resultados serão analisados por meio de gráficos e comentários referentes a cada gráfico para cada cepa de bactéria em sua devida potência.

1. *Lactobacillus acidophilus*

Figura 1.

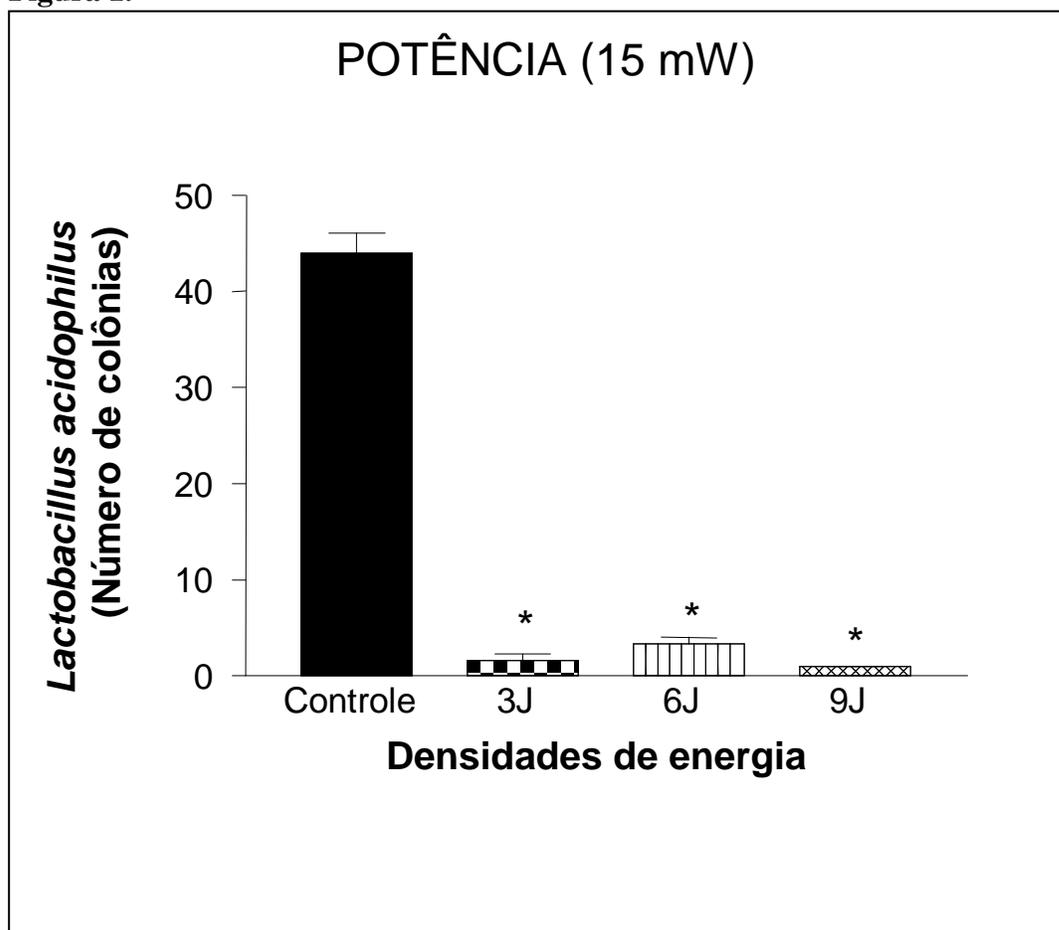


Figura 1.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de *Lactobacillus acidophilus* foram: Para 15mW 3J/cm² 87,5%; 15mW 6J/cm² 75%; 15mW 9J/cm² 99,3%.

*Significativo para $p < 0,01$.

Figura 2.

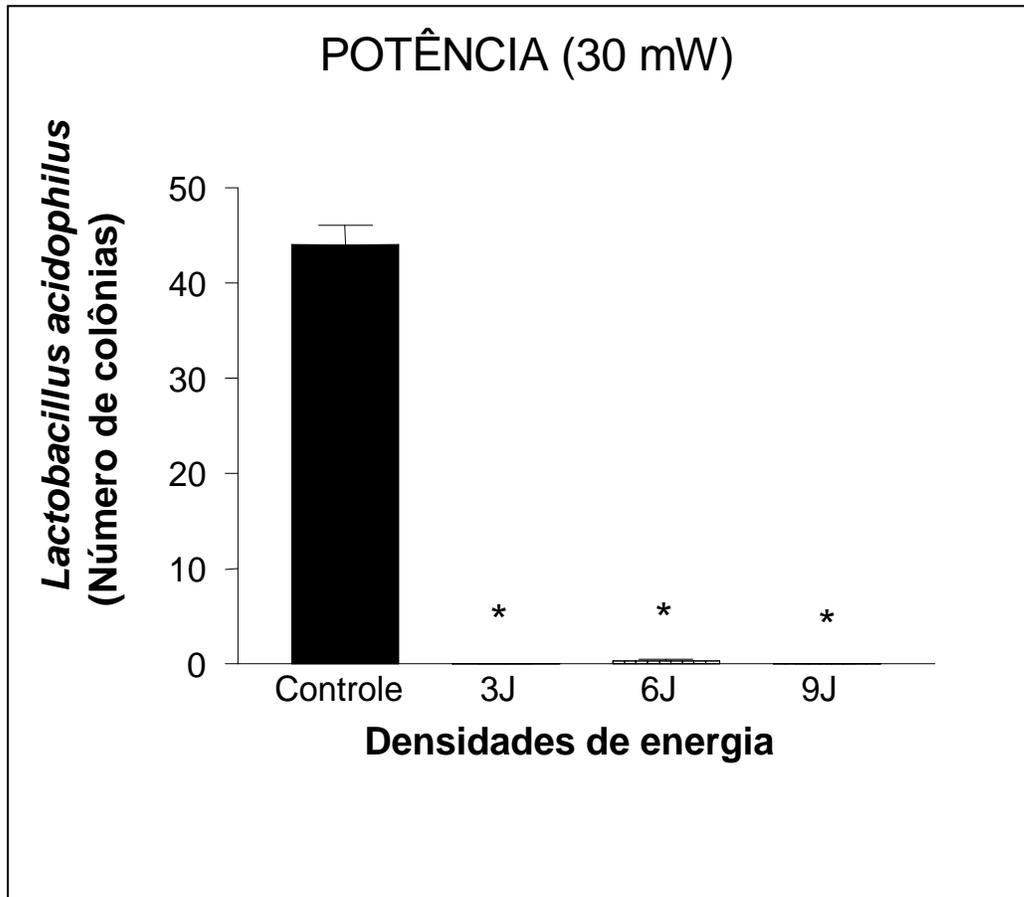


Figura 2.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de *Lactobacillus acidophilus* foram: Em 30mW 3J/cm² 100%; 30mW 6J/cm² 99,8%; 30mW 9J/cm² 100%. *

Significativo para $p < 0,01$.

Figura 3.

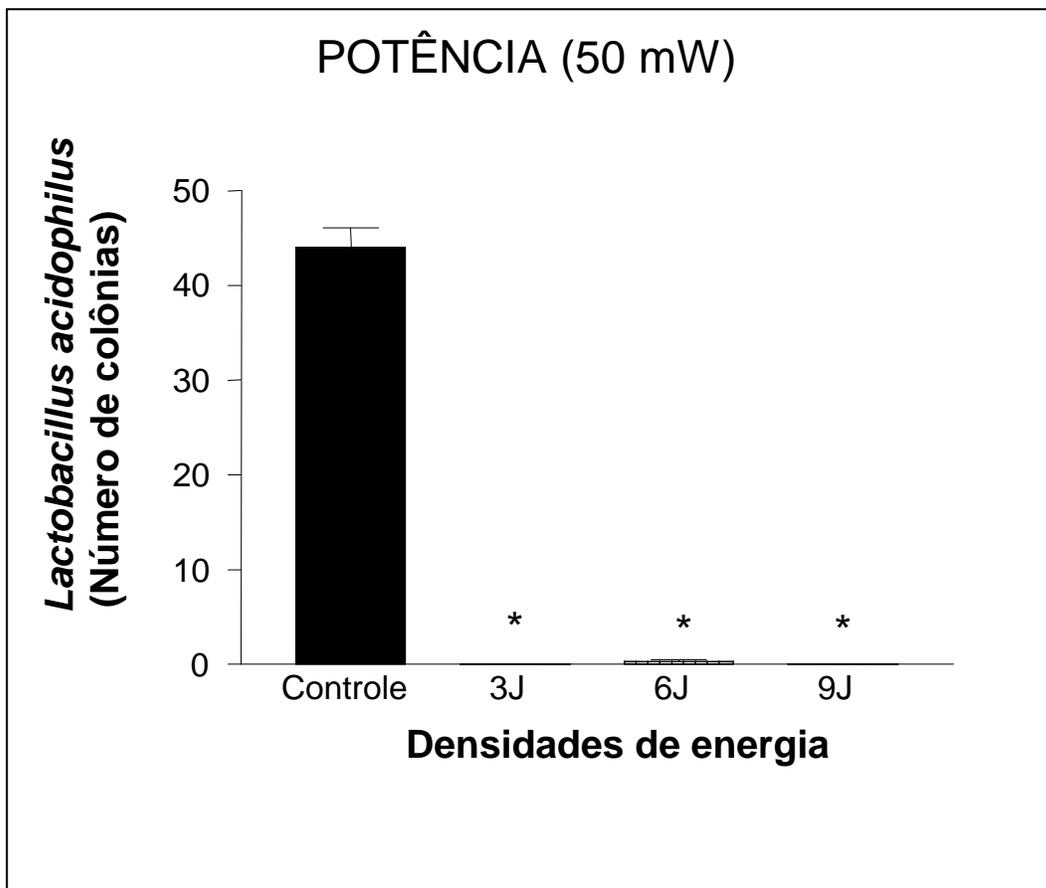


Figura 3.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de *Lactobacillus acidophilus* foram: Em 50mW 3J/cm² 100%; 50mW 6J/cm² 99,8%; 50mW 9J/cm²100% . * Significativo para p < 0,01.

Figura 4.

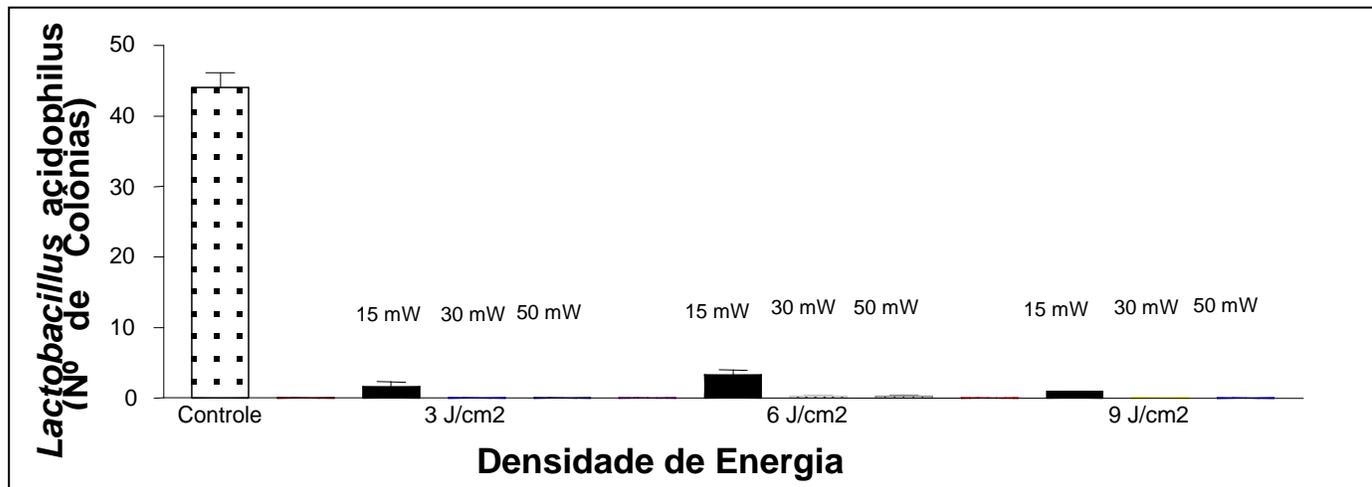


Figura 4.

Resultados comparativos entre potencias e densidades de energia

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de *lactobacillus acidophilus* 15mW 3Jcm² 87,5%; 15mW 6Jcm² 75%;15mW 9Jcm² 99,3%; resultados em 30mW 3Jcm² 100%;30mW 6Jcm² 99,8%; 30mW 9Jcm² 100%; resultados 50mW 3Jcm² 100%; 50mW 6Jcm² 99,8%; 50mW 9Jcm²100%.

Figura 5.

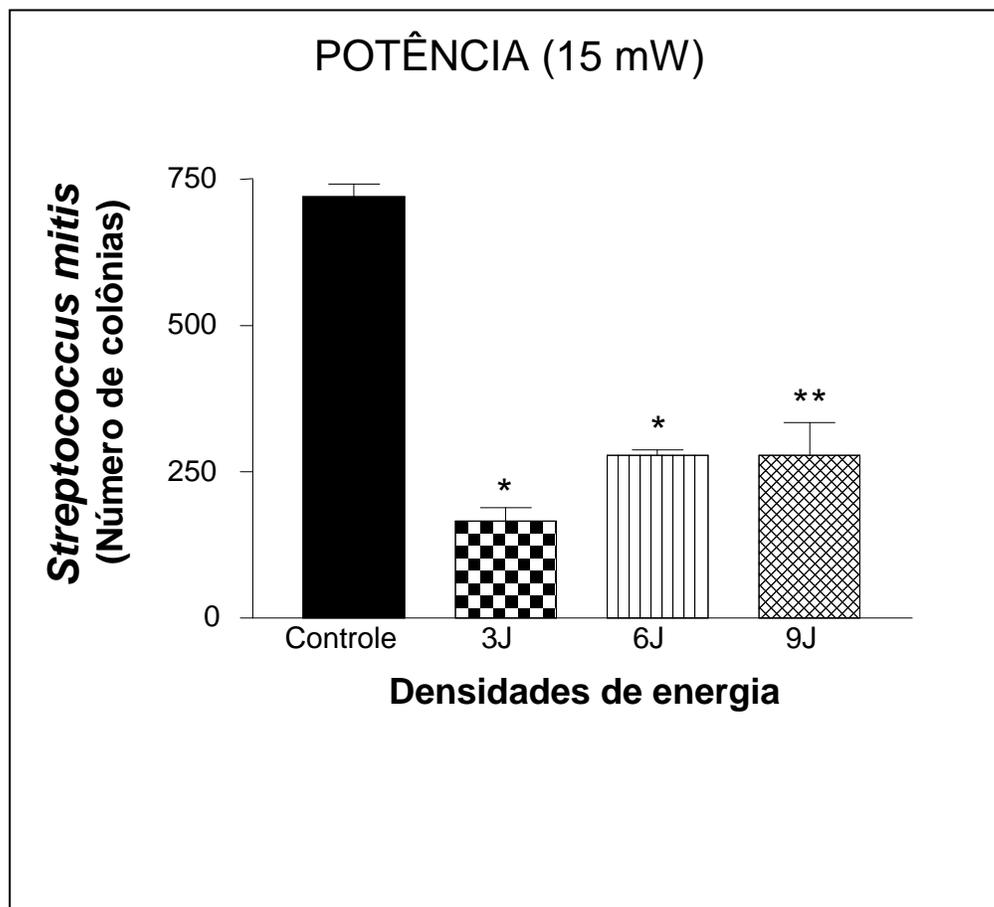


Figura 5.

Resultados obtidos na análise da terapia fotodinâmica com a cepa de *Streptococcus mitis*.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de

Streptococcus mitis foram: Em 15mW 3J/cm² 76,3%; 15mW 6J/cm² 60,3%; 15mW 9J/cm² 60,3%. * Significativo para $p < 0,01$. ** Significativo para $p < 0,05$.

Figura 6.

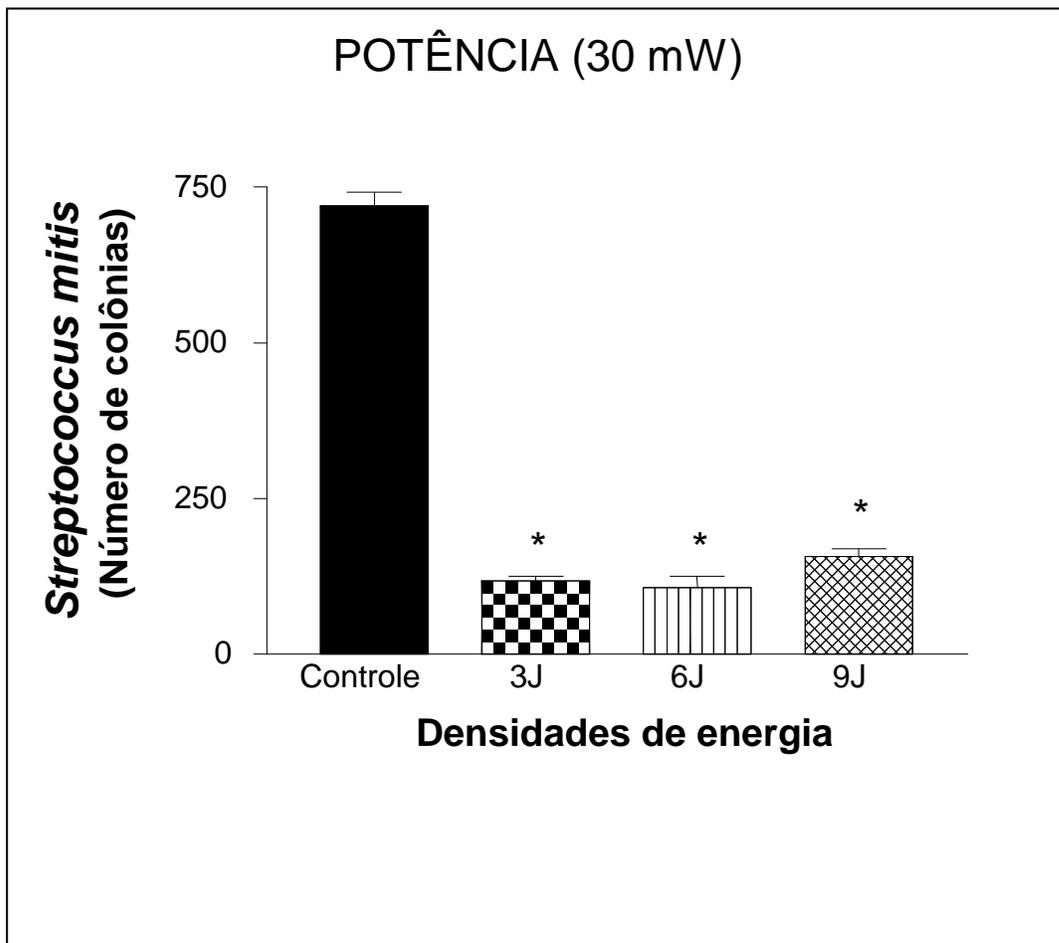


Figura 6.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de *Streptococcus mitis* foram: Para resultados em 30mW 3J/cm² 83,3%; 30mW 6J/cm² 84,9%; 30mW 9J/cm² 77,6% . * Significativo para a $p < 0,01$.

Figura 7.

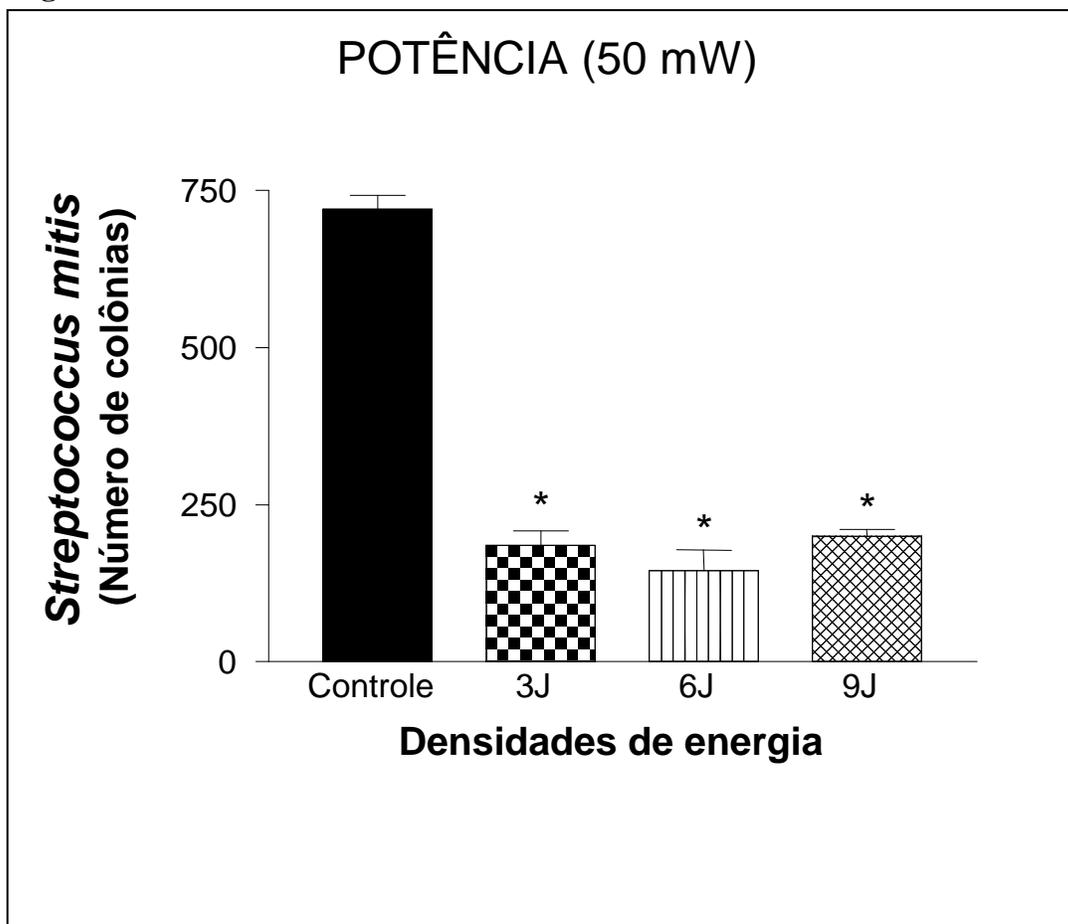


Figura 7.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas *Streptococcus mitis* em 50mW 3J/cm² 73,6%; 50mW 6J/cm² 79,5%; 50mW 9J/cm² 71,5%. * Significativo para p < 0,01.

Figura 8.

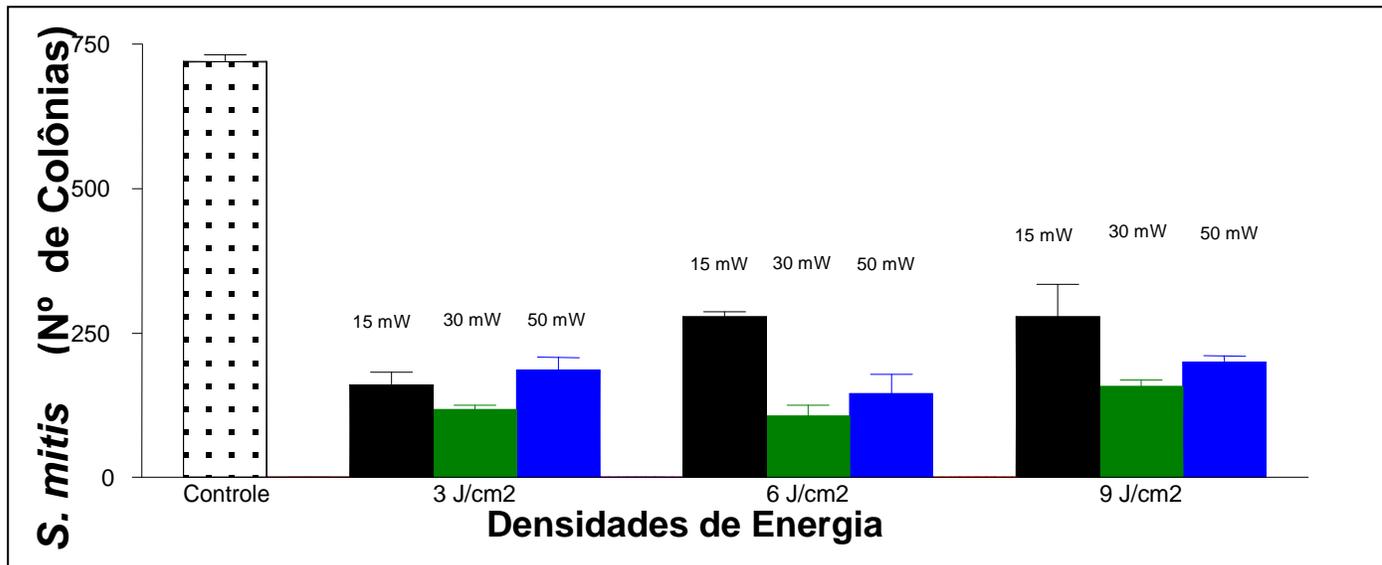


Figura 8.

Resultados comparativos entre potencias e densidades de energia.

Resultados obtidos do efeito da terapia fotodinâmica em cepas de *Streptococcus mitis* 15mW 3J/cm² 76,3%; 15mW 6J/cm² 60,3%;15mW 9J/cm² 60,3%; resultados em 30mW 3J/cm² 83,3%;30mW 6J/cm² 84,9%; 30mW 9J/cm² 77,6%; resultados 50mW 3J/cm² 73,6%; 50mW 6J/cm² 79,5%; 50mW 9J/cm²71,5%.

Figura 9.

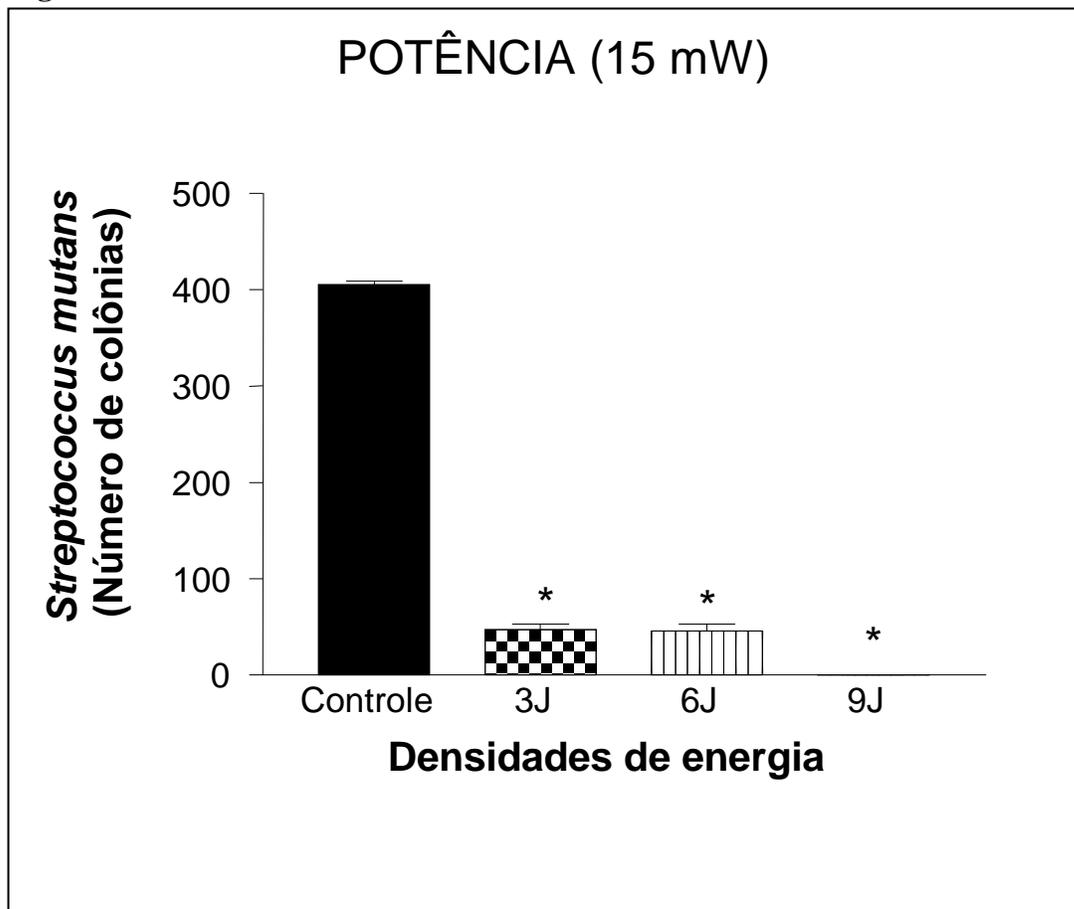


Figura 9.

Resultados obtidos na análise da terapia fotodinâmica com a cepa de *Streptococcus mutans*.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas para bactéria

Streptococcus mutans em 15mW 3J/cm² 88,7%; 15mW 6J/cm² 99,2%; 15mW 9J/cm² 99,7%.

* Significativo para $p < 0,01$.

Figura 10.

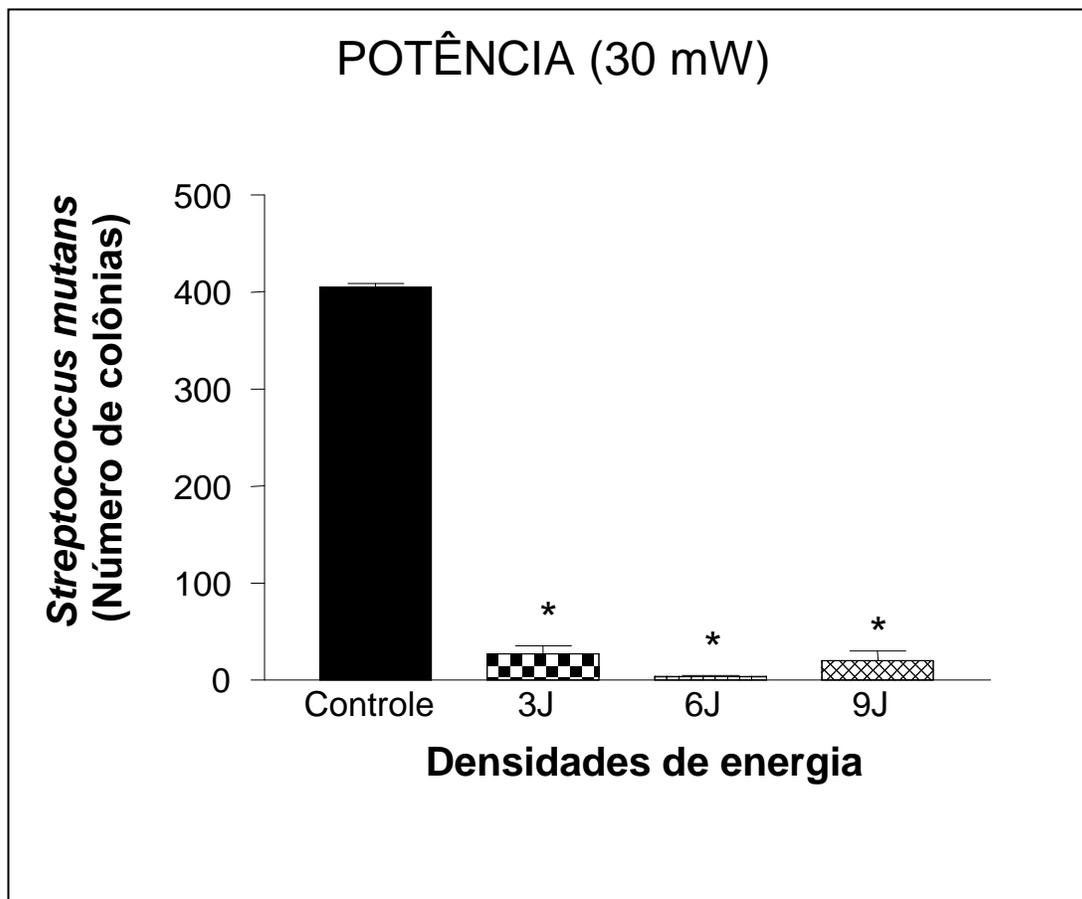


Figura 10.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas para bactéria *Streptococcus mutans* foram: Para 30mW 3J/cm² 93,5%; 30mW 6J/cm² 98,2%; 30mW 9J/cm² 90,5%. * Significativo para $p < 0,01$.

Figura 11.

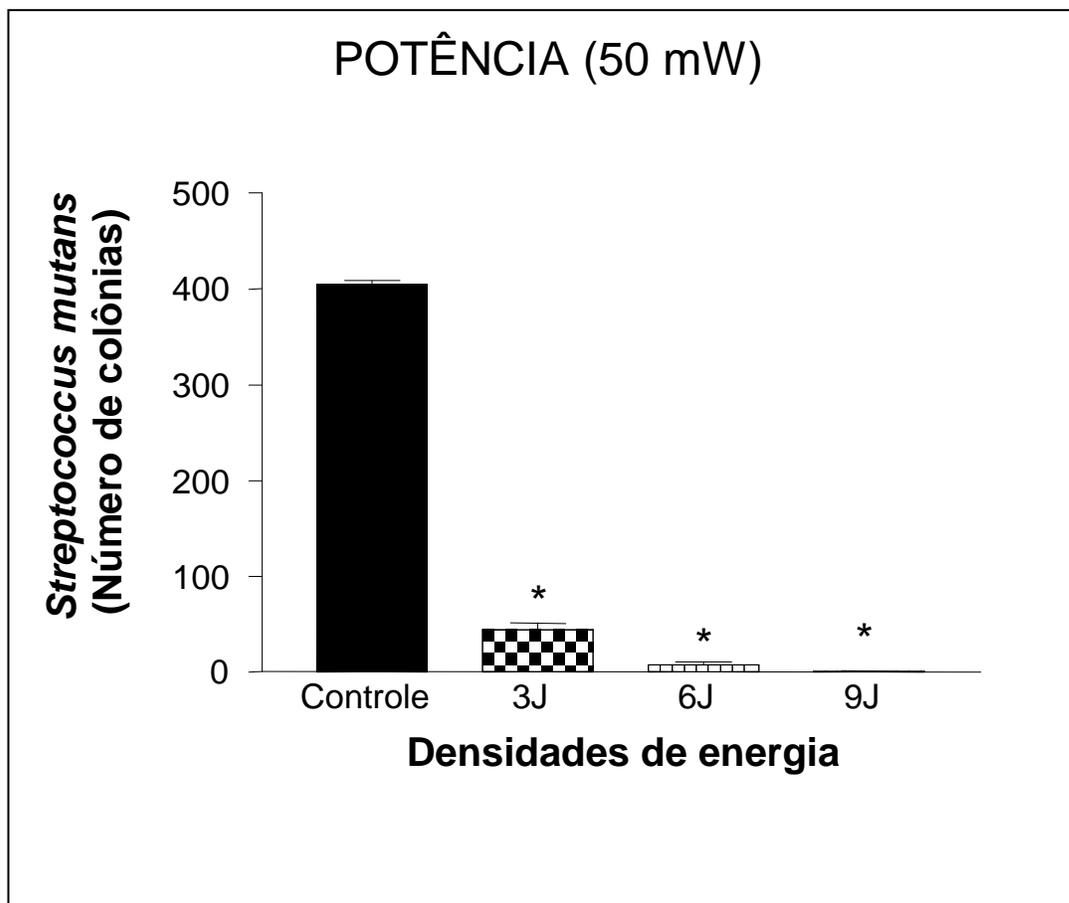


Figura 11.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas para bactéria *Streptococcus mutans* foram: Para 50mW 3J/cm² 89%; 50mW 6J/cm² 98%; 50mW 9J/cm² 99,5%. * Significativo para p < 0,01.

Figura 12.

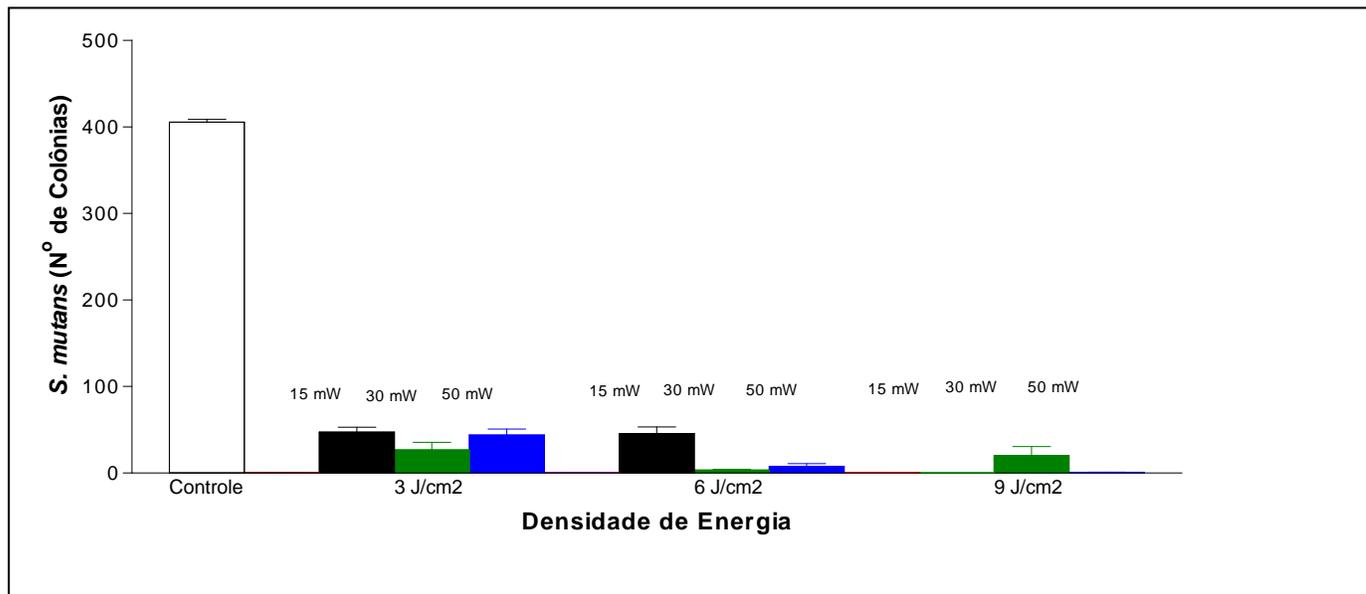


Figura 12.

Resultados comparativos entre potencias e densidades de energia.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas *Streptococcus mutans* foram: Para 15mW 3J/cm² 88,7%; 15mW 6J/cm² 99,2%; 15mW 9J/cm² 99,7%; resultados em 30mW 3J/cm² 93,5%; 30mW 6J/cm² 98,2%; 30mW 9J/cm² 90,5%; resultados 50mW 3J/cm² 89%; 50mW 6J/cm² 98%; 50mW 9J/cm² 99,5%.

Figura 13.

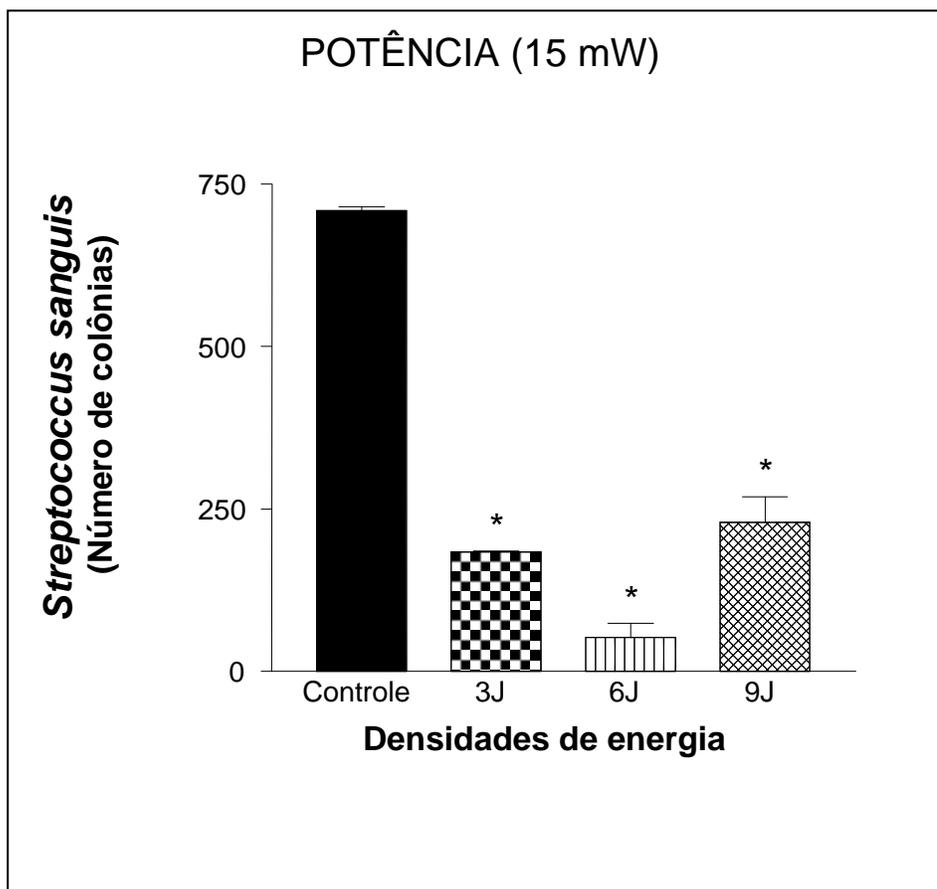


Figura 13.

Resultados obtidos na análise da terapia fotodinâmica com a cepa de *Streptococcus sanguis*.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de bactérias

Streptococcus sanguis foram: Para 15mW 3J/cm² 74,2%; 15mW 6J/cm² 92,6%; 15mW

9J/cm² 67,3%. * Significativo para $p < 0,01$.

Figura 14.

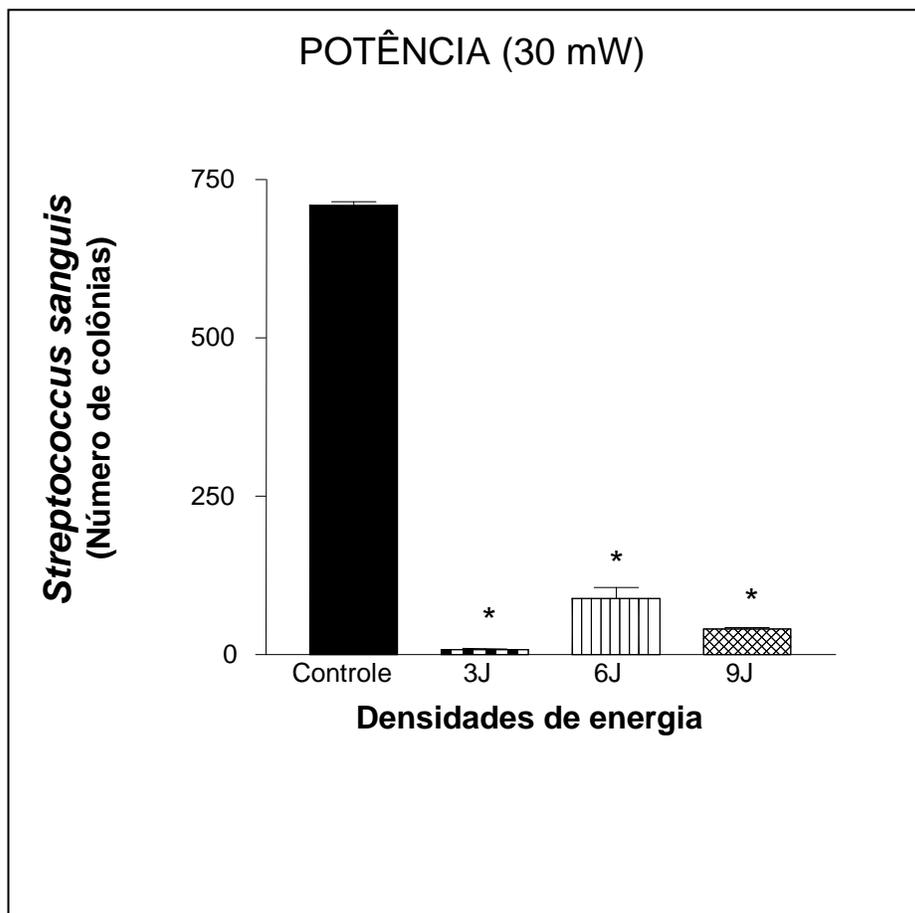


Figura 14.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de bactéria *Streptococcus sanguis* foram: Para 30mW 3J/cm² 98,9%; 30mW 6J/cm² 92,6%; 30mW 9J/cm² 94,3%. * Significativo para $p < 0,01$.

Figura 15.

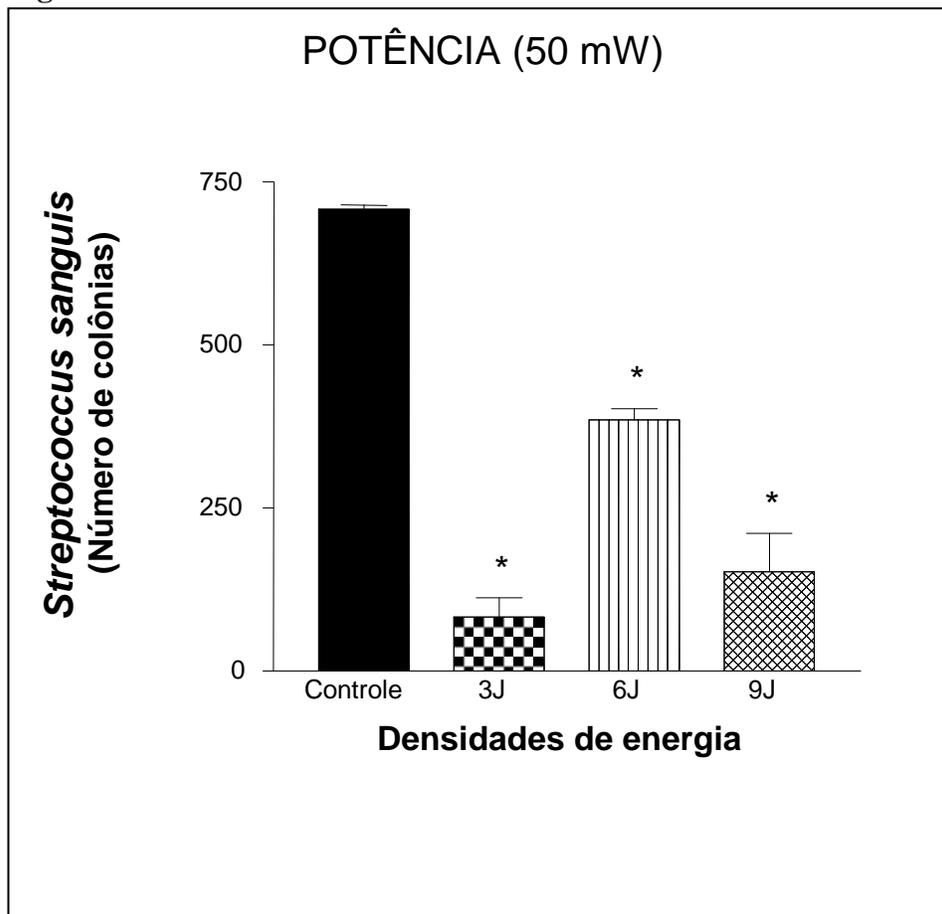


Figura 15.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de bactérias *Streptococcus sanguis* foram: Para 50mW 3Jcm² 88,3%; 50mW 6Jcm² 53,3%; 50mW 9Jcm² 78,3%. * Significativo para $p < 0,01$.

Figura 16.

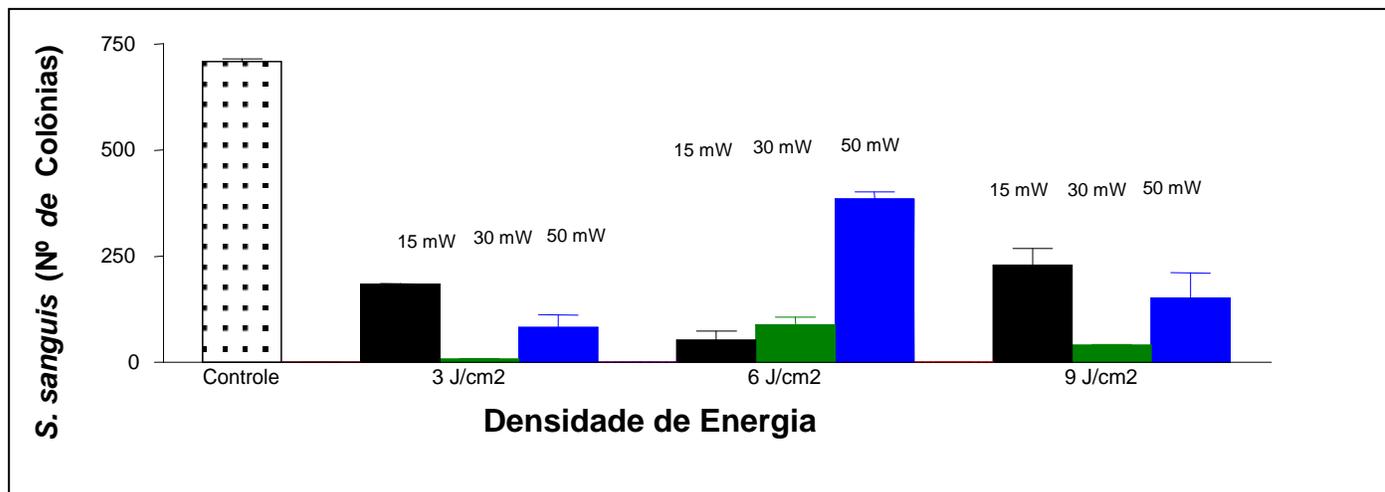


Figura 16.

Resultados comparativos entre potencias e densidades de energia.

Resultados obtidos do efeito bactericida da terapia fotodinâmica em cepas de *Streptococcus sanguis* foram: Para 15mW 3Jcm² 74,2%; 15mW 6Jcm² 92,6%;15mW 9Jcm² 67,3%; resultados em 30mW 3Jcm² 98,9%;30mW 6Jcm² 92,6%; 30mW 9Jcm² 94,3%; resultados 50mW 3Jcm² 88,3%; 50mW 6Jcm² 53,3%; 50mW 9Jcm²78,3%.

DISCUSSÃO

Apesar das intensas campanhas realizadas para prevenção de cárie dental, essa patologia ainda se constitui em problema para a odontologia. Considerada como uma decomposição lenta do dente resultante da perda de cristais de hidroxiapatita, a cárie, de natureza bacteriana, resulta numa infecção crônica do dente, com eventual perda deste e do suporte ósseo alveolar (WOLINSKY, 1984). É uma doença multifatorial que depende da interação de três fatores principais: o hospedeiro, representado pelos dentes e a saliva, a microbiota e a dieta consumida (JORGE, 1995). Avaliações cuidadosas de estudo sobre esta doença indicam que diferentes microorganismos desempenham alguma seletividade na superfície dentária a ser atacada (NEWBRUN, 1988).

As pesquisas atuais de combate à cárie têm sido direcionadas no sentido da descoberta de procedimentos que inibam a participação dos microrganismos em sua etiopatogenia. A descoberta dos raios lasers, permitiu a introdução de uma nova terapia, denominada de Terapia Fotodinâmica (PDT) para processos neoplásicos e não-neoplásicos e que envolve a ação desta luz laser na presença de oxigênio molecular de determinados corantes chamados fotossensibilizadores (SIBATA *et al.*, 2000). DOBSON e WILSON (1992) estudaram a sensibilização de bactérias orais através de uma mistura de azul de metileno e azul de toluidina, procurando determinar o índice letal nestes microrganismos quando da aplicação da luz laser de He-Ne – 730 nm. Concluíram que seus achados sugerem uma fotossensibilização letal que pode ser efetiva na eliminação de periodontopatias e placa dental.

Apesar do crescente número de trabalhos acerca da fotossensibilização de bactérias da cárie dental por corantes especiais, o tema ainda necessita de investigações mais dirigidas, o que motivou a realização desta pesquisa.

Procurou-se determinar, inicialmente, através de pesquisa clínica de levantamento da microflora da cárie dental de sulcos e fissuras, quais as bactérias mais frequentes encontradas no homem e se estas são consideradas as causadoras de lesões cariosas mais comuns de acordo com a literatura. Segundo NEWBRUN (1988) e JORGE (1995) os microrganismos mais comumente encontrados nestes tipos de lesões cariosas foram *Streptococcus mutans* (muito significante), *Streptococcus sanguis* (não muito significante), *Lactobacillus sp* (muito

significante), *Actinomyces* (pode ser significativa) e outros *Streptococcus* (não muito significativa). Os resultados obtidos nesta pesquisa encontram-se de acordo com a literatura, ressaltando apenas que não foram revelados o microrganismo *Actinomyces* e a presença, entre outros *Streptococcus*. Como consequência, foram utilizadas para este trabalho, cepas das bactérias: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutis*, e *Lactobacillus acidophilus* (sp).

Desde que, em 1917, Einstein, formulou a teoria de Emissão Estimulada, até 1960, quando esta se converteu em realidade graças aos trabalhos de Maiman (GENOVESE, 2000), que construiu a primeira emissão do laser a rubi e em 1961, quando JAVAN *et al.* desenvolveram o primeiro laser de baixa potência de Hélio-Neônio (He-Ne), a terapia a laser, graças aos seus efeitos analgésicos, antiinflamatórios e bioestimulantes, passou a ser utilizada em diversas especialidades odontológicas. BENEDICENTI (1983), por meio de inúmeros trabalhos sobre a ação da luz laser na bioestimulação dos tecidos, verificou um aumento de ATP mitocondrial. LIMIA (1986) apud (GENOVESE) relata a ação do laser de arseniato de gálio (AsGa) de 904 nm como bioestimulante celular, sem efeitos secundários, provocando também um aumento da circulação periférica. SILVEIRA e LOPES (1991) verificaram o efeito da radiação do laser de arseniato de gálio (AsGa) de 904 nm em pele do dorso de cobais, constataram a degranulação de mastócitos, áreas de vasodilação, proliferação fibroblástica e aumento de substância fundamental.

Por outro lado, o efeito bactericida do laser de baixa intensidade tem motivado uma série de pesquisas que procuram justificar o emprego desta energia. OKAMOTO *et al.*, (1992) estudaram o efeito bactericida do laser de He-Ne sobre as placas dentais, utilizando-se da terapia fotodinâmica com o corante de azul de metileno. Concluíram que a área de inibição das colônias de bactéria (*Streptococcus sobrinus*) foi maior na associação da energia com corante no tom azul. Entretanto, esses mesmos autores não constataram efeito inibitório sobre as bactérias com a utilização apenas da energia laser vermelha sem associação com corantes. BURNS *et al.* (1994) submeteram suspensões de *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus* a ação do laser de arseniato de gálio (AsGa). Esses autores verificaram que a exposição destas suspensões à luz laser na ausência de corantes, ou do corante na ausência da luz laser, não determinou efeito bactericida nestes organismos. Esses mesmos autores, em 1992, realizaram um estudo sobre a ação do laser de Hélio-Neon (He-Ne) e arseniato de gálio (AsGa) sobre os microrganismos de cárie incluindo

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentus* concluindo que, sem emprego de corantes, a energia laser não apresentam efeito bactericida.

DOBSON e WILSON (1992) afirmam que muitos estudos demonstram o efeito letal da luz laser visível tratada com fotossensibilizadores apropriados sobre as bactérias. Recentemente reportaram que um grande número de espécies de bactéria oral podem sofrer efeito letal pela aplicação da luz vermelha de hélio-neônio (He-Ne) seguidas de sensibilização com vários corantes. Essas pesquisas implicam que as doenças bacterianas, tais como cáries e periodontites podem ser amenizadas através da terapia fotodinâmica.

Com relação aos corantes utilizados, DOUGHERTY *et al.*, (1990) empregaram em suas investigações uma luz policromática em combinação com fotossensibilizadores como as hematoporfirinas, desenvolvidas para uso em terapia fotodinâmica para tumores. Entretanto, segundo HOWEVER *et al.* (1966) apud (OKAMOTO *et al.* 1990) demonstraram que corantes como azul de toluidina podem causar efeito deletério sobre bactérias sobre a ação da luz laser. VENEZIO *et al.* (1985) investigaram a ação da substância derivada da hermatoporfirina utilizada na terapia fotodinâmica em tumores, associado a luz laser com comprimento de onda específico, em microorganismos obtendo um efeito bactericida de 99,9% em relação ao *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus M-G intermediais*, *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptococcus magnus* e *Clostridium perfringes*.

A evolução dos estudos da tecnologia a laser de baixa intensidade provocou um aumento do interesse de industriais do ramo a produzirem aparelhos de alta resolução energética. Apesar da existência de apenas 3 modalidades de laser terapêutico, hélio-neônio (He-Ne), arsenieto de gálio (AsGa) e arsenieto de gálio e alumínio (AsGaAl), as alternativas de diferentes potenciais permitiram o aparecimento de equipamentos diversos, com luz laser visível e invisível, e cujos comprimentos de onda podem variar, no espectro eletromagnético, do visível à banda do infra-vermelho (VEÇOSO, 1993). As experiências clínicas demonstram que a densidade energética da terapia a laser pode variar numa escala flutuante de 1 a 9 J/cm² em casos de patologia bucal (GENOVESE, 2000).

A metodologia empregada neste trabalho, baseada nas pesquisas de (DOBSON e WILSON, 1992; OKAMOTO *et al.*, 1992; BURNS *et al.*, 1994) utilizou-se de energia laser vermelha de AsGaAl, cujos os aparelhos possuem potência de 15 mW, 30 mW e 50mW, com 670 nm de

comprimento de onda com densidades energéticas de 1 a 15J/ cm², sendo que as mais empregadas são de 3J/cm²,6J/cm²e 9J/cm². As cepas utilizadas de bactérias *Streptococcus mutans*, *Sreptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus cidophilus(sp)* foram selecionadas em função de pesquisa clínica e dos trabalhos de NEWBRUN (1988) e JORGE (1995). Para a aplicação de terapia fotodinâmica utilizou-se o corante de azul de toluidina na concentração de 75µg/ml. (STRINGER *et al.*, 1998; BURNS *et al.*, 1995; SOUKOS *et al.*, 1996, DOBSON e WILSON, 1992).

Os resultados obtidos por nós para as cepas *Streptococcus mutans* mostram o efeito bactericida em todas as densidade energéticas, estando de acordo com os trabalhos de VENEZIO *et al.* (1985) que utilizaram de luz laser de 630 nm e corante de derivado de hematoporfirina (99,9% de efeito bactericida), BURNS *et al.* (1992) que empregaram o laser de HeNe de 8mW e AsGa de 15mW e corante de azul de toluidina, concluindo pela ação bactericida em relação ao *Streptococcus mutans*. Já BURNS *et al.* (1994) que se utilizaram do laser de AsGa e corante de aluminium disulphonatede phthalocyanne concluíram pela fotossensibilização letal desta bactéria. Por outro lado BURNS *et al.* (1995) trabalharam com laser de He-Ne, com densidades energéticas de 1,18 mJ e 3,50 mJ e AsGaAl com densidades energéticas de 1,88 mJ, 2,37 mJ e 4,75 mJ, utilizando como corantes o azul de toluidina ou aluminium disulphonated phthalocyanine. O efeito bactericida verificou-se na densidade energética de 1,31 mJ, para o He-Ne e 1,78 mJ para AsGaAl. STRINGER *et al.* (1998), trabalhando com laser diodo de 670 nm e corante de azul de metileno (100 ug/ml) obtiveram um efeito letal sobre o *Streptococcus mutans* de 97,2%.

Resultados obtidos em relação ao efeito deletério da terapia fotodinâmica para *Streptococcus sanguis* estão de acordo com os trabalhos de DOBSON e WILSON, (1992) que irradiaram biofilmes de *Streptococcus sanguis* com laser He-Ne de 7.3 mW associado aos corantes azul de toluidina e azul de metileno que revelaram efeito bactericida sobre este microorganismo e SOUKOS *et al.* (1996) que se utilizam de laser de He-Ne de 7.3 mW associado ao corante de azul de toluidina 2,5 ug/ml, concluindo pelo efeito de fotossensibilização letal por esta bactéria.

Em relação ao *Streptococcus mitis* os resultados demonstraram efetiva ação bactericida, porem, a reduzida literatura mundial a respeito desta atividade não permitiu o comparativo de resultado.

Da mesma forma que para o caso do *Streptococcus mitis*, havendo poucos trabalhos na literatura que possam comprovar o efeito bactericida da terapia fotodinâmica e em relação ao *Lactobacillus acidophilus* conclui-se pela efetividade desta terapêutica em relação a este microorganismo.

A análise crítica dos resultados obtidos nesta pesquisa, consolidada pelos coeficientes de significância de $p < 0,01$ (teste T Student), caracterizam com bastante segurança, a eficácia da terapia fotodinâmica em sua ação deletéria sobre os principais microorganismos causadores da cárie dental. Entretanto é importante notar que os melhores resultados da terapia fotodinâmica com laser de AsGaAl associado ao corante de Azul de toluidina foram obtidos em relação aos efeitos bactericidas sobre as bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*(sp) que na opinião de WOLINSKY (1984) das diversas espécies bacterianas isoladas da cárie dental os maiores suspeitos de serem os agentes etiológicos são estes microorganismos:

Estes resultados permitem se afirmar que um novo campo se abre para o tratamento da cárie dental que poderão ser consolidados por criteriosas pesquisas clínicas.

CONCLUSÕES

Nos resultados obtidos nesta pesquisa, concluímos que:

1. A terapia fotodinâmica realmente produz ação bactericida eficiente sobre bactérias causadoras de cáries de sulcos e fissuras de dentes humanos.
2. As cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis* são sensíveis a terapia fotodinâmica sendo que as cepas de bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* que são segundo a literatura as maiores responsáveis pelas cáries de sulcos e fissuras e também de dentina, são as mais sensíveis ao efeito bactericida da terapia fotodinâmica.
3. Todas as potências e densidades de energia empregadas nesta pesquisa são capazes de promover o efeito bactericida da terapia fotodinâmica.
4. A interação promovida entre o laser de baixa intensidade de AsGaAl de 670nm e o corante orto toluidina são eficientes na promoção do efeito bactericida da terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTHI, M; MACROBERT, A; MEGHJI S; HENDERSON, B; WILSON, M. A study of the uptake of toluidine blue by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. **Photochem Photobiol** ;v.68,n.3,p.370-6, Set.,1998.

BENEDICENTI, A; MARTINO, A . La valutazione Dell' incremento di ATP endocellulare in linfociti sotto posti a bioestimulazione con linee laser 904nm infrared. **Parodont, S. Tomat (Nuova)**. v.1, n.1, set./dec. 1983.

BRUGNERA JR, A; PINHEIRO, ALB. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

BUNS, T; WILSON, M ; PEARSON, G.J; Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res** v.29, n.3, p.: 192-7, 1995.

BURNS, T; WILSON, M; PERSON, G. Laser-induced Killing of photosensitized cariogenic bacteria. **J Dent Res** .;v71:675,1992.

BURNS ,T; WILSON, M; PERSON, G.J. Sensitisation of to killing by light from helium/neon laser . **J Med Microbiol** ;v38:p401-405, 1994.

DAVEY, A L; ROGERS, AH. Multiple types of the bacterium *streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission.;**Archs Oral Biol** v29,n.6:p453-460, 1994.

DOBSON, J; WILSON, M. Sensitisation of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archs Oral Biol** ;v37:p 883-887, 1992.

FERREIRA, CP. **Bioquímica Bucal**. São Paulo; MNP 2000.

GENOVESE, W J. **Laser de baixa intensidade, Aplicações Terapêuticas em Odontologia**; São Paulo: Lovise , 2000.

JAVAN, A ; BENNET, W.R; HERRIOT, D R. Population inversion and continuous optical laser oscillation in gás discharge containing a HeNe mixture. **Physiol Ver**, v.6 :p106-110, 1961.

JORGE , AOC. **Microbiologia Bucal** . São Paulo: Santos, 1995.

IWASE, T; SAITO, T; NARA, Y; MORIOKA, T. Inhibitory effect of HeNe laser on dental plaque deposition in hamster. **J Periodont Res** , v24, p282-283,1989.

KLEIN, E; FINE, S; AMBRUS, J; COHEN, E; NETER, E; AMBRUS, C; BARDOS, T; LYMAN, R. Interaction of Laser Radiation with biologic systems. III. Studies on biologic system in vitro. **Fed Proc** ;v24, p104-110,1965.

KOMATSU, K. Photodynamic cell killing effects and acute skin photosensitivity of aluminium-chloro-tetrasulfonated phthalocyanine and hematoporphyrin derivate; **Jpn J Cancer Res.** , v82, n.5, p599-606, May 1991.

KONEMAN ,E W et al. **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: Panamericana 1989.

MACMILLAN, J D; MAXWELL, W A; CHINCHESTER, C O. Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous wave gas laser. **Photochem. Photobiol.** ,v.5, p.555-565, 1965.

MARSH, PD; BRANDSHAW, D.J. Dental plaque as a biofilm. **J. Int. Microbiol.** , v.15 n.3, 169-175, September 1995.

MARSH, PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Dent. Clin. North Am.** , v.43, n.4, p599-614, October 1999.

MCGUFF, PE; BELL, E.J. The effect of laser energy radation on the bacteria. **Med. Bio.** III v.16, p.191-194, 1966.

NEWBRUN, E. **Cariologia**. São Paulo: Santos, 1988.

OKAMOTO, H; IWASE, T; MORIOKA, T. Dye- Mediated Bactericidal Effect of He-Ne laser irradiation on Oral Microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, p.451-458,1992.

OKAMOTO, H; IWASE, T; NARA, Y; MORIOKA, T. Studies on mecanism of bactericidal actino by low enregy laser. **J. Dent. Health** , v.40 , n.4, p.536-537, 1990.

SARKAR S, WM. Lethal photosesitisation of bacteria in subgingival plaque from the patients with chronic periodontitis. **J. Periodontal. Res.** ;v.28, p.204-210, 1993.

SCHULTZ, RJ; HARVEY, GP; FRENANDEZ-BEROS, ME; KRISHNAMURTHY, S; RODRIGUEZ, JR; CABELLO, F. Bactericidal effects of the Nd:YAG laser: *in vitro* study. **Lasers Surg. Med.** , v.6, p445-448, 1986.

SIBATA, CH; COLUSSI, VC; OLEINICK, NL; KINSELLA; T.J. Photodynamic terapy: a new cocept in medical treatment. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v33, p.869-880, 2000.

SILVEIRA, J C; LOPES, E E. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de AsGa-904nm (Estudo experimental em cobaias –Cavia Porcellus), **Arq. Centro Estud. Curso Odontol.**, v28, p.71-94, 1991.

SOUKOS, NS; WILSON, M; BURNS, T; SPEIGHT, P M. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral Keratocytes and fibroblasts and Streptococcus sanguis evoluated *in vitro*. **Lasers Surg. Med.** , v.18, n.3:p.253-9, 1996.

STRAETMANS M..M.E; VAN LOVEREN C.; DE SOET J.J; DE GRAAFF J.;TEN CATE J.M.; Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the Age of Five; **J. Dent Res.** v.77 , n.10, p.1851-1855, October 1998.

STRINGER. GJ; BIRD, PS; WALH, .LJ. Lethal Laser photosensitization of Streptococcus mutans, Absorbed into Dentine Slices. **International Congress on Laser in Dentistry, 6 1998.**

VAN HOUTE J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J. Dent. Res.**, v.73, n.3, p.672-81, 1994.

VEÇOSO, MC. **Laser em fisioterapia.** São Paulo: Lovise, 1993.

VENEZIO, F; DIVINCENZO, C; SHERMAN, M; REICHMAN, M; ORIGITANO TC; THOMPSON, K; REICHMAN, O H. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **J. Infectious diseases.** v.151, n.1, January 1985.

WIEMAN, TJ; FINGAR, V.H. Terapia Fotodinâmica em Schawesubger . In: **Clínicas Cirúrgicas da América do Norte.** v.3, Rio de Janeiro: Interlivros, 1992.

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

WILSON, M; DOBSON, J; HARVEY, W. Sensitisation of streptococcus sanguis to killing by low-power laser radiation. **Med. Sci.** , v.8, p.69-73,1993.

WILSON, M; DOBSON, J; SARKAR, S. Sensitization of periodontalpathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol. Imunol** , v.8, p.182-187,1993.

WILSON, M. Bactericidal effects of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int. Dent. J.** , v.44, n.2, p.81-189, April 1994.

WILSON, M; 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.**, v.78,n.5, p.569-74, May 1995.

WILSON M; PRATTEN J; PEARSON G.J. Killing of cariogenic bacteria by light from a galium aluminium arsenide diode laser; **J. Dent.**, v.22, n.5,p.373-8, Oct 1994.

WOLINSKY, LE; SOTE, EO. Isolation of natural natural plaque-inhibiting substances from "Nigerian Chewing Sticks." **Caries Res.**, v.18, p.216, 1984.

ANEXO 1**TEMPO DE APLICAÇÃO DOS LASERS**

15mW; 670nm; 3J em 147s,
15mW; 670nm ; 6J em 228s,
15mW; 670nm ; 9J em 277s,
30mW; 670nm ; 3J em 114s
30mW; 670nm ; 6J em 228s
30mW; 670nm ; 9J em 343s
50mW; 670nm ; 3J em 62s
50mW; 670nm ; 6J em 123s
50mW; 670nm ; 9J em 185s.