

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

IRIANA CARLA JUNQUEIRA ZANIN

**“ESTUDO *IN VITRO* E *IN SITU* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO
LASER DIODO ASSOCIADO A FOTOSSENSIBILIZADOR SOBRE
MICRORGANISMOS BUCAIS”**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do
título de Mestre em Odontologia - Área de
Cariologia.

PIRACICABA

2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

IRIANA CARLA JUNQUEIRA ZANIN

**“ESTUDO *IN VITRO* E *IN SITU* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO
LASER DIODO ASSOCIADO A FOTOSSENSIBILIZADOR SOBRE
MICRORGANISMOS BUCAIS”**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 29/04/02
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Cariologia.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Prof. Dr. Aldo Brugnera Junior

PIRACICABA

2002

UNIDADE BC
CHAMADA T/UNICAMP
Z16e
EX
OMBO BC/ 49636
ROC 16-837/02
DX
REÇO R\$ 11,00
ATA 14/06/02
CPD

CM00169240-0

B ID 245772

Ficha Catalográfica

Z16e

Zanin, Iriana Carla Junqueira.

Estudo *in vitro* e *in situ* da ação antimicrobiana do laser diodo associado a fotossensibilidade sobre microrganismos bucais. / Iriana Carla Junqueira Zanin. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002. xx, 98p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Lasers. 2. Microbiologia. 3. Odontologia. 4. Terapia fotodinâmica¹. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

¹ Cabeçalho para validação.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 13 de Março de 2002, considerou a candidata IRIANA CARLA JUNQUEIRA ZANIN aprovada.

1. Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

2. Prof. Dr. JESUS DJALMA PÉCORÁ

3. Prof. Dr. ALDO BRUGNERA JUNIOR

20226556

À Deus,

fonte de inesgotável sabedoria e amor...

Aos meus pais, Luiz e Vera

por me ensinarem que o fim não existe,

quando se tem por dentro a certeza de recomeçar...

Aos meus irmãos, Luciana e Mauricio

Pessoas incríveis, apoio sempre presente,

exemplos no meu viver...

Ao Vitor,

expressão pura e completa do amor...

Com muito carinho,

Dedico

Agradecimento especial

Ao meu orientador Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves,

Pela confiança e credibilidade,
por ter consentido em que eu trilhasse caminhos desconhecidos,
despertando em mim a curiosidade e o prazer pela ciência.

Ao Prof. Dr. Aldo Brugnera Junior e Profa. Fátima A. A. Zanin

Pelas pessoas que são,
exemplos de amor, determinação e coragem,
por seu constante estímulo ao meu crescimento pessoal e profissional.

Muito Obrigada.

Meus sinceros agradecimentos,

Ao Magnífico Reitor da Unicamp, Prof. Dr. **Hermano Ferreira de Medeiros Tavares** e ao Prof. Dr. **Antonio Wilson Salum**, Diretor da FOP-UNICAMP, instituições que me acolheram durante minha pós-graduação.

À profa. Dra. **Altair Antoninha Del Bel Cury**, coordenadora dos cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aos Prof. Dr. **Jaime A. Cury** e Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, pesquisadores extraordinários, pela ajuda e pelo exemplo.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudos concedida.

Ao **FAEP** (Fundação de Amparo ao Ensino e a Pesquisa da UNICAMP) pela verba concedida para a execução deste projeto.

À **DMC Equipamentos Ltda** e sua equipe, na pessoa de **Renaldo Massini Junior** pelo fornecimento do aparelho laser e pelo suporte técnico oferecido durante toda a realização desse estudo.

Ao Prof. Dr. **Antonio Luiz B. Pinheiro**, e aos engenheiros **Sergio Celaschi** e **Idelfonso Felipe de Faria** pela contribuição fundamental durante a execução deste trabalho.

Aos professores **José Francisco Höfling**, **Cíntia Pereira Machado Tabchoury** e **Marinês Nobre dos Santos Uchôa**, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para a realização e finalização deste projeto.

Aos amigos, professores da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Prof. Dr. **José Francisco Höfling**, Prof. Dr. **Celso Paulino da Costa**, Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves** e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP.

Aos amigos, funcionários da Microbiologia, **Anderson e Wilma** pelo incentivo e inestimável ajuda.

Às secretárias **Elisa, Érica e Sônia** pela atenção e auxílio nas fases administrativas.

Aos amigos da Microbiologia **Edvaldo, Cássio, Marcelo B., Janaína, Meire, Magda, Vagner, Marcelle, Ana Cláudia, Rita, Marlise, Regianne, Flávia, Marcelo N., Daniel, Rafael, Carolina, Fernando e Thais**.

Aos amigos **Marcelo N., Fabio, Fernando, Ana Karina, Ana Cláudia, Flávia, Rita, Regianne, Angela, Carolina e Thais**, por sua participação como voluntários neste estudo.

Aos amigos e companheiros de turma **Andréa, Adriana, André, Fábio M., Fábio K., Lidiany, Luciane, Marcelle, Márcia, Roberta, Rosane, Vanessa, e Viviane** pela amizade e riso compartilhados.

Aos amigos e companheiros da Pós Graduação **Alexandre, Dany, Franco e Leonardo** pela amizade e companheirismo.

Às grandes amigas **Marcelle, Simone, Viviane, Lidiany e Andréa**, pelo apoio em todas as horas, fazendo meus dias mais felizes.

As minhas primas **Vanessa, Sissi e Camila**, por encontrar em seus olhares e sorrisos o reconhecimento do meu trabalho e a força para continuar.

Ao meu irmão de coração **Juraci Marque Oliveira**, o exemplo vivo de que os homens são do tamanho de seus sonhos.

Ao professor **Jorge Valério**, pela colaboração e amizade.

A todos os funcionários da FOP (motoristas, funcionários da limpeza, pessoal da portaria, telefonistas, CPD, CRA, cantina, etc) pela colaboração e compreensão.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

***“Não fiquem maravilhados diante do novo,
nem assustados pelo que ontem vos era desconhecido.
Nem recuem diante do mistério, mas procurem enfrentá-lo e desvendá-lo...
Não se considerem os únicos donos da verdade e do conhecimento,
pois um diploma não faz o cientista, o sábio.
Somente assim poderão cumprir sua missão, ser úteis ao próximo...
E façam tudo com amor,
Pois será um dia esplêndido aquele em que dos progressos da ciência,
participará também o coração”***

Louis Pasteur

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas.....	01
Lista de ilustrações.....	05
Resumo.....	07
Abstract.....	09
1. Introdução.....	11
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1. Microbiota associada à cárie dental.....	17
2.2. Luz laser.....	21
2.3. Ação antimicrobiana dos lasers de baixa potência.....	25
3. Proposição.....	39
4. Material e Métodos.....	41
4.1. Delineamento Experimental.....	41
4.2. Padronização da Técnica.....	42
4.2.1. Estudos Pilotos.....	42
4.2.2. Laser e Fotossensibilizador.....	43
4.3. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	45
4.3.1. Microrganismos e meios de cultura.....	45
4.3.2. Obtenção das amostras da saliva.....	46

4.3.3. Irradiação das suspensões.....	47
4.3.3.1. Contagem dos microrganismos viáveis.....	47
4.3.3.2. Halo de inibição de crescimento.....	48
4.4. Atividade antimicrobiana <i>in situ</i>	49
4.4.1. Grupo experimental.....	49
4.4.2. Preparo dos blocos de esmalte.....	50
4.4.3. Confeção dos dispositivos intra- bucais palatinos.....	51
4.4.4. Acúmulo de biofilme bacteriano.....	52
4.4.5. Irradiação dos microrganismos crescidos em biofilme bacteriano.....	53
4.5. Análise estatística.....	55
5. Resultados.....	57
5.1. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	57
5.1.1. Suspensões bacterianas.....	57
5.1.2. <i>Pool</i> de saliva humana.....	59
5.1.3. Halo de inibição de crescimento de microrganismos.....	60
5.2. Atividade antimicrobiana <i>in situ</i>	61
5.2.1. Estreptococos totais.....	61
5.2.2. Estreptococos grupo mutans.....	63

5.2.3. Lactobacilos.....	65
5.2.4. Candidas.....	66
6. Discussão.....	69
7. Conclusões.....	79
Referências Bibliográficas.....	81
Anexos.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

\leq	- Menor ou igual
μg	- Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	- Micrograma por mililitro
$^{\circ}\text{C}$	- Graus centígrados
AlPcS₂	- Alumínio dissulfonado fitalocianino
ArGaAl	- Arseneto-gálio-álumínio
ATP	- Adenosina tri-fosfato
C+L-	- Tratamento com corante e sem laser
C+L+	- Tratamento com corante e com laser
C-L-	- Tratamento sem corante e sem laser
C-L+	- Tratamento sem corante e com laser
CO₂	- Dióxido de carbono
DHE	- Dihematoporfirina éster
DNA	- Ácido desoxiribonucleico

GaAs	- Arseneto-gálio
J	- Joules (refere-se a dose de energia)
J/cm²	- Joules por centímetro quadrado (refere-se a densidade de energia)
Laser	- Light amplification by stimulated emission of radiation
Log₁₀	- Logaritmo de 10
Maser	- Microwave amplification by stimulated emission of radiation
mJ	- Milijoule
mL	- Mililitro
MSA	- Mitis Salivarius Ágar
MSB	- Mitis Salivarius Bacitracina
mW	- Miliwatts
mW/cm²	- Miliwatts por centímetro quadrado (refere-se a densidade de potência)
NaCl	- Cloreto de sódio
Nd:YAG	- Neodímio:ítrio-alumínio-granada

nm	- Nanômetros
pH	- Potencial hidrogeniônico
TBO	- Azul de toluidina O
TPI	- Tempo de pré-irradiação
UFC	- Unidade formadora de colônia
UFC mg⁻¹	- Unidades formadoras de colônia por miligrama
UFC ml⁻¹	- Unidades formadoras de colônia por mililitro
W	- Watts (refere-se a potência)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Laser diodo com comprimento de onda de 660 nm (DMC Equipamentos Ltda).
- Figura 2** - Fotossensibilizador azul de toluidina O, marca Sigma, código internacional 52040.
- Figura 3** - Dispositivo intra-oral palatino confeccionado individualmente para os doze voluntários durante a realização do estudo *in situ*.
- Figura 4** - Tela plástica recobrindo o bloco de esmalte dental humano.
- Figura 5** - Remoção da tela plástica ao fim do período experimental do estudo *in situ* com lâmina de bisturi estéril.
- Figura 6** - Visão do biofilme bacteriano acumulado sobre os blocos de esmalte dental após a utilização do dispositivo intra-oral palatino por quatorze dias.
- Figura 7** - Coleta do biofilme bacteriano com cureta estéril para análises.
- Figura 8** - Sonicador Vibra Cell, Sonics & Materials Inc 400 W.
- Tabela 1** - Médias das contagens dos microrganismos viáveis nas suspensões bacterianas após terem sido submetidas aos tratamentos.

- Tabela 2** - Médias das contagens dos microrganismos viáveis no pool de saliva humana após ter sido submetido aos tratamentos.
- Tabela 3** - Presença ou ausência de halo de inibição de crescimento para suspensões bacterianas submetidas aos tratamentos.
- Figura 9** - Médias das contagens de estreptococos totais no biofilme bacteriano após ter sido submetido aos tratamentos.
- Figura 10** - Médias das contagens de estreptococos grupo mutans no biofilme bacteriano após ter sido submetido aos tratamentos.
- Figura 11** - Médias das contagens de lactobacilos no biofilme bacteriano após ter sido submetido aos tratamentos.
- Figura 12** - Médias das contagens de candidas no biofilme bacteriano após ter sido submetido aos tratamentos.

RESUMO

A redução de microrganismos patogênicos da superfície dental é um dos fatores principais envolvidos na prevenção e controle da doença cárie. Neste estudo avaliou-se o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre microrganismos bucais *in vitro* e *in situ* utilizando um laser diodo de 660 nm (meio ativo de arseneto-gálio-alumínio da DMC Equipamentos Ltda, emissão contínua, potência de entrada na sonda de 21 mW, sonda de 0,8 cm de diâmetro com perda de 24%, potência de saída na sonda de 16 mW e densidade de energia de 28,8 J/cm²) associado ao corante azul de toluidina O na concentração de 100 µg/mL (Sigma CI 52040). Suspensões bacterianas foram submetidas aos tratamentos com corante, com laser e com corante e laser ao mesmo tempo. A total inibição de crescimento foi encontrada *in vitro* para *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus. cricetus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*. Reduções estatisticamente significativas foram encontradas para *Streptococcus sanguinis* e a ausência de efeito antimicrobiano foi observado para *Candida albicans*. A aplicação da terapia fotodinâmica sobre *pool* de saliva humana *in vitro* demonstrou inibição total de crescimento para estreptococos grupo mutans e inibição parcial de crescimento para estreptococos totais. Os resultados da sensibilização dos microrganismos crescidos em biofilme dental *in situ* demonstraram total inibição de crescimento para estreptococos grupo mutans, estreptococos totais e lactobacilos com reduções nas contagens respectivamente

de $2,4 \times 10^5$, $4,8 \times 10^6$, e $9,7 \times 10^5$ nos grupos não tratados para zero nos grupos submetidos à terapia fotodinâmica. A candida apresentou inibição parcial de crescimento estatisticamente significativa *in situ*. Assim, a terapia fotodinâmica é efetiva para a redução de bactérias cariogênicas *in vitro* e *in situ* nos parâmetros testados.

ABSTRACT

Elimination of pathogenic microorganisms from dental surface has been one of the most important factors related to dental caries control and prevention. In order to test the antimicrobial effect of photodynamic therapy on the susceptibility of oral microorganisms, the diode laser at 660 nm (a gallium-aluminium-arsenide laser from DMC Equipments Ltda, continuous mode, power input of 21 mW, sound diameter of 0,8 cm with loss of 24%, power output of 16 mW and energy density of 28,8 J/cm²) in association with toluidine blue O at a concentration of 100 µg/mL (Sigma CI 52040) was evaluated *in vitro* and *in situ*. Suspensions of microorganisms were exposed to treatment with the dye, the laser and to dye and the laser together. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* showed total growth inhibition *in vitro*. A statistically significant reduction in microorganism was observed for *Streptococcus sanguis*, and no effect on the viability of *Candida albicans* was found after therapy. Total growth inhibition to mutans streptococci and partial growth inhibition to total streptococci were found when human saliva was exposed to the photodynamic therapy. Following, an *in situ* experiment was conducted in order to verify the effect of this therapy on dental biofilms. Microorganisms grown in biofilm presented total growth inhibition of mutans streptococci, total streptococci, and lactobacilli with the viable count, being respectively reduced from $2,4 \times 10^5$, $4,8 \times 10^6$, e $9,7 \times 10^5$ (control groups) to zero

(groups exposed to both laser and dye). A partial growth inhibition statistically significant in microorganism was observed for candida *in situ*. In conclusion, it was observed that the photodynamic therapy can effectively reduce *in vitro* and *in situ* cariogenic bacteria on tested parameters.

1. INTRODUÇÃO

A microbiota indígena exerce um papel fundamental tanto na promoção de saúde como no surgimento de doenças. Sua presença contribui para o desenvolvimento do sistema imune podendo dificultar a colonização por microrganismos patogênicos (MCNABB & TOMASI, 1981; THEILADE, 1990; MARSH & MARTIN, 1992) embora constitua também um reservatório de bactérias potencialmente patogênicas capazes de infectar os tecidos do hospedeiro (BOWDEN *et al.*, 1979; THEILADE, 1990).

O desenvolvimento de doenças só ocorre depois do desequilíbrio da microbiota indígena levando ao favorecimento de bactérias potencialmente patogênicas. Para definir os processos envolvidos na cárie dental precisamos compreender a ecologia da cavidade bucal e identificar os fatores responsáveis pela transição de uma relação de comensalismo para uma relação patogênica da microbiota bucal para com o hospedeiro (MCKEE *et al.*, 1985; MARSH & MARTIN, 1992).

A presença de microrganismos patogênicos na superfície dental é um dos fatores predisponentes para o desenvolvimento da cárie que é reconhecida como uma doença infecciosa de caráter crônico, dependente da interação e associação de um hospedeiro susceptível, microrganismos cariogênicos e uma dieta rica em sacarose interagindo por um determinado período de tempo (LOESCHE, 1986).

Ocorre que os microrganismos não se depositam ou aderem diretamente à superfície dos cristais de apatita, eles se ligam a uma fina camada acelular composta por proteínas salivares e outras macromoléculas que recobrem as superfícies dentárias formando a película adquirida. Poucas horas após a exposição de uma superfície dental totalmente limpa ao ambiente bucal, a superfície não só estará recoberta por essa película, mas também por vários microrganismos formando o biofilme bacteriano (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995).

O freqüente consumo de carboidratos fermentáveis podem levar a constantes quedas de pH no biofilme, gerando uma diminuição na proporção de bactérias ácido-sensíveis como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus bucalis*, e *Streptococcus mitis* e um aumento nas proporções de bactéria acidúricas e acidogênicas como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*. O aumento nos índices de *S. mutans* e *Lactobacillus* leva a uma produção cada vez maior de ácido, promovendo a desmineralização do dente (CHALLACOMBE, 1980; MARSH, 1994) e deixando a superfície dental mais susceptível ao aparecimento de lesões cariosas.

Assim, a cárie dental resulta da formação de biofilmes bacterianos sobre a superfície dental e tecidos adjacentes e o seu tratamento envolve a remoção mecânica desses biofilmes. Nas últimas décadas, têm aumentado o interesse na possibilidade de substituir ou complementar a terapia mecânica com o uso de agentes anti-sépticos ou antibióticos (WILSON *et al.*, 1996). Ocorre, no

entanto, que o uso freqüente desses agentes no tratamento de doenças crônicas pode resultar no desenvolvimento de resistência por algumas espécies.

Recentemente, a ação antimicrobiana dos lasers tem sido estudada em diversas áreas da odontologia. Os efeitos dos lasers nos diferentes tecidos estão intimamente relacionados com a distribuição da energia depositada, de modo que a propriedade óptica de cada tecido determina a extensão e a natureza da resposta tecidual que ocorre através de processos de absorção, transmissão, reflexão e difusão da luz laser (PINHEIRO, 1998). Os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos: os lasers cirúrgicos, com capacidade de cortar tecidos duros e moles e os lasers não-cirúrgicos ou lasers terapêuticos com ação analgésica, antiinflamatória, biomoduladora e antimicrobiana (WALSH, 1997, BRUGNERA JUNIOR & PINHEIRO 1998).

Nas últimas décadas, a ação antimicrobiana dos lasers terapêuticos tem sido estudada em um processo conhecido como fotossensibilização letal por laser (LLP) ou terapia fotodinâmica (SPIKES & JORI, 1987; MALIK *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1992; BRATTI *et al.*, 1997; ROSENFELD *et al.*, 1998; KIRILL *et al.*, 2000). Nessa terapia, a luz emitida por um laser terapêutico ativa um fotossensibilizador específico que passa então a demonstrar um efeito letal sobre as bactérias (STRINGER *et al.*, 1998).

Como a maioria das bactérias orais não absorve a luz visível, a utilização de um cromóforo não tóxico que se fixe à parede bacteriana atraindo

para si a luz laser no momento da irradiação é essencial para que os lasers terapêuticos tenham ação antimicrobiana sobre bactérias orais (WILLSON *et al.*, 1992; WILSON, 1993). Desse modo, quando as bactérias são irradiadas por uma luz laser de comprimento de onda complementar, ocorre a absorção de fótons pelo corante, que é convertido para um estado excitado. A seguir, a energia transferida para as moléculas vizinhas pode resultar na formação de moléculas reativas como o oxigênio singleto, íons superóxidos, hidroxilas e outros radicais livres que podem danificar e, em último caso, matar as células bacterianas (SPIKES & JORI, 1987; MACROBERT *et al.*, 1989; MALIK *et al.*, 1990; DOBSON & WILSON, 1992; WILSON *et al.*, 1993a; BRATTI *et al.*, 1997).

Desde que a terapia fotodinâmica idealizada para o tratamento do câncer foi adaptada para o uso sobre bactérias, vários estudos foram desenvolvidos associando diferentes fotossensibilizadores a lasers de baixa potência com comprimentos de onda diferentes (BERTOLINI *et al.*, 1990, DOBSON & WILSON, 1992; WILSON *et al.*, 1992; BURNS *et al.*, 1994; ROSENFELD *et al.*, 1998). O corante funciona como um agente de absorção óptica ou cromóforo, sendo essencial o uso de um corante adequado ao comprimento de onda do laser utilizado, bem como assegurar que o corante não apresente danos tóxicos ou irritantes aos tecidos (WALSH, 1997).

O fato do fotossensibilizador não precisar ser mantido em altas concentrações na área infectada por longos períodos de tempo pode tornar a terapia fotodinâmica vantajosa para a obtenção de efeito antimicrobiano. Isso

porque, contrariamente ao que ocorre com o uso de anti-sépticos e antibióticos, o efeito antimicrobiano é obtido em tempos relativamente curtos de tempo tornando o aparecimento de bactérias resistentes improvável (MALIK *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1995).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microbiota associada à cárie dental

Um ecossistema é constituído de uma comunidade de microrganismos vivendo em um ambiente envolvido por fatores abióticos tais como elementos físicos e químicos, de modo que o ecossistema bucal pode ser caracterizado pela presença de microrganismos dentro da cavidade bucal (THEILADE, 1990). Embora essa cavidade seja um ambiente úmido com uma temperatura relativamente constante (34°C a 36°C) e um pH próximo da neutralidade na maioria dos seus nichos, ela não pode ser considerada um ambiente uniforme. Existem diferentes ambientes na cavidade bucal, caracterizados pela presença de fatores físico-químicos específicos que suportam o crescimento de uma variedade de espécies de microrganismos (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

A microbiota bucal dos humanos é altamente complexa e diversa, sendo caracterizada pela presença de cerca de 300 espécies bacterianas além de protozoários, fungos, micoplasmas e vírus. A diversidade anatômica existente na cavidade bucal e a interdependência entre as diferentes estruturas anatômicas é particularmente interessante. Os dentes são estruturas sólidas que oferecem sítios de colonização para os microrganismos tanto na região supragengival como na região subgengival. Em contraste, as superfícies mucosas são caracterizadas pela constante descamação promovendo a rápida eliminação das bactérias aderidas (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

A formação do biofilme dental representa um bom exemplo das forças envolvidas na manutenção da homeostase dos ecossistemas orais. Após a limpeza profissional da superfície dental, inicia-se a deposição de uma camada acelular denominada película adquirida (NYVAD, 1993). Os principais constituintes da película são componentes originários da saliva e do fluido gengival como proteínas, glicoproteínas e lipídios além de componentes bacterianos como as glicosiltransferases (MARCOTTE & LAVOIE, 1998). A colonização bacteriana da película adquirida ocorre aproximadamente 2 - 4 horas após a limpeza profissional (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995).

Os microrganismos pioneiros na colonização da película adquirida são os *Streptococcus* (*S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis*) e em proporções menores *Neisseria* e *Actinomyces*. Neste momento, as bactérias com pouca ou nenhuma afinidade pela película são eliminadas pelo fluxo salivar, sendo que interações moleculares entre as proteínas da película e a superfície bacteriana são responsáveis pela especificidade da colonização bacteriana nos primeiros estágios de formação do biofilme dental (GIBBONS & HAY, 1988). Após a colonização inicial, os microrganismos pioneiros crescem rapidamente formando colônias que ficam embebidas em uma matriz extracelular composta por componentes de origem salivar e bacteriano (BOWDEN & EDWARDSSON, 1995). A seguir, relações interbacterianas como coagregação, produção de bacteriocinas e interações nutricionais contribuem para o aumento da diversidade bacteriana até atingir uma comunidade clímax em duas ou três semanas. O surgimento de

doenças neste ambiente só ocorre quando há um desequilíbrio no ecossistema do biofilme bacteriano. Assim, um aumento significativo na frequência e consumo de sacarose pode favorecer o desenvolvimento de espécies sacarolíticas acidúricas e acidogênicas como estreptococos grupo mutans e lactobacilos (CHALLACOMBE, 1980; MARSH, 1994; MARCOTTE & LAVOIE, 1998), favorecendo a desmineralização do esmalte dental (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995).

A desmineralização das estruturas dentais como o esmalte, dentina e cemento é causada pelos ácidos produzidos por bactérias cariogênicas a partir da fermentação de carboidratos provindos da dieta. O consumo freqüente de carboidratos favorece a diminuição do pH no ambiente bucal. Caso o pH crítico para a solubilização da hidroxiapatita ou fluorapatita seja atingido, o processo de desmineralização se inicia e se não for controlado pode levar ao surgimento de lesões de cárie (CURY, 2001).

A complexidade da comunidade bacteriana que coloniza a placa dental tem dificultado a determinação das bactérias que atuam no aparecimento das lesões cariosas. Entretanto, há evidências consideráveis de que os estreptococos grupo mutans (particularmente *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus*) e os lactobacilos estejam envolvidos no início e progressão da cárie (LOESCHE, 1986). Estudos longitudinais revelaram que o aparecimento de cáries de esmalte é precedido por um aumento no número de estreptococos grupo mutans (NYVAD, 1993; MARCOTTE & LAVOIE, 1998), embora um alto índice de *S. mutans* possa ser encontrado na placa dental sem evidência de cáries (NYVAD, 1993). Os

lactobacilos, por não terem capacidade de aderir à superfície dental, estão relacionados somente com o desenvolvimento subsequente da cárie (HAMADA & SLADE, 1980), sendo encontrados quando a lesão pode ser detectada clinicamente (BURT *et al.*, 1985; KRASSE, 1988). Outras bactérias da placa dental, como *S. sanguinis* e *Actinomyces*, não parecem estar relacionadas com tais processos, mas é claro que certa proporção das lesões cariosas pode ser devida a outras espécies que não o *S. mutans* e o *S. sobrinus* (RUSSEL & JOHNSON, 1987).

Assim, a cárie dental é uma doença caracterizada pela destruição localizada e progressiva dos tecidos duros do dente e está intimamente associada com a microbiota residente do biofilme dental (MARSH & MARTIN, 1992). Após a desmineralização do esmalte, a lesão progride lentamente em direção à dentina sendo caracterizada por uma área de dentina amplamente desmineralizada sob uma zona parcialmente desmineralizada infectada com bactérias (BURNS *et al.*, 1994).

Clinicamente, a diferenciação entre essas zonas e a remoção apenas da dentina contaminada é extremamente crítica, de maneira que grande quantidade de tecido sadio desmineralizado é removido durante o preparo cavitário (BURNS *et al.*, 1994). O uso de corantes tem sido recomendado para marcar as bactérias facilitando a remoção apenas da dentina infectada pelos clínicos. No entanto, de modo geral, o tratamento de lesões de cárie envolve a remoção de tecido sadio para ganhar acesso à lesão e permitir a remoção de

dentina desmineralizada infectada (WILSON *et al.*, 1995). Assim, seria interessante o desenvolvimento de uma terapia capaz de matar as bactérias favorecendo o prognóstico do elemento dental restaurado (BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995).

2.2. Luz laser

A luz laser é constituída por um feixe de luz com ondas paralelas, coerentes, monocromáticas e de mesma frequência, emitindo um único comprimento de onda de luz. Os lasers situam-se em diferentes níveis do espectro das radiações eletromagnéticas de acordo com o comprimento de onda que emitem; o que é determinado pelo meio ativo que constitui o aparelho e pela diferença de energia entre órbitas de partida e chegada dos elétrons (TÚNER & HODE, 1996).

Embora o laser seja uma forma de luz utilizada em diversas áreas na atualidade, incluindo a tecnologia aeroespacial, a área médica e odontológica, o uso terapêutico da luz vem sendo descrito desde os primórdios das civilizações. PINHEIRO (1998) cita os egípcios como sendo o primeiro povo a buscar a cura de lesões dermatológicas através da luz no ano de 2000 a.C. Por volta de 1400 a.C., relatos descrevem que alguns povos da Índia utilizavam uma pomada natural capaz de absorver luz solar para promover um efeito fotoquímico terapêutico no tratamento do vitiligo (MISERANDINO & PICK, 1995).

No entanto, a idealização teórica do desenvolvimento da luz laser só surgiu em 1917, quando baseado na teoria quântica de Planck (1900), Albert Einstein publicou o tratado “Zur Quantum Theorie der Strahlung” no qual discutia as relações entre a quantidade de energia liberada nos processos atômicos e propunha a emissão estimulada de radiação (EINSTEIN, 1917).

Em 1955, GORDON *et al.* construíram o primeiro oscilador gama de ondas, chamado de M.A.S.E.R. (Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation), sendo considerado um pré-laser. Nos anos seguintes, trabalhos desenvolvidos simultaneamente por cientistas americanos e russos demonstraram a possibilidade de construção de um laser, rendendo aos pesquisadores o Prêmio Nobel de Física em 1964.

A construção do primeiro laser relatado na literatura é devida a MAIMAN (1960), utilizando um meio ativo sólido de rubi localizado na faixa visível do espectro eletromagnético da luz. Em 1961, JAVAN *et al.* desenvolveram o primeiro laser de baixa potência de Hélio-Neônio (HeNe) e no mesmo ano JOHNSON (1961) construiu o laser de alta potência de Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada (Nd:YAG). O laser de Dióxido de Carbono (CO₂) só foi desenvolvido por PATEL *et al.* em 1964.

Os primeiros relatos sobre o uso do laser em odontologia remontam de 1964 onde STERN & SOANNAES irradiaram esmalte e dentina com um laser de rubi a fim de observar a redução da permeabilidade dentinária e melhorar a

resistência à desmineralização do esmalte dental. Estudos de ADRIAN *et al.* (1971), onde os autores demonstraram que o laser de rubi era nocivo aos tecidos pulpaes devido a grande quantidade de calor gerado durante a irradiação, o que gerava danos pulpaes irreversíveis. Mais tarde, o médico Leon Goldman foi o primeiro pesquisador a tratar um dente vital com um laser de rubi. Nessa experiência, seu irmão e cirurgião-dentista não se queixou de dor durante ou após a irradiação da coroa dental. Assim, o primeiro tratamento odontológico com laser foi realizado por um médico, tendo como paciente um cirurgião-dentista (BRUGNERA JUNIOR & PINHEIRO 1998).

LONGO (1988) descreve os lasers como equipamentos capazes de levar grandes quantidades de energia aos tecidos irradiados, com extrema precisão e interagindo com os tecidos de forma particular. Os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos: os lasers cirúrgicos, ou que operam em alta potência e os lasers não-cirúrgicos, também conhecidos como lasers terapêuticos ou que operam em baixa potência (TÚNER & HODE, 1996).

O efeito dos lasers geradores de calor como os lasers cirúrgicos de CO₂ e ND:YAG na destruição das bactérias é conhecido na esterilização de bolsas periodontais (BAHCALL *et al.*, 1992; ROONEY *et al.*, 1994; ANDO *et al.*, 1996; GUTKNECHT *et al.*, 1996; MORITZ *et al.*, 1997), remoção de cálculos dentais e condicionamento radicular (WHITE *et al.*, 1991; MORLOCK *et al.*, 1992; ITO *et al.*, 1993; WHITE *et al.*, 1993; TEWFIK *et al.*, 1994; RADVAR *et al.*, 1995; ANDO *et al.*, 1996; TUCKER *et al.*, 1996, MORITZ, 1998), limpeza e selamento de canais

radiculares (ZAKARIENSEN, *et al.*, 1986; DEDERICH *et al.*, 1990) e esterilização de instrumentais e implantes de titânio (ADRIAN & GROSS, 1979; ZAKARIENSEN, *et al.*, 1986; DEDERICH *et al.*, 1990; KATO *et al.*, 1998). Em geral esses lasers requerem elevadas dosagens de energia e atingem a superfície irradiada com altas temperaturas promovendo uma esterilização local por ação térmica, ao contrário do que ocorre no uso de lasers de baixa potência (ADRIAN & GROSS, 1979; ZAKARIASEN *et al.*, 1986; WALSH, 1997; KATO *et al.*, 1998).

Os lasers de baixa potência têm como finalidade restabelecer o equilíbrio biológico celular melhorando as condições de vitalidade tecidual. Assim, esses lasers são reconhecidos por sua ação analgésica, biomoduladora e antiinflamatória sobre tecidos duros e moles produzido por efeitos fotoquímicos e fotoelétricos ao invés de efeitos térmicos (BRUGNERA JUNIOR *et al.*, 1991).

A ação dos lasers de baixa potência sobre os tecidos do hospedeiro pode ser didaticamente dividida em: a) efeitos analgésicos com a diminuição de substâncias alógenas presentes em processos inflamatórios, normalização das concentrações iônicas intra e extracelulares, ação na repolarização da membrana, aumento da vitalidade celular, restabelecimento das funções normais, além de aumentar a produção de beta endorfinas por ação nas fibras espessas bloqueando as fibras neurais finas, causando analgesia; b) efeitos antiinflamatórios causando vasocronstrição, normalização da parede dos vasos, diminuição do edema e ativação dos mecanismos naturais de defesa; c) efeito biomodulador aumentando a concentração de ATP (adenosina tri-fosfato) nas

mitocôndrias, elevando a atividade mitótica e a síntese protéica, facilitando desse modo a regeneração vascular e nervosa (TUNÉR & HODE, 1996; BRUGNERA JUNIOR & PINHEIRO, 1998).

A ação antimicrobiana dos lasers de baixa potência só começou a ser efetivamente estudada na última década. A idealização de uma terapia bactericida onde a luz de um laser induzisse à morte de bactérias previamente sensibilizadas com um agente cromóforo provém da terapia fotodinâmica desenvolvida para o tratamento do câncer (SPIKES & JORI, 1987; MALIK *et al.*, 1990). Nesta terapia, as células cancerígenas são marcadas com um fotossensibilizador específico e irradiadas tendo como objetivo matar células mamárias malignas, sendo empregada no tratamento de vários tumores em humanos (SPIKES & JORI, 1987; DOUGHERTY *et al.*, 1990).

2.3. Ação antimicrobiana dos lasers de baixa potência

Para que a luz exerça algum efeito sobre as células bacterianas, primeiramente ela deve ser absorvida por um ou mais constituintes da bactéria. Luzes com comprimento de onda menores que 300 nm (espectro ultravioleta da luz) são absorvidas por proteínas e ácidos nucléicos, o que pode resultar em morte principalmente devido a alterações na estrutura do DNA. Desse modo, devido ao seu potencial mutagênico, comprimentos de onda situados no espectro ultravioleta da luz são impróprios para o tratamento de doenças infecciosas em humanos (WILSON, 1993).

Com relação à absorção da luz com comprimentos de onda maiores, algumas bactérias contêm componentes celulares que absorvem luzes com comprimentos de onda no espectro visível, podendo gerar a morte da célula. Durante esse processo conhecido como fotossensibilização letal por laser ou terapia fotodinâmica, componentes fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar, que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de oxigênio singleto altamente reativo (fotoprocesso Tipo II) ou interagir com outras moléculas como aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxila e outros radicais orgânicos (fotoprocesso do Tipo I) (MACROBERT *et al.*, 1989). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem então danificar componentes essenciais das células como a membrana citoplasmática por disrupção ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível, resultando na morte bacteriana (SPIKES & JORI, 1987; MALIK *et al.*, 1990; BRATTI *et al.*, 1997).

O resultado da interação entre a luz laser e a célula bacteriana depende do comprimento de onda da luz, da potência do aparelho, do tempo de irradiação, do diâmetro da sonda, se a luz é emitida de modo contínuo ou pulsátil e se a irradiação é feita com o laser no modo focado ou desfocado (WILSON, 1993; BRUGNERA JUNIOR JUNIOR & PINHEIRO, 1998). Fatores bacterianos também podem interferir nos resultados, principalmente no que diz respeito às

características fisiológicas da célula bacteriana, o estágio de crescimento em que ela se encontra e a densidade de células na suspensão. Entretanto, embora todos esses parâmetros sejam controlados, pequenas variações são inevitáveis, devendo ser consideradas na análise dos resultados (WILSON & MIA, 1993).

Como a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes especiais com capacidade de absorção significativa pela luz visível, a utilização de um fotossensibilizador que atraia para si a luz laser e inicie a formação de radicais livres é importante (WILSON *et al.*, 1992). Assim células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com fotossensibilizadores ou agentes cromóforos exógenos como o azul de metileno, azul de toluidina, rosa bengal, eosina e hematoporfirinas (WILSON, 1993).

No entanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Outros requisitos importantes são que ele não apresente características tóxicas para as células do hospedeiro além de permanecer em estado excitado por tempo suficiente para permitir a sua interação com as moléculas vizinhas e produzir espécies citotóxicas capazes de causar a morte bacteriana (MACROBERT *et al.*, 1989).

Os únicos relatos do efeito bactericida de luzes incoerentes sobre bactérias remontam de MATHEWS & SISTRON (1960), onde os autores relataram

que espécies mutantes incolores de *Sarcina lutea* podiam ser mortas por uma luz policromática de tungstênio e lâmpadas fluorescentes quando previamente sensibilizadas com o azul de toluidina enquanto que VENEZIO *et al.* (1985) demonstraram que *S. mutans* tratados com hematoporfirinas podiam ser mortos com 20 minutos de irradiação com a luz de uma lâmpada de projetor de 300 W.

No entanto, a grande maioria dos trabalhos utiliza lasers de baixa potência na terapia fotodinâmica. MACMILLAN *et al.* (1966) relataram que espécies Gram-positivas (*S. lutea*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) podem ser mortas por um laser de HeNe com comprimento de onda de 632,8 nm quando sensibilizadas com o azul de toluidina com pico de absorção máximo em 632 nm.

Em 1975, TAKAHASHI *et al.* demonstraram a importância do uso de um corante com pico de absorbância próximo ou idêntico ao com comprimento de onda da luz laser. Em seu estudo, o azul de toluidina não produziu efeitos danosos sobre *E. coli* quando irradiada com uma luz de comprimento de onda de 590 nm, já que o azul de toluidina possui pouca ou nenhuma absorção por luzes com esse comprimento de onda.

BERTOLONI *et al.* (1984) encontraram que espécies Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*) podiam ser mortas pela luz branca na presença de hematoporfirina, mas os mesmos resultados não foram encontrados para espécies Gram-negativas (*E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*).

MARTINETTO *et al.* (1986) usando hematoporfirina como fotossensibilizador encontraram efeito letal do laser HeNe sobre *S. aureus* e *E. coli*.

Em 1994, WILSON & YIANNI avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de cepas de *S. aureus* resistentes à metilicina. O laser utilizado foi um HeNe com 35 mW com uma dose de energia variando entre 0,5 a 2,1 J, associado ao corante azul de toluidina O (TBO) em diferentes concentrações (1,6-12,5 µg/mL). Os resultados demonstraram que a redução no número de microrganismos viáveis é dependente tanto da concentração do corante quanto da densidade de energia depositada. Uma redução de 4,47 log₁₀ na contagem de *S. aureus* foi observada quando o corante azul de toluidina O (12,5 µg/mL) estava associado a uma dose de energia de 2,1 J correspondendo a uma densidade de energia de 43 J/cm².

Em 1997, GRIFFITHS *et al.* fizeram um estudo semelhante com 16 cepas de *S. aureus* resistentes à metilicina. No entanto, o laser utilizado era um diodo de índio-gálio-alumínio-fosforo com comprimento de onda de 673 nm e potência de 9,25 mW. O fotossensibilizador utilizado foi o alumínio dissulfonado fitalocianino (AlPcS₂) com pico de absorção máximo em 675 nm e os resultados demonstraram que o efeito bactericida era dependente da concentração do fotossensibilizador e diretamente proporcional ao aumento da dose de energia. Além disso, os autores não observaram relação direta entre a quantidade de mortes e a fase de crescimento em que os microrganismos se encontravam.

MILLSON *et al.* (1996) estudaram o efeito da fotossensibilização letal por laser sobre *H. pylori*, uma bactéria constantemente associada a desordens gastrointestinais. Neste estudo, suspensões de *Helicobacter pylori* foram sensibilizadas com diferentes fotossensibilizadores e irradiadas com um laser de arseneto-gálio-alumínio (ArGaAl) de 660 nm e 11 mW com uma densidade de potência de 17 mW/cm². Outro grupo foi irradiado com um laser HeNe de 632,8 nm e densidade de potência de 500 mW/cm². Embora o cristal de violeta e a tionina tenham sido ineficazes como fotossensibilizadores, zonas de inibição de crescimento foram encontradas para o azul de metileno, a fotoporfirina, o derivado da hematoporfirina, o azul de toluidina O e o AlPcS₂ associados ao laser de comprimento de onda complementar.

Os primeiros relatos da utilização da fotossensibilização letal por laser sobre bactérias orais foram realizados por WILSON *et al.* (1992). Neste estudo os autores testaram 27 compostos como fotossensibilizadores observando que 16 deles tinham capacidade de matar *S. sanguinis* quando associados ao laser HeNe com potência de 7,3 mW. Os mais efetivos eram o azul de toluidina O, azul de metileno, AlPcS₂, o cristal de violeta e a dihematoporfirina éster (DHE). O efeito da terapia sobre a viabilidade dos microrganismos foi testado com densidades de energia variando entre 2,75 a 33 J/cm² obtidos a partir da irradiação com tempos de exposição variando de 5 a 60 segundos. Neste mesmo estudo, TBO e azul de metileno foram efetivos na redução de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* com os fotossensibilizadores

na concentração de 50 µg/mL e densidade de energia de 16,5 J/cm². Em todos os casos, o uso do corante na ausência da luz laser não apresentou efeito significativo sobre a viabilidade dos microrganismos testados.

No mesmo ano, DOBSON & WILSON (1992) estudaram a ação do laser HeNe com 7,3 mW de potência associado ao azul de toluidina O ou azul de metileno sobre *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *S. sanguinis*. Neste estudo, os microrganismos eram irradiados após o espalhamento das bactérias sobre placas de meio de cultura. A redução no número de microrganismos, demonstrada pelo o aparecimento de zonas de inibição de crescimento, foram encontradas para os quatro microrganismos com os corantes na concentração de 0,005% e densidade de energia de 16,5 J/cm².

Estudos quantitativos sobre o efeito bactericida de *S. sanguinis* sensibilizados com TBO, azul de metileno ou tionina associados ao laser HeNe com 7,3 mW foram particularmente efetivos. Reduções na quantidade de microrganismos na ordem de 10⁶ a 10⁷ unidades formadoras de colônia (UFC) em relação aos controles foram obtidas com uma densidade de energia de 22 J/cm² (WILSON *et al.* 1993a). Resultados semelhantes foram encontrados para *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* utilizando o mesmo laser e densidade de energia quando associado ao TBO ou ao azul de metileno (WILSON *et al.*, 1993b).

BURNS *et al.* (1993) verificaram que bactérias cariogênicas também podem ser mortas por lasers de baixa potência associados a fotossensibilizadores específicos. Neste estudo os autores observaram que *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus* eram sensíveis a exposição a um laser de HeNe de 7,3 mW e ao laser de arseneto-gálio-alumínio com 11 mW quando associados aos fotossensibilizadores azul de toluidina O e alumínio disulfonado fitalocianino, respectivamente.

A ação da terapia fotodinâmica sobre bactérias associadas a doença periodontal foi estudada por SARKAR & WILSON em 1993, onde os autores utilizaram amostras de placa bacteriana de 20 pacientes com periodontite crônica. A redução significativa no número e tipos de espécies encontradas foram observados com um laser HeNe de 7,3 mW gerando uma dose de 219 mJ e uma densidade de energia de 16,5 J/cm², quando associado ao corante azul de toluidina O (50 µg/mL). A redução média na contagem de bactérias aeróbias, anaeróbias e estreptococos viáveis foi de 90% sendo observada redução total de crescimento para *P. gingivalis* e 90% de redução nas bactérias anaeróbicas produtoras de pigmento negro em todos os pacientes onde eram detectáveis.

WILSON & MIA (1993) estudaram o efeito do laser HeNe 7,3 mW associado ao cristal de violeta, azul de toluidina O, DHE e tionina, além do efeito do laser de arseneto-gálio-alumínio de 11 mW associado ao azul de metileno e ao AlPcS₂ sobre *Candida albicans*. Esses microrganismos são encontrados principalmente na cavidade bucal de pacientes imunodeprimidos. Reduções nas

contagens de *C. albicans* foram encontrados na utilização do laser HeNe com densidade de energia de 66 J/cm^2 associado ao corante azul de toluidina O ($100 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Além disso, os autores observaram redução de 20% na quantidade de microrganismos viáveis na presença do corante mesmo na ausência da luz laser.

No entanto, resultados diferentes foram encontrados por PINHEIRO *et al.* (1999) estudando os efeitos da irradiação dos lasers diodos de 635 e 670 nm sobre o crescimento de *C. albicans* com densidade de energia de $1,5 \text{ J/cm}^2$ quando irradiadas na presença e na ausência de outra fonte de luz artificial. Os autores observaram que as culturas irradiadas apresentaram maior crescimento do que os controles para os dois comprimentos de onda testados, sendo que esse crescimento foi maior nos grupos irradiados no escuro. Embora o maior crescimento tenha sido observado para as culturas irradiadas com o laser 635 nm, os resultados demonstraram que a irradiação *C. albicans* com o laser diodo na ausência de um fotossensibilizador específico promove a proliferação desse microrganismo nas condições testadas.

BURNS *et al.* (1994) estudaram a sensibilização de bactérias cariogênicas com AlPcS_2 associado ao laser diodo de arseneto-gálio-alumínio sobre bactérias cariogênicas. Reduções de aproximadamente 10^6 UFC foram encontradas para *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *A. viscosus* com a terapia fotodinâmica, não sendo encontrada efeito significativo na viabilidade das bactérias quando elas foram expostas somente ao laser ou ao fotossensibilizador.

BURNS *et al.* (1995) também estudaram o efeito do laser HeNe e de ArGaAl associados aos fotossensibilizadores azul de toluidina O e AIPcS₂ sobre suspensões de *S. mutans* em dentina humana. Quando fatias de dentina com vários graus de desmineralização estavam interpostos entre a luz laser e a suspensão bacteriana, um efeito bactericida da ordem de 10⁷ UFC foi encontrado com uma dose de energia de 876, 1.752 e 3.504 mJ para o laser HeNe e de 1.188, 2.376 e 4.752 mJ para o laser ArGaAl. Os resultados deste estudo sugeriram não haver relação entre a proporção de morte bacteriana e o grau de desmineralização da dentina ao passo que maiores doses de energia promoviam um aumento na proporção de mortes. Quando os microrganismos estavam embebidos em uma matriz de colágeno no momento da irradiação a redução no número de microrganismos (10⁸ até 10¹⁰ UFC) foi observada com doses de energia de 438 e 1.314 mJ para o laser HeNe e 594 e 1.782 mJ para o laser ArGaAl; concluindo que a terapia fotodinâmica pode ser efetiva sobre *S. mutans* mesmo quando as bactérias estão embebidas em dentina desmineralizada.

Neste mesmo ano, WILSON *et al.* (1995) realizaram um estudo a fim de avaliar se bactérias presentes na placa bacteriana podiam ser mortas pela terapia fotodinâmica. Para tanto, amostras de biofilme bacteriano coletados de 10 voluntários foram tratados com azul de toluidina O e laser HeHe ou AIPcS₂ e laser de arseneto-gálio (GaAs). Neste estudo a combinação TBO/HeNe foi mais efetiva do que AIPcS₂/GaAs com reduções de 2,9 log₁₀, 5,4 log₁₀ e 3,3 log₁₀ nas

contagens de bactérias anaeróbicas, estreptococos e *Actinomyces* respectivamente, com uma dose de energia de 1,31 J.

A fim de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre biofilmes organizados, WILSON *et al.* (1996) avaliaram quantitativamente o efeito dessa terapia sobre *S. sanguinis* utilizando um fermentador de fluxo contínuo alimentado por saliva artificial. Neste estudo, biofilmes foram crescidos durante quatro dias sobre discos de hidroxiapatita após o que foram retirados assepticamente do fermentador e sensibilizados com 8,0 μL de AIPcS₂ na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. A seguir, cada disco foi irradiado com doses de energia variando de 0,8 J a 12,2 J com um laser de arseneto-gálio-alumínio (densidade de energia variando de 4,1 J/cm² a 61,2 J/cm²). A presença do fotossensibilizador na ausência da luz laser ou da luz laser na ausência do fotossensibilizador não teve efeito significativo sobre a viabilidade do *S. sanguinis*. No entanto, uma diminuição gradativa no número de microrganismos viáveis foi encontrada com o aumento da dose de energia até atingir um efeito bactericida total com a dose de 12,2 J e densidade de energia de 61,2 J/cm².

HENRY *et al.* (1996) estudaram o efeito da fotossensibilização letal por laser sobre 18 microrganismos, sendo 6 bactérias produtoras de pigmento negro. A sensibilização das células bacterianas com um agente cromóforo exógeno não foi realizada a fim de observar a ação do pigmento negro endógeno produzido por essas bactérias como fotossensibilizador. O aparelho utilizado foi um laser de argônio com comprimento de onda de 488-514 nm e as densidades de energia

testadas variaram entre 20-200 J/cm². A análise dos resultados demonstrou que a irradiação do laser de argônio na ausência de um fotossensibilizador exógeno produziu efeitos fototóxicos sobre espécies de *Prevotellas* e *Porphyromonas*. Além disso, os autores demonstraram que esse efeito era influenciado pela fase de crescimento das células bacterianas, dependiam da presença de uma atmosfera de oxigênio e eram influenciados pela suplementação com hemina, hemoglobina e sangue.

No ano seguinte, BHATTI *et al.* (1998) avaliaram os efeitos da variação da dosimetria e de fatores fisiológicos na fotossensibilização letal por laser de *P. gingivalis*. O aparelho utilizado foi um laser de HeNe de 7,3 mW associado ao fotossensibilizador azul de toluidina O. Aspectos como a concentração do fotossensibilizador, o tempo de pré-irradiação, a presença do caldo nutriente ou sua substituição por soro fisiológico, o pH e a fase de crescimento das bactérias foram observados. O aumento na concentração do corante de 12,5 para 50 µg/mL não apresentou diferenças na viabilidade dos microrganismos e a dose de energia relacionada com o efeito bactericida total foi observada com 4,4 J correspondendo a uma densidade de energia de 2,2 J/cm². Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando as suspensões bacterianas apresentavam valores diferentes de pH (6,8, 7,3 ou 8,0) e os melhores resultados foram obtidos quando as células estavam em solução salina quando comparadas às presentes em caldo nutriente. Além disso, embora um número significativo de mortes tenha

sido encontrado com as células nas três fases de crescimento, as células na fase estacionária foram menos susceptíveis à terapia.

STRINGER *et al.* (1998) estudaram o efeito do azul de metileno associado a um laser diodo de 670 nm sobre a viabilidade de suspensões de *S. mutans* colocados sobre dentina humana. Neste estudo, os autores encontraram uma redução de 97,2% de crescimento bacteriano quando as fatias de dentina tinham sido cortadas verticalmente, a suspensão tinha sido sensibilizada com o azul de metileno na concentração de 100 µg/mL e tinha sido posteriormente irradiada com o laser diodo de 670 nm e 7 mW por 240 segundos, correspondendo a uma densidade de energia de 8,57 J/cm².

Mais recentemente, alguns estudos têm surgido a fim de estudar o efeito da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de microrganismos presentes no biofilme dental produzido *in vivo*. Com esse propósito, WOOD *et al.* (1999) fizeram um estudo qualitativo do efeito dessa terapia sobre biofilmes formados na cavidade bucal de voluntários saudáveis utilizando um modelo *in situ* que mantinha o biofilme formado intacto. Assim, os dispositivos intra-orais contendo os biofilmes com sete dias de formação eram retirados da cavidade bucal dos voluntários, mergulhados no fotossensibilizador catiônico Zn(II) fitalocianino e irradiados com uma luz branca. A microscopia confocal de varredura demonstrou a penetração do fotossensibilizador no interior do biofilme e a morte significativa das bactérias após a terapia. A microscopia de transmissão de elétrons

demonstrou que as células presentes no biofilme sofreram danos após o tratamento com a vacuolização do citoplasma e rompimento da membrana celular.

WILSON (1993) descreve as vantagens dessa técnica em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos. Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos improvável. Finalmente, o uso do fotossensibilizador ou da luz laser sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica.

Assim, a análise da literatura demonstrou que a fotossensibilização letal por laser pode ser uma terapia efetiva para redução de bactérias orais. No entanto, outros estudos ainda devem ser desenvolvidos a fim de tornar essa terapia aplicável *in vivo*.

3. PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram:

- avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano do laser diodo com comprimento de onda 660 nm associado ao fotossensibilizador azul de toluidina O sobre microrganismos bucais e *pool* de saliva humana;
- avaliar a ação antimicrobiana dessa terapia em biofilmes bacterianos formados *in situ*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Este estudo constituiu-se de duas fases, a saber:

- Fase I: Estudo *in vitro*

- determinação da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica (sensibilização das células bacterianas com o corante azul de toluidina O na concentração de 100 µg/mL seguido da irradiação com o laser diodo de 660 nm com densidade de energia de 28,8 J/cm²) sobre bactérias bucais e *pool* de saliva humana;

- avaliação da presença de halo de inibição de crescimento após a exposição de suspensões de microrganismos à terapia fotodinâmica.

- Fase II: Estudo *in situ*

- avaliação da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre microrganismos bucais crescidos sobre blocos de esmalte dental humano *in situ*.

Para a realização da Fase I desse trabalho, foram obtidas suspensões de microrganismos com 18 horas de crescimento e *pool* de saliva humana de dez voluntários. A fim de observar o efeito da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade dos microrganismos, o material foi submetido ao tratamento com azul de toluidina

O (100 µg/mL) seguido da irradiação com um laser diodo de 660 nm com uma densidade de energia de 28,8 J/cm². Todos os experimentos foram feitos em triplicata, sendo realizadas três repetições para cada condição experimental.

Para a realização da Fase II desse trabalho, vinte e quatro blocos de esmalte dental foram confeccionados a partir de oito terceiros molares humanos retidos. Doze voluntários utilizaram dispositivos intra-bucais palatinos contendo dois blocos de esmalte dental inseridos no acrílico do aparelho durante uma fase de quatorze dias. Uma solução de sacarose a 20% foi gotejada oito vezes ao dia sobre cada bloco a fim de favorecer o acúmulo do biofilme bacteriano. Ao final do período experimental, o biofilme dental foi coletado, submetido à terapia fotodinâmica e plaqueado em meios de cultura específicos para o crescimento de estreptococos totais, estreptococos grupo mutans, lactobacilos e candidas. O experimento foi realizado em triplicata sendo realizadas doze repetições correspondentes a cada um dos voluntários.

4.2. Padronização da técnica

4.2.1. Estudos pilotos

Antes do início dos procedimentos experimentais foi realizada a padronização da técnica. Nesta fase da pesquisa, estabeleceu-se primeiramente a melhor concentração do corante azul de toluidina O a ser utilizado em associação com o laser diodo de 660 nm, bem como a densidade de energia eficaz para obtenção de efeito antimicrobiano sobre microrganismos bucais. Nesse sentido,

estabeleceu-se a concentração do corante azul de toluidina O em 100 $\mu\text{g/mL}$ e a densidade de energia em 28,8 J/cm^2 , o que era obtido após 15 minutos de exposição dos microrganismos à luz laser. Testes para verificação da quantidade de luz transmitida nos meios de cultura utilizados estabeleceram o volume do inóculo em 50 μL a fim de minimizar as perdas de energia durante a irradiação. Posteriormente, avaliou-se o tempo de pré-irradiação (TPI) necessário para os microrganismos testados. O TPI é descrito na literatura como o tempo necessário para que o fotossensibilizador se ligue à bactéria alvo, possibilitando assim a obtenção de efeito antimicrobiano. Estudos pilotos testando tempo de pré-irradiação variando de 5 a 30 minutos não mostraram diferenças nos resultados obtidos, de modo que optou-se pelo TPI de 5 minutos a fim de facilitar o trabalho laboratorial e diminuir o risco de contaminação das amostras.

4.2.2. Laser e fotossensibilizador

Para a realização deste estudo utilizamos um laser diodo (DMC Equipamentos Ltda) com meio ativo de arseneto-gálio-alumínio (GaAlAs), comprimento de onda de 660 nanômetros (nm). A emissão da luz se deu de modo contínuo com potência de entrada na sonda de 21 mW (*input*), sonda de 0,8 cm de diâmetro com perda de 24% e potência de saída da sonda (*output*) de 16 mW (FIG. 1).

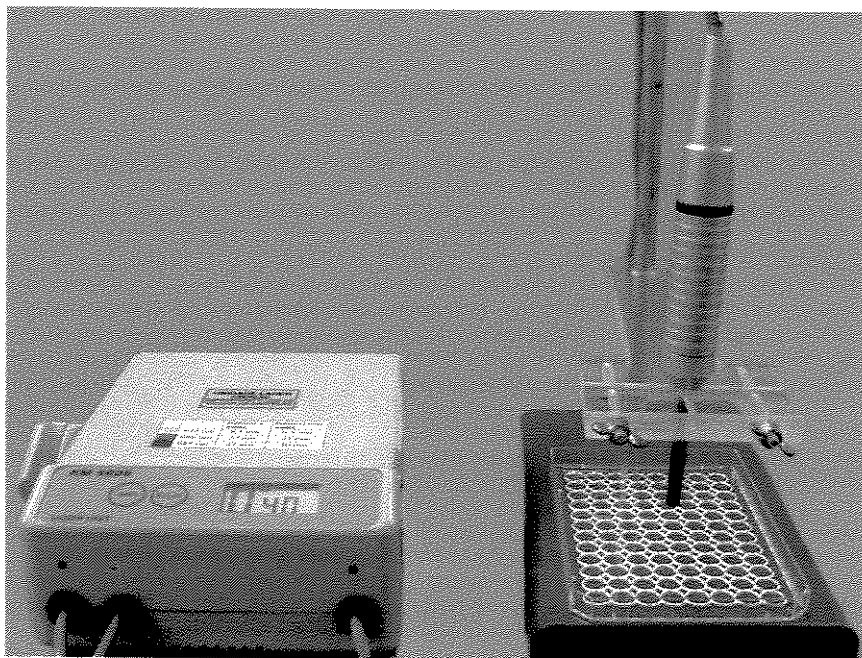


FIGURA 1 - Laser diodo 660 nm (DMC Equipamentos Ltda).

O fotossensibilizador utilizado foi o corante azul de toluidina O da Sigma, código internacional 52040 (FIG. 2). A irradiação das amostras foi feita com a sonda posicionada perpendicularmente à superfície da suspensão com uma densidade de energia de $28,8 \text{ J/cm}^2$, obtidos após uma única exposição de 900 segundos à luz laser. A densidade de energia foi calculada a partir da fórmula ilustrada a seguir;

$$DE = (P \times T) / A$$

DE= densidade de energia (J/cm^2)

P = potência (W)

A = área estimada (cm^2)

T = segundos



FIGURA 2 - Azul de toluidina O (Sigma – CI 52040).

4.3. Atividade antimicrobiana *in vitro*

4.3.1. Microrganismos e meios de cultura

Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Candida albicans* (sorotipo A), *Candida albicans* (sorotipo B), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus cricetus* (ATCC 19642), *Streptococcus mutans* (CCT 3440 e ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27607). Estes microrganismos foram reativados a partir de suas culturas originais (congelados a -70°C) em meio de cultura e condições adequadas a fim de obtermos as culturas com 18 horas de crescimento. Os meios de cultura e as condições de cultivo utilizadas foram:

- Candida: Sabouraud Dextrose Ágar, incubados a 37° C em aerobiose por 48 horas (ATLAS & PARKS, 1993).
- Lactobacilos: Rogosa Ágar, incubados a temperatura de 37°C, em atmosfera de 10% CO₂ por 24-48 horas (FROSTELL & NORD, 1972; ROGOSA *et al.*, 1951);
- Estreptococos: Mitis Salivarius Ágar (MSA), incubados a temperatura de 37°C, em atmosfera de 10% CO₂ por 24-48 horas (CHAPMAN, 1944).
- Estreptococos grupo mutans: Mitis Salivarius Bacitracina (MSB), incubados a temperatura de 37°C, em atmosfera de 10% CO₂ por 24-48 horas (GOLD *et al.*, 1973).

4.3.2. Obtenção das amostras da saliva

Saliva estimulada foi coletada de dez voluntários em jejum que apresentavam boa saúde geral e que não fizeram uso de medicação antibiótica ou imunossupressora nos últimos seis meses (KIVELA *et al.*, 1999). Os voluntários foram instruídos a mastigar um pedaço de goma base por 30 segundos. A saliva estimulada inicialmente foi deglutida e a seguir coletada em tubos com rosca estéreis durante três minutos (KLOCK & KRASSE, 1977). As amostras obtidas foram conservadas em gelo até serem manipuladas no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP – UNICAMP, onde o material foi misturado para a obtenção de um *pool* de saliva humana. A obtenção de um pool de saliva humana visou obter a maior quantidade

possível de espécies microbianas a serem submetidas à terapia fotodinâmica. Após a irradiação, o *pool* de saliva foi inoculado em MSA para a determinação da viabilidade de estreptococos totais (CHAPMAN, 1944) e MSB para a determinação da viabilidade de estreptococos grupo mutans (GOLD *et al.*, 1973).

4.3.3. Irradiação das suspensões

4.3.3.1. Contagem de microrganismos viáveis

Alíquotas de 500 µL de cada suspensão bacteriana ou de saliva foram adicionadas a um volume igual do corante azul de toluidina O a fim de obter uma concentração final do corante de 100 µg/mL (BURNS *et al.*, 1993; WILSON & MIA, 1993). As suspensões foram mantidas em estufa de 37°C durante um período de pré-irradiação (TPI) de 5 minutos. A seguir, alíquotas de 50 µL foram colocadas em placas de microtitulação contendo 96 poços e irradiadas com a luz do laser diodo com uma densidade de energia de 28,8 J/cm². Decorrido o tempo de irradiação, as suspensões foram diluídas em série decimal de 10⁻¹ a 10⁻⁶ em solução de NaCl 0,9% e a seguir foram inoculadas em meios de cultura contendo ágar e incubadas nas condições ideais descritas para cada microrganismo anteriormente (item 4.3.1.). Para a determinação da ação do corante isoladamente sobre a viabilidade das bactérias, alíquotas da mesma suspensão foram inoculadas nos meios de cultura sem serem expostas à luz laser. Como controles, 500 µL de cada suspensão bacteriana ou saliva foram adicionadas a um igual volume de solução salina e foram manipulados da mesma maneira descrita para

as amostras contendo o corante (MILLSON *et al.*, 1996; GRIFFITHS *et al.*, 1997). Todos os experimentos foram feitos em triplicata, sendo feitas três repetições para cada microrganismo. Após o período de incubação, os microrganismos viáveis foram contados em um contador de colônias digital e o número de unidades formadoras de colônia por mililitro de suspensão bacteriana ou de saliva (UFC mL⁻¹) foi determinado.

4.3.3.2. Halo de inibição de crescimento

Alíquotas de 500 µL de cada suspensão bacteriana foram adicionadas a um volume igual do corante azul de toluidina O a fim de obter uma concentração final do corante de 100 µg/mL (BURNS *et al.*, 1993; WILSON & MIA, 1993). As suspensões foram mantidas em estufa de 37°C durante um período de pré-irradiação (TPI) de 5 minutos após o que 500 µL foram espalhados sobre placas contendo meio de cultura com ágar, o excesso foi removido e as placas foram secas a 37°C por 1 hora (WILSON *et al.*, 1992; BURNS *et al.*, 1993;). A seguir, as placas foram irradiadas na sua porção central com uma densidade de energia de 28,8 J/cm² e foram incubadas nas condições ideais descritas anteriormente para cada microrganismo (item 4.3.1.). As regiões da placa não expostas à luz laser serviram para verificação da ação do corante isoladamente (MILLSON *et al.*, 1996). Como controles, 500 µL de cada suspensão bacteriana ou saliva foram adicionadas a um igual volume de solução salina e foram manipulados da mesma maneira descrita para as amostras contendo o corante. Todos os experimentos

foram feitos em triplicata, sendo feitas três repetições para cada microrganismo. Como a ação da luz laser concentra-se na área focada e parte da luz dissipa-se em torno da região irradiada, a medição do tamanho do halo não pode ser feita, já que é impossível determinar com precisão onde o halo de inibição de crescimento começa e onde ele termina. Assim, decorrido o tempo de incubação, as placas foram examinadas em lupa esterioscópica a fim de observarmos a presença ou ausência de zonas de inibição de crescimento.

4.4. Atividade antimicrobiana *in situ*

4.4.1. Grupo experimental

Para a realização deste estudo foram selecionados 12 voluntários, alunos dos cursos de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, de ambos os sexos, com idade variando entre 20 e 29 anos, que não estavam fazendo uso de medicação antibiótica ou imunossupressora. Após assinarem o termo de livre consentimento para participarem desta pesquisa, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP (parecer nº 65/2000 – anexo 1), os voluntários foram instruídos a utilizarem dispositivos intra-bucais palatinos contendo blocos de esmalte dental humano inseridos no acrílico do aparelho a fim de acumularem biofilme bacteriano sobre os mesmos.

4.4.2. Preparo dos blocos de esmalte

Para a realização deste estudo, oito terceiros molares retidos extraídos por razões clínicas foram coletados em consultórios odontológicos após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, parecer n 65/2000 (anexo 1). Os elementos dentais foram armazenados em formol 2% pH 7,0 durante 30 dias a fim de desinfetá-los (WHITE, 1987; CURY *et al*; 2000). Foram excluídos os dentes com fraturas e rachaduras. Os elementos dentais foram fixados em peças acrílicas e cortados com o auxílio de uma cortadeira elétrica e discos de diamante com a finalidade de obter 24 blocos de esmalte dental humano. Após o corte das raízes e da face oclusal, obteve-se um fragmento dental da porção central da coroa com 4 mm de espessura, o qual foi novamente fixado à peça acrílica e cortado para a obtenção de blocos dentais medindo 4 x 4 mm. O ajuste da dentina a fim de obter blocos planos foi feito com o auxílio da politriz em baixa velocidade e lixa de granulação 320 (Carbimet Paper Discs) sob refrigeração, deixando os blocos dentais com altura de 2 mm (FUSHIDA & CURY, 1999). A seguir, os blocos de esmalte foram lixados e polidos em politriz com lixas de granulação decrescente (granulação 600 por 30 segundos e granulação 1200 por três minutos). O polimento final foi feito com feltro e suspensão de diamante sem refrigeração durante três minutos.

A fim de evitar a interferência de resíduos da lixa da fase anterior na qualidade do polimento da fase seguinte, os blocos foram sonicados (Sonicador Vibra Cell, Sonics & Materials Inc 400 W) em água destilada e deionizada por três

minutos após cada polimento. Após o polimento final, os blocos foram sonicados imersos em uma solução detergente (Ultramet® Sonic Cleaning Solution) diluída na proporção de 1:20 em água destilada e deionizada por três minutos e mantidos em ambiente úmido até serem inseridos nos dispositivos intra-bucais palatinos (FUSHIDA & CURY, 1999).

4.4.3. Confeção dos dispositivos intra-bucais palatinos

Através de moldagem anatômica do arco superior dos voluntários foram confeccionados modelos em gesso pedra, a partir dos quais foram feitos dispositivos intra-bucais palatinos em resina acrílica onde dois blocos dentais foram fixados (FIG. 3).

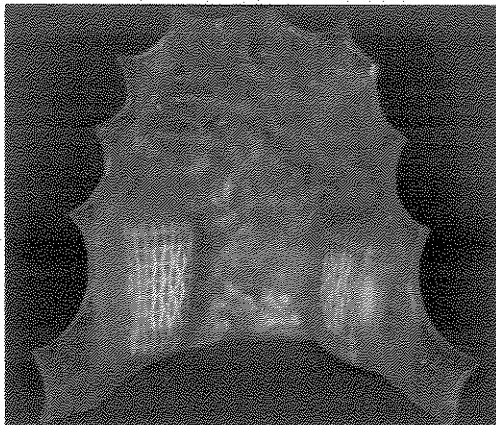


FIGURA 3 - Dispositivo intra-bucal.

Os blocos foram distribuídos bilateralmente na região dos primeiros molares do lado direito e esquerdo do aparelho de cada voluntário sendo posicionados a uma profundidade de um milímetro do acrílico do aparelho e

cobertos com tela plástica para favorecer o acúmulo do biofilme bacteriano nessa região (BENELLI *et al.*, 1993; WOOD *et al.*, 1999; CURY *et al.*, 2000) (FIG. 4).

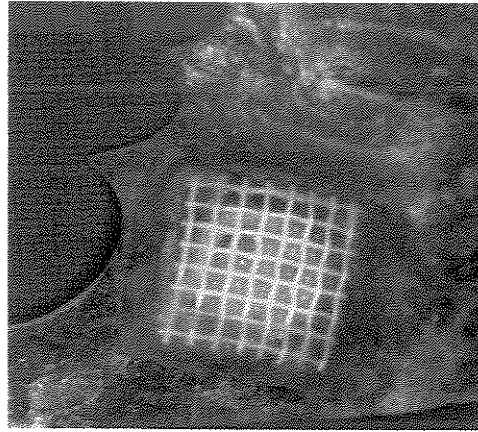


FIGURA 4 - Tela plástica recobrindo o bloco de esmalte dental.

4.4.4. Acúmulo do biofilme bacteriano

Os voluntários foram instruídos a utilizarem o dispositivo palatino durante uma fase de 14 dias sem higienizar o aparelho na região onde os blocos estavam inseridos. Uma solução de sacarose 20% era gotejada oito vezes ao dia sobre cada um dos blocos dentais a fim de promover a formação de um biofilme sob alto desafio cariogênico (CURY *et al.*, 1997). Durante a realização deste estudo os voluntários não alteraram seus hábitos alimentares, receberam instruções de higiene bucal e fizeram uso de pasta fluoretada. Decorridos os 14 dias, os voluntários compareceram em jejum ao laboratório de microbiologia para a coleta do material.

4.4.5. Irradiação dos microrganismos crescidos em biofilme bacteriano

No dia da coleta do material, o dispositivo intra-bucal palatino foi removido da cavidade bucal dos voluntários, a tela plástica foi retirada e o biofilme bacteriano acumulado sobre os blocos de esmalte foi coletado em *eppendorfs* pré-pesados a fim de obtermos a relação de unidades formadoras de colônia por miligrama de biofilme (UFC mg^{-1}) (FIG. 5, 6, e 7).

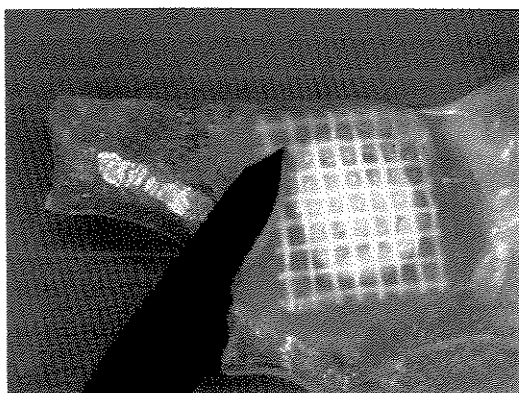


FIGURA 5: -Remoção da tela plástica.

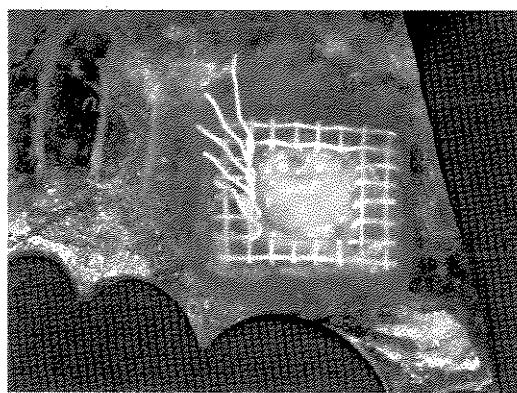


FIGURA 6 - Biofilme bacteriano acumulado após 14 dias.



FIGURA 7 - Coleta do biofilme bacteriano.

Após a pesagem do material, o biofilme foi colocado em 3 mL de solução salina 0,9% e o material foi sonificado (6 pulsos de 9,9 segundos com intervalos de 5 segundos entre eles, com amplitude de 5%. Tempo total de sonicação de 59 segundos) a fim de obtermos a dispersão das células (FIG. 8).



FIGURA 8 - Sonicador Vibra Cell, Sonics & Materials Inc 400 W.

A seguir, 500 μ L da suspensão foi adicionada a igual volume de azul de toluidina O a fim de obter uma concentração final do corante de 100 μ g/mL (BURNS *et al.*, 1993; WILSON & MIA, 1993) e deixadas em estufa a 37°C pelo período de pré-irradiação de 5 minutos, após o que alíquotas de 50 μ L foram colocadas em placas de microtitulação e irradiadas com a luz laser com uma densidade de energia de 28,8 J/cm².

Decorrido o tempo de irradiação, as suspensões foram diluídas em série decimal de 10^{-1} a 10^{-6} em solução de NaCl 0,9% e foram inoculadas em placas de petri contendo meios de cultura específicos para o crescimento de estreptococos totais, estreptococos grupo mutans, lactobacilos e candidas e foram incubadas em condições ideais. Para a determinação da ação do corante isoladamente sobre a viabilidade das bactérias, alíquotas da mesma suspensão foram inoculadas em placas de ágar sem serem expostas à luz laser. Como controles, 500 μ L do biofilme sonificado foram adicionadas a um igual volume de solução salina e foram manipulados da mesma maneira descrita para as amostras contendo o corante (MILLSON *et al.*, 1996; GRIFFITHS *et al.*, 1997). Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Decorrido o tempo de incubação, os microrganismos viáveis foram contados em um contador de colônias e o número de unidades formadoras de colônia por miligrama de biofilme (UFC mg^{-1}) foi determinado.

4.5. Análise estatística

A fim de promover a normalização dos dados, a análise estatística foi feita com os dados transformados em \log_{10} , embora a apresentação dos resultados tenha sido feita com os valores originais. Utilizou-se o esquema fatorial com dois fatores sendo: fator corante com dois níveis (sim e não) e fator laser com dois níveis (sim e não). Inicialmente fez-se a análise de variância utilizando o teste F ao nível de significância $p \leq 0,05$. A seguir, as médias foram comparadas duas a duas, fazendo-se todas as combinações possíveis, utilizando o teste t ao nível de

significância de $p \leq 0,05$. O programa estatístico utilizado para a realização das análises e para a confecção dos gráficos foi o SYSTAT 8.0 e o SIGMA PLOT, respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1. Atividade antimicrobiana *in vitro*

5.1.1. Suspensões bacterianas

Os resultados apresentados na TAB. 1 demonstram o número de unidades formadoras de colônias por mililitro de suspensão bacteriana (UFC mL⁻¹) de culturas de microrganismos com 18 horas de crescimento sensibilizadas com o corante azul de toluidina O na concentração de 100 µg/mL e submetidos à irradiação laser com a densidade de energia de 28,8 J/cm². Observou-se total inibição de crescimento na associação do laser e do corante para os seguintes microrganismos: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *L. acidophilus* e *L. casei*. A análise de variância em esquema de dois fatores (corante x laser) não apresentou diferença estatisticamente significativa para os tratamentos laser (C-L+), corante (C+L-) e ausência de corante e laser (C-L-). Entretanto, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas no teste t ($p < 0,05$) com a associação do corante e laser para esses microrganismos nos parâmetros testados.

A terapia fotodinâmica apresentou inibição parcial de crescimento para *S. sanguinis* sendo observada redução estatisticamente significativa no número de microrganismos de $2,01 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ no grupo não tratado para $6,60 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ no grupo tratado com laser e corante. As contagens para este microrganismo

relativas aos tratamentos laser (C-L+) e corante (C+L-), não diferiram estatisticamente do controle negativo (C-L-) pelo teste t ($p < 0,05$).

Candida albicans (sorotipo A) e *Candida albicans* (sorotipo B) não foram sensíveis à terapia fotodinâmica nos parâmetros testados, não sendo encontradas diferenças significativas nas contagens de microrganismos viáveis entre os tratamentos realizados.

TABELA 1

Contagem dos microrganismos viáveis após terem sido submetidos à terapia fotodinâmica. Valores expressos em UFC mL⁻¹.

Microrganismo	C-L-	C-L+	C+L-	C+L+
<i>S. mutans</i> CCT 3440	6,26 x 10 ⁹ ^a	3,17 x 10 ⁹ ^a	5,90 x 10 ⁹ ^a	0,0 ^b
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	1,60 x 10 ¹⁰ ^a	1,04 x 10 ¹⁰ ^a	1,90 x 10 ¹⁰ ^a	0,0 ^b
<i>S. sobrinus</i>	3,27 x 10 ⁷ ^a	5,41 x 10 ⁷ ^a	5,40 x 10 ⁷ ^a	0,0 ^b
<i>S. cricetus</i>	2,42 x 10 ⁹ ^a	5,97 x 10 ⁹ ^a	1,74 x 10 ⁹ ^a	0,0 ^b
<i>S. sanguinis</i>	2,01 x 10 ⁹ ^a	1,04 x 10 ⁹ ^a	1,48 x 10 ⁹ ^a	6,60 x 10 ⁴ ^b
<i>L. acidophilus</i>	6,65 x 10 ⁸ ^a	1,12 x 10 ⁹ ^a	5,19 x 10 ⁸ ^a	0,0 ^b
<i>L. casei</i>	1,21 x 10 ⁸ ^a	2,75 x 10 ⁸ ^a	1,55 x 10 ⁸ ^a	0,0 ^b
<i>C. albicans</i> (sorotipo A)	1,93 X 10 ⁷ ^a	3,47 x 10 ⁷ ^a	1,11 x 10 ⁷ ^a	7,81 x 10 ⁶ ^a
<i>C. albicans</i> (sorotipo B)	3,76 x 10 ⁷ ^a	1,23 x 10 ⁸ ^a	2,84 x 10 ⁷ ^a	1,44 x 10 ⁷ ^a

C-L- indica não exposição ao laser e ao corante, C-L+ indica exposição somente ao laser, C+L- indica exposição somente ao corante e C+L+ indica exposição ao corante e ao laser. Dados são médias de 3 repetições (n=3). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

5.1.2. *Pool* de saliva humana

Os resultados da aplicação da terapia fotodinâmica sobre microrganismos presentes na saliva humana estão apresentados na TAB. 2. Os dados representam as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹) de estreptococos totais e estreptococos grupo mutans por mililitro de um *pool* constituído pela saliva de dez voluntários saudáveis. Com relação aos estreptococos totais, observou-se uma inibição parcial de crescimento estatisticamente significativa, com reduções de $1,30 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ no grupo não tratado para $4,44 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ no grupo tratado com laser e corante. O efeito bactericida total, com redução de $6,02 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ para zero, foi observado para os estreptococos grupo mutans sob as mesmas condições experimentais. O uso do corante ou da luz laser isoladamente não apresentou diferença significativa sobre a viabilidade dos microrganismos.

TABELA 2

Contagem de estreptococos totais e estreptococos grupos mutans viáveis em *pool* de saliva submetida à terapia fotodinâmica. Valores expressos em UFC mL⁻¹.

Microrganismo	C-L-	C-L+	C+L-	C+L+
estreptococos totais	$1,30 \times 10^9$ ^a	$3,70 \times 10^8$ ^a	$7,06 \times 10^8$ ^a	$4,44 \times 10^4$ ^b
estreptococos grupo mutans	$6,02 \times 10^5$ ^a	$7,49 \times 10^5$ ^a	$4,01 \times 10^5$ ^a	0,0 ^b

C-L- indica não exposição ao laser e ao corante, C-L+ indica exposição somente ao laser, C+L- indica exposição somente ao corante e C+L+ indica exposição ao corante e ao laser. Dados são médias de 3 repetições (n=3). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste t (p<0,05).

5.1.3. Halo de inibição de crescimento de microrganismos

Os resultados apresentados na TAB. 3 demonstram presença ou ausência de halo de inibição de crescimento para suspensões de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *C. albicans* (sorotipo A) e *C. albicans* (sorotipo B); previamente sensibilizadas com o azul de toluidina O na concentração de 100 µg/mL e irradiadas com o laser diodo com densidade de energia de 28,8 J/cm². A presença de halo de inibição de crescimento foi observada para todos os estreptococos somente na associação do corante e da luz laser. A ausência de halo de inibição de crescimento foi observada para lactobacilos e candida em todas as condições experimentais testadas.

TABELA 3

Presença ou ausência de halo de inibição de crescimento.

Microrganismo	Halo de inibição de crescimento			
	C-L-	C-L+	C+L-	C+L+
<i>S. mutans</i> CCT 3440	-	-	-	+
<i>S. mutans</i> Ib 1600	-	-	-	+
<i>S. sobrinus</i>	-	-	-	+
<i>S. cricetus</i>	-	-	-	+
<i>S. sanguinis</i>	-	-	-	+
<i>L. acidophilus</i>	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> (sorotipo A)	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> (sorotipo B)	-	-	-	-

(+) presença de zona de inibição de crescimento, (-) ausência de halo de inibição de crescimento, C-L- indica não exposição ao laser e ao corante, C-L+ indica exposição somente ao laser, C+L- indica exposição somente ao corante e C+L+ indica exposição ao corante e ao laser.

5.2. Atividade antimicrobiana *in situ*

5.2.1. Estreptococos totais

A FIG. 9 representa os resultados encontrados para as contagens de estreptococos totais presentes no biofilme dental produzido na cavidade bucal de doze voluntários utilizando um modelo *in situ*. Os dados referem-se ao número de unidades formadoras de colônias por miligrama de biofilme dental (UFC mg⁻¹) após ter sido sonificado e a suspensão resultante ter sido sensibilizada com o corante azul de toluidina O na concentração de 100 µg/mL e submetida à irradiação laser com a densidade de energia de 28,8 J/cm².

A total inibição de crescimento, representada pela queda nas contagens de 4,88 x 10⁶ UFC mg⁻¹ para zero, foi observada para o grupo tratado com corante e laser (C+L+). Quando o biofilme bacteriano foi exposto somente ao corante (C+L-), observou-se redução estatisticamente significativa no número de microrganismos de 4,88 x 10⁶ UFC mg⁻¹ para 1,79 x 10⁶ UFC mg⁻¹ representando uma queda de 36,68% nas contagens de bactérias viáveis. Esses resultados diferiram estatisticamente tanto dos grupos tratados somente com laser (C-L+) e sem laser e sem corante (C-L-) quanto do grupo exposto à terapia fotodinâmica. O tratamento do biofilme dental somente com a luz laser (C-L+) não apresentou diferenças significativas no número de microrganismos quando comparados ao controle negativo (C-L-).

O crescimento dos estreptococos totais em duas diluições diferentes das placas com meio de cultura referentes aos tratamentos sem laser e sem corante (C-L-), com laser (C-L+), com corante (C+L-) e referentes à associação do corante e do laser (C+L+) estão representadas no anexo 2.

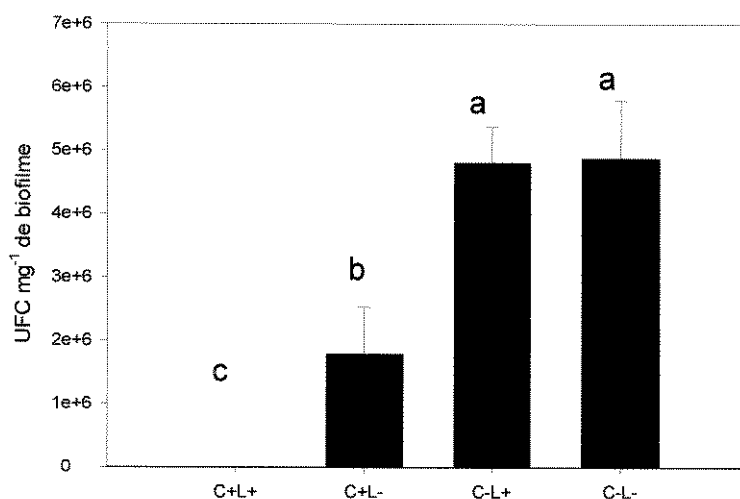


FIGURA 9 - Contagens de estreptococos totais no biofilme bacteriano. C-L- indica não exposição ao corante e ao laser, C-L+ indica exposição somente ao laser, C+L- indica exposição somente ao corante e C+L+ indica exposição ao corante e ao laser. Dados são médias de 12 repetições (n=12) \pm desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

5.2.2. Estreptococos grupo mutans

A FIG. 10 ilustra as contagens de estreptococos grupo mutans presentes no biofilme dental crescido na cavidade bucal de dez voluntários *in situ*, já que dois deles não apresentaram essa espécie bacteriana. Os dados referem-se ao número de unidades formadoras de colônias por miligrama de biofilme dental (UFC mg⁻¹). Os resultados para as contagens de microrganismos foram de $2,40 \times 10^5$ UFC mg⁻¹ para o controle negativo (C-L-), $2,44 \times 10^5$ UFC mg⁻¹ para o grupo exposto somente ao laser (C-L+), $1,91 \times 10^5$ UFC mg⁻¹ para o grupo exposto somente ao corante (C+L-) e total inibição de crescimento na associação do tratamento corante e laser (C+L+). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sem laser e sem corante (C-L-), tratados apenas com laser (C-L+) e tratados apenas com o corante (C+L-). No entanto, a sensibilização do biofilme com o corante azul de toluidina O na concentração de 100 µg/mL seguida da irradiação laser com a densidade de energia de 28,8 J/cm² produziu efeito bactericida total, diferindo estatisticamente dos demais grupos pelo teste t ($p < 0,05$).

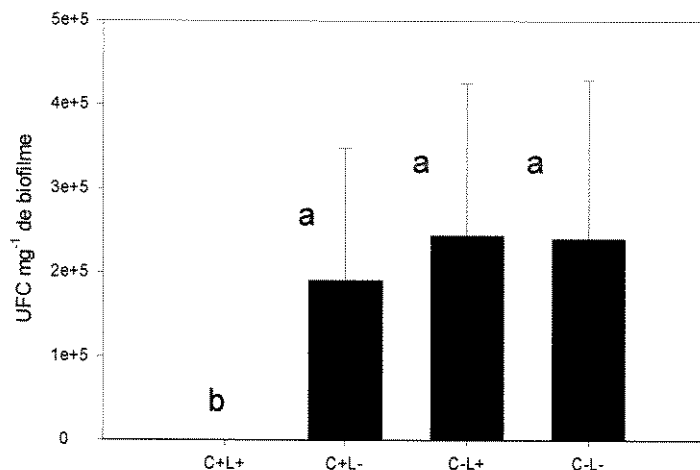


FIGURA 10 - Contagens de estreptococos grupo mutans no biofilme bacteriano. C-L- indica não exposição ao corante e ao laser, C-L+ indica exposição somente ao laser, C+L- indica exposição somente ao corante e C+L+ indica exposição ao corante e ao laser. Dados são médias de 10 repetições ($n=10$) \pm desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste t ($p<0,05$).

O crescimento dos estreptococos grupo mutans em duas diluições diferentes das placas com meio de cultura referentes aos tratamentos sem laser e sem corante (C-L-), com laser (C-L+), com corante (C+L-) e referentes à associação do corante e do laser (C+L+) estão representadas no anexo 2.

5.2.3. Lactobacilos

Os dados ilustrados na FIG. 11 referem-se ao número de unidades formadoras de colônias de lactobacilos por miligrama de biofilme dental (UFC mg^{-1}) do biofilme bacteriano de nove voluntários submetido à terapia fotodinâmica, visto que três deles não apresentaram essa espécie bacteriana. O material foi coletado, sonificado e a suspensão resultante foi sensibilizada com o corante azul de toluidina O na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e submetida à irradiação laser com a densidade de energia de 28,8 J/cm^2 . As contagens de microrganismos nos diferentes tratamentos foram de $9,70 \times 10^5$ UFC mg^{-1} para o controle negativo (C-L-), $1,02 \times 10^6$ UFC mg^{-1} para o grupo exposto somente ao laser (C-L+), $5,32 \times 10^5$ UFC mg^{-1} para o grupo exposto somente ao corante (C+L-) e total inibição de crescimento na associação do tratamento corante e laser (C+L+). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sem laser e sem corante (C-L-), tratados apenas com laser (C-L+) e tratados apenas com o corante (C+L-). No entanto, associação do corante e da luz laser produziu efeito bactericida total, diferindo estatisticamente dos demais grupos pelo teste t ($p < 0,05$).

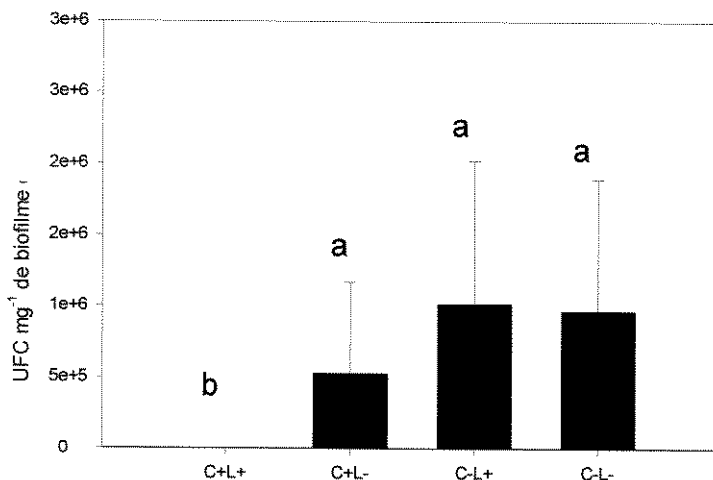


FIGURA 11 - Contagens de lactobacilos no biofilme bacteriano. C-L- indica não exposição ao corante e ao laser, C-L+ indica exposição somente ao laser, C+L- indica exposição somente ao corante e C+L+ indica exposição ao corante e ao laser. Dados são médias de 9 repetições (n=9) \pm desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

O crescimento dos lactobacilos em duas diluições diferentes das placas com meio de cultura referentes aos tratamentos sem laser e sem corante (C-L-), com laser (C-L+), com corante (C+L-) e referentes à associação do corante e do laser (C+L+) estão representadas no anexo 2.

5.2.4. Candidas

O número de unidades formadoras de colônias de candidas por miligrama de biofilme dental (UFC mg⁻¹) acumulado sobre os blocos de esmalte humano inseridos em dispositivos intra-bucais está representado na FIG. 12. Os

resultados referem-se às contagens de microrganismos de seis voluntários sendo de $2,75 \times 10^5$ UFC mg^{-1} para o controle negativo (C-L-), $1,73 \times 10^5$ UFC mg^{-1} para o grupo exposto somente ao laser (C-L+), $2,62 \times 10^5$ UFC mg^{-1} para o grupo exposto somente ao corante (C+L-) e $1,06 \times 10^3$ UFC mg^{-1} para a associação do tratamento corante e laser (C+L+). A inibição parcial de crescimento foi observada para o grupo submetido à terapia fotodinâmica, com diferenças estatisticamente significativas para este grupo pelo teste t ($p < 0,05$).

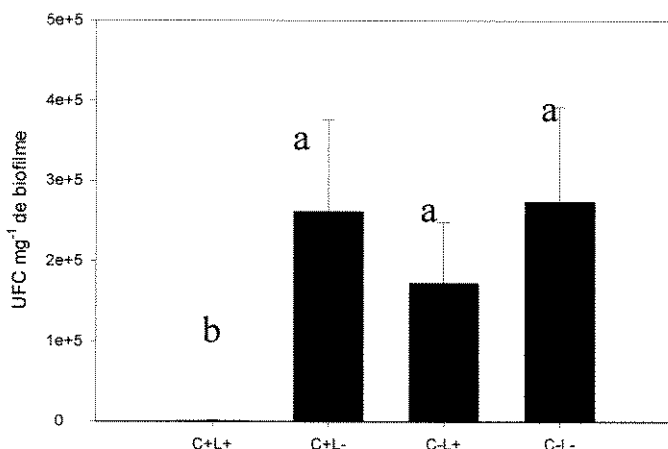


FIGURA 12 - Contagens de candidas no biofilme bacteriano. C-L- indica não exposição ao corante e ao laser, C-L+ indica exposição somente ao laser, C+L- indica exposição somente ao corante e C+L+ indica exposição ao corante e ao laser. Dados são médias de 6 repetições ($n=6$) \pm desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

O crescimento das candidas em duas diluições diferentes das placas com meio de cultura referentes aos tratamentos sem laser e sem corante (C-L-),

com laser (C-L+), com corante (C+L-) e referentes à associação do corante e do laser (C+L+) estão representadas no anexo 2.

6. DISCUSSÃO

Como a maioria das bactérias bucais não absorve a luz visível, a utilização de um fotossensibilizador não tóxico que se fixe à parede bacteriana atraindo para si a luz laser no momento da irradiação é essencial para que os lasers diodos tenham ação antimicrobiana sobre bactérias bucais (WILSON *et al.*, 1992; WILSON, 1993). Desse modo, quando as bactérias são irradiadas por uma luz laser de comprimento de onda complementar, ocorre a absorção de fótons pelo corante, que é convertido para um estado excitado. A seguir, a energia transferida para as moléculas vizinhas pode resultar na formação de moléculas reativas como o oxigênio singleto, íons superóxidos, hidroxilas e outros radicais livres que podem danificar e, em último caso, matar as células bacterianas (SPIKES & JORI, 1987; MACROBERT *et al.*, 1989; MALIK *et al.*, 1990; DOBSON & WILSON, 1992; WILSON *et al.*, 1993; BRATTI *et al.*, 1997).

Além disso, para produzir efeito antimicrobiano, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz emitida pelo laser (WILSON *et al.*, 1992) como ocorre com o azul de toluidina O, que apresenta pico de absorção máximo em 632 nm (WILSON *et al.*, 1995) e foi utilizado em associação com um laser diodo de 660 nm.

Os resultados deste estudo *in vitro* demonstraram que algumas bactérias podem ser mortas pela ação do laser diodo com comprimento de onda de 660 nm associado ao fotossensibilizador azul de toluidina O na concentração

de 100 µg/mL. Quando presentes em suspensões bacterianas, observamos efeito bactericida sobre *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *L. acidophilus* e *L. casei* quando submetidos ao tratamento laser e corante. Nesses casos, consideramos efeito bactericida a redução total na viabilidade dos microrganismos, com as contagens caindo de 10^7 a 10^{10} UFC mL⁻¹ para zero (TAB. 1). No entanto, alguns estudos encontrados na literatura relatam reduções estatisticamente significativas nas contagens dos microrganismos viáveis onde, por exemplo, quedas de $5,4 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ para $0,01 \times 10^9$ (1×10^7) UFC mL⁻¹ são considerados como redução de 99,9% na viabilidade dos microrganismos (BURNS *et al.*, 1993; BURNS *et al.*, 1994; WILSON & YIANNI, 1994; BURNS *et al.*, 1995; MILLSON *et al.*, 1996; GRIFFITHS *et al.*, 1997; STRINGER *et al.*, 1998). No entanto, mais importantes que dados estatisticamente significativos, seria a obtenção de dados microbiologicamente significativos, no que se refere a retirar o paciente de risco em relação ao número de microrganismos patogênicos presentes na cavidade bucal. Com relação aos estreptococos grupo mutans são considerados pacientes com alto risco de cárie aqueles que apresentam contagens maiores ou iguais a 10^6 UFC mL⁻¹ na saliva enquanto que para os lactobacilos são considerados pacientes com acentuada atividade de cárie aqueles que apresentam contagens iguais ou superiores a 10^4 UFC mL⁻¹ na saliva (BHATHALL & CARLSSON, 1988).

Ainda com relação ao estudo *in vitro*, a inibição parcial de crescimento foi observada somente para *S. sanguinis*, uma bactéria constituinte da microbiota bucal residente de humanos, comumente associada às superfícies mucosas

(MARCOTTE & LAVOIE, 1998). Esse fato torna os resultados deste estudo positivos já que a esterilização da cavidade bucal com a morte de toda a microbiota residente não é desejável por tornar o hospedeiro mais susceptível ao aparecimento de infecções oportunistas (WOOD *et al.*, 1999). Desse modo, é desejável que a terapia fotodinâmica atinja preferencialmente bactérias cariogênicas como os estreptococos grupo mutans e lactobacilos (LOESCHE, 1986) de modo que a ação bactericida seletiva possa facilitar a recolonização do nicho tratado por espécies menos patogênicas (WOOD *et al.*, 1999).

A *C. albicans* não foi susceptível à terapia fotodinâmica apresentando contagens de microrganismos estatisticamente semelhantes entre os grupos tratados com laser e corante e os grupos controles na fase *in vitro* deste estudo, em conformidade com os resultados encontrados por WILSON & MIA, (1993). As células fúngicas provavelmente não responderam ao tratamento por apresentarem características morfológicas diferentes das células bacterianas, o que impediu a ação antimicrobiana nos parâmetros testados. Esses mesmos autores sugerem que as bactérias Gram positivas e Gram negativas são mais susceptíveis a fotossensibilização letal por laser do que células fúngicas como a *C. albicans*. Outros autores relatam ainda a proliferação desse microrganismo quando irradiados na ausência de um fotossensibilizador específico (PINHEIRO *et al.*, 1999).

Os testes para verificação de halo de inibição de crescimento *in vitro* mostraram-se positivos para todos os estreptococos. No entanto, lactobacilos e a

candidas não apresentaram zonas livres de crescimento mesmo quando tratados com corante e laser. Os dados referentes aos lactobacilos sugerem que a ação do laser sobre os microrganismos pode variar quando ele está presente em uma suspensão ou sobre a superfície de uma placa de meio de cultura sólida. HENRY *et al.* (1996) relatam que os mesmos microrganismos inoculados em meios de cultura distintos respondem diferentemente à irradiação laser, assumindo que ainda que fatores como a proporção de crescimento das células bacterianas pudessem ser mantidos constantes em diferentes meios de cultura, as variações na fototoxicidade poderiam ser atribuídas a diferenças na assimilação e/ou metabolismo de constituintes dos meios de cultura. Assim, a ocorrência de zonas de inibição de crescimento para apenas alguns microrganismos pode ser atribuída a variações nas doses letais de luz necessárias para diferentes microrganismos bem como nas diferenças nas densidades de células de uma mesma bactéria quando inoculada em meios de cultura sólidos (DOBSON & WILSON, 1992).

Outro fator que poderia influenciar a susceptibilidade dos microrganismos à terapia fotodinâmica seria a fase de crescimento em que esses microrganismos se encontram e a maneira como eles respondem ao estresse. Quando culturas de células bacterianas atingem uma situação de estresse como a falta de nutrientes ou excesso de produtos metabólicos há uma diminuição no ritmo do crescimento das células. A transição da fase exponencial de crescimento para a fase estacionária e mais tarde para a fase de declínio é geralmente

acompanhada por um aumento de resistência dessas células aos agentes antimicrobianos. (TUOMANEN *et al.*, 1986a, b; MAH & O'TOOLE, 2001).

BRATTI *et al.* (1997) demonstraram que o estado fisiológico de *P. gingivalis* influenciava a fotossensibilização letal por laser de maneira que quando presente na fase estacionária, essas bactérias eram menos susceptíveis à terapia fotodinâmica. No entanto, GRIFFITHS *et al.* (1997), estudando a susceptibilidade de cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina expostas à terapia fotodinâmica, encontraram resultados semelhantes na viabilidade das bactérias independente de estarem na fase de adaptação, exponencial ou estacionária de crescimento, sugerindo que o efeito letal da terapia parece estar mais diretamente relacionado a utilização de uma dose de energia e fotossensibilizador adequados do que a fase de crescimento do microrganismo.

A seguir, realizamos um estudo *in situ* a fim de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre microrganismos inseridos em biofilmes. Segundo MAH & O'TOOLE (2001) biofilmes bacterianos são formados quando microrganismos unicelulares se reúnem para formar uma comunidade que está aderida a uma superfície sólida e envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares, originando a formação de biofilmes a partir de uma ou múltiplas espécies bacterianas. Tem sido observado que a resistência do biofilme aos antibióticos é aumentada se comparada ao observado em culturas de células, de modo que os microrganismos presentes em um biofilme podem ser de 10 a 1000 vezes mais

resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos (NICKEL *et al.*, 1985; EVANS & HOLMES, 1987; MAH & O'TOOLE, 2001).

Desse modo, realizou-se um estudo com voluntários utilizando dispositivos intra-bucais para o acúmulo de biofilme dental, já que o modelo *in situ* de longa duração em humanos é reconhecido como uma alternativa viável entre as limitações das controladas avaliações laboratoriais e a complexidade dos estudos clínicos (ZERO, 1995).

Os resultados do estudo *in situ* sugerem que as bactérias presentes na formação dos biofilmes bacterianos em humanos são susceptíveis à terapia fotodinâmica sendo observado ação bactericida total sobre estreptococos totais, estreptococos grupo mutans e lactobacilos e inibição parcial de crescimento para as candidas. Em relação às contagens de estreptococos totais, observou-se reduções estatisticamente significativas na utilização do corante isoladamente. Embora a maioria dos estudos relate que a irradiação das bactérias na ausência do corante ou a sensibilização com o corante na ausência da luz laser não tenha efeito detectável na viabilidade dos microrganismos (DOBSON & WILSON, 1992; WILSON *et al.*, 1992; BURNS *et al.*, 1993; SARKAR & WILSON, 1993; BURNS *et al.*, 1994; WILSON & YIANNI, 1994; MILLSON *et al.*, 1996; WILSON *et al.*, 1996), alguns autores têm encontrado redução na viabilidade de algumas espécies quando expostas somente ao corante (WILSON & MIA, 1993; BURNS *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1995; BHATTI, *et al.*, 1997; GRIFFITHS *et al.*, 1997), o que

provavelmente está relacionado ao tipo e concentração do fotossensibilizador utilizado, bem como ao tipo de célula irradiada.

Com relação à inibição parcial de crescimento observada para *Candida* *in situ*, esse fato deveu-se provavelmente às diferenças nas características morfológicas das células fúngicas. A redução nas contagens de *Candida* para o grupo tratado com corante e laser foi estatisticamente significativa quando comparada aos outros grupos, ao contrário do observado no estudo *in vitro*. Esse fato é provavelmente devido às menores densidades de *Candida* no biofilme dental de voluntários saudáveis quando comparados com as quantidades de células presentes nas suspensões testadas *in vitro*, além de alterações nas características metabólicas e condições de crescimento dessas células quando inseridas em biofilmes bucais.

Assim, os resultados do estudo *in situ* sugerem que as bactérias presentes na formação dos biofilmes bacterianos em humanos são susceptíveis à terapia fotodinâmica. No entanto, a ação bactericida da associação do laser diodo e do corante azul de toluidina O só foi observado quando o biofilme formado *in situ* havia sido desorganizado pela sonicação do material.

Resultados semelhantes foram encontrados por WILSON *et al* (1995) onde os autores relatam reduções estatisticamente significativas nas contagens de bactérias anaeróbicas, estreptococos e actinomicetos coletados da placa bacteriana supragengival de dez voluntários saudáveis. Neste estudo, o material

era coletado com um *swab*, colocado em um meio de transporte, agitado pra a dispersão das células e somente então submetido à terapia fotodinâmica. SAKAR & WILSON (1993) utilizaram a mesma metodologia na coleta de placa bacteriana subgengival de vinte pacientes com periodontite crônica, observando reduções estatisticamente significativas nas contagens de bactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas, anaeróbios produtores de pigmento negro e estreptococos quando o biofilme subgengival formado foi submetido à terapia fotodinâmica após a dispersão do material.

Os resultados encontrados em um estudo piloto realizado no laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP – UNICAMP (dados não mostrados) sugeriram que biofilmes dentais produzidos *in situ* e expostos a terapia fotodinâmica nos parâmetros testados sem a desorganização do material, respondem negativamente ao tratamento. Neste estudo piloto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado com laser e corante e os grupos controles. Isso se deu provavelmente pela dificuldade de penetração do agente fotossensibilizador no interior do biofilme devido à presença da matriz extracelular e devido a alterações nas densidades de energia necessárias para a obtenção de efeito antimicrobiano sobre biofilmes organizados.

O único estudo relatando reduções estatisticamente significativas sobre a viabilidade de microrganismos presentes em biofilmes organizados após a fotossensibilização letal por laser é de WILSON *et al.* (1996). Neste estudo, os autores avaliaram quantitativamente o efeito dessa terapia sobre *S. sanguinis*

utilizando um fermentador de fluxo contínuo alimentado por saliva artificial. A sensibilização das amostras com o fotossensibilizador e a irradiação com um laser de 660 nm foi feito sem a desestruturação do biofilme. A dispersão das células foi feita posteriormente para permitir a contagem dos microrganismos viáveis. Os resultados demonstraram haver uma redução dos microrganismos viáveis diretamente proporcional ao aumento das doses de energia. No entanto, é importante notar-se que o biofilme utilizado neste estudo foi formado por uma única espécie bacteriana e foi produzido artificialmente; o que inevitavelmente apresenta diferenças em relação ao biofilme formado *in vivo*.

A habilidade do laser diodo de 660 nm associado ao azul de toluidina O em produzir efeito antimicrobiano sobre bactérias cariogênicas foi comprovado neste estudo tanto em microrganismos crescidos em caldos de cultura *in vitro* quanto em bactérias crescidas em biofilmes formados *in situ*. Embora outros estudos devam ser realizados a fim de tornar a fotossensibilização letal por laser aplicável *in vivo*, esses resultados preliminares sugerem que essa terapia poderá ter aplicações clínicas.

Entre as vantagens dessa técnica em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais temos que a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos. Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos

microrganismos improvável. Finalmente, o uso do fotossensibilizador ou da luz laser sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão de cárie pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica (WILSON, 1993).

Entre as maiores vantagens em se matar bactérias *in vivo* temos sua implicação na remoção mecânica da dentina infectada. De modo geral, o tratamento de lesões de cárie envolve a remoção de tecido sadio para ganhar acesso à lesão e permitir a remoção de dentina desmineralizada infectada (WILSON *et al.*, 1995). O desenvolvimento de uma terapia capaz de obter efeito antimicrobiano *in vivo* possibilitaria a restauração da lesão de cárie com a remoção mínima do tecido dental, melhorando dessa forma o prognóstico do elemento dental restaurado.

7. CONCLUSÕES

- O uso da terapia fotodinâmica *in vitro* associando o corante azul de toluidina O na concentração de 100 µg/mL seguido da irradiação com laser diodo de 660 nm e densidade de energia de 28,8 J/cm² é efetiva para eliminar *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *L. acidophilus* e *L. casei* presentes em suspensões bacterianas e estreptococos grupo mutans presentes em *pool* de saliva humana. Sob as mesmas condições experimentais a terapia foi efetiva para reduzir as contagens de *S. sanguinis* e estreptococos totais presentes em saliva humana;
- O uso da terapia fotodinâmica nos parâmetros testados é efetivo para reduzir as contagens de estreptococos totais, estreptococos grupo mutans, lactobacilos e candidas crescidas em biofilmes dentais *in situ*.

REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS*

1. ADRIAN, J.C.; BERNIER, L.; SPRAGUE, W.G. Laser and the dental pulp. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.83, n.1, p.113-7, July 1971.
2. ADRIAN, J.C.; GROSS, A. A new method of sterilization: the carbon dioxide laser. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.8, n.1, p.60-1, Feb. 1979.
3. ANDO, Y. *et al.* Bactericidal effect of Er:YAG laser on periodontopathogenic bacteria. **Lasers Surg Med**, New York, v.19, n.2, p.190-200, 1996.
4. ATLAS R.M.; PARKS, L.C. **Handbook of microbiological media**. London: Boca Raton, 1993. 1079p.
5. BAHCALL, J. *et al.* Preliminary investigation of the histological effects of laser endodontic treatment on the periradicular tissue in dogs. **J Endod**, Baltimore, v.18, p.47-51, 1992.
6. BENELLI, E.M. *et al.* *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res**, Basel, v.27, n.4, p.280-4, 1993.
7. BERTOLONI, G. *et al.* Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. **Photochem Photobiol**, Lawrence, v.39, n.6, p.811-6, June 1984.
8. BERTOLONI, G. *et al.* Photosensitizing activity of water and lipid soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v.59, n.1-2, p.149-55, Sept. 1990.

* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

9. BHATTI, M. *et al.* Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* *in vitro*. **Photochem Photobiol**, Lawrence, v.65, n.6, p.1026-31, Mar. 1997.
10. BOWDEN, G.; EDWARDSSON, S. Ecologia oral e cárie dentária. *In*: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. cap.3, p.45-9.
11. BOWDEN, G.H.W.; ELLWOOD, D.C.; HAMILTON, I.R. Microbial ecology of the oral cavity. **Adv Microb Ecol**, New York, v.3, p.135-217, 1979.
12. BRATHALL, D.; CARLSSON, J. Estado atual dos testes de atividade de cárie. *In*: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Tratado de cariologia**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1988. cap.13, p.239-55.
13. BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. 356p.
14. BRUGNERA JUNIOR, A.; VILLA, R.G.; GENOVESE, W.J. **Laser na odontologia**. São Paulo: Pancast, 1991. 61p.
15. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, Basel, v.29, n.3, p.192-7, Oct. 1995.
16. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. **J Dent**, Oxford, v.22, n.5, p.273-8, Oct. 1994.
17. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. **J Med Microbiol**, London, v.38, n.6, p. 401-5, June 1993.

18. BURT, B.A.; LOESCHE, W.J.; EKLUND, S.A. Stability of selected plaque species and their relationship to caries in a child population over 2 years. **Caries Res**, Basel, v.19, n.3, p.193-200, 1985.
19. CHALLACOMBE, S.J. Serum and salivary antibodies to *Streptococcus mutans* in relation to the development and treatment of human dental caries. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.25, n.7, p.495-502, 1980.
20. CHAPMAN, G.H. The isolation of streptococci from mixed cultures. **J Bacteriol**, Washington, v.48, p.113-4, 1944.
21. CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L.N. *et al.* **Odontologia restauradora** : fundamentos e possibilidades. 2.ed. São Paulo: Santos, 2001. cap.2, p.34-68.
22. CURY, J.A.; REBELLO, M.A.B.; DEL BEL CURY, A.A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, Basel, v.31, n.5, p.356-60, 1997.
23. CURY, J.A. *et al.* Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, Basel, v.34, n.6, p.491-7, Nov./Dec. 2000.
24. DEDERICH, D.N. *et al.* Comparative bactericidal exposures for selected oral bacteria using carbon dioxide laser radiation. **Lasers Surg Med**, New York, v.10, n.6, p.591-4, 1990.
25. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.37, n.11, p.883-7, Nov. 1992.

26. DOUGHERTY, T.J.; POTTER, W.R.; BELLNIER, D. Photodynamic therapy for the treatment of cancer: current status and advances. *In*: PHOTODYNAMIC therapy of neoplastic disease. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.1-19.
27. EINSTEIN, A.Z. Quantentheorie der strhlung. **Physiol Z**, v.18, p.121-8, 1917. *Apud* ZANIN, F.A.A. *Op. cit.* Ref. 103.
28. EVANS, R.C.; HOLMES, C.J. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphilococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.31, p.889-94, June 1987.
29. FROSTELL, G.; NORD, C.E. A comparison between different methods of culturing lactobacilli from human saliva. **Sven Tandlak Tidskr**, Stockholm, v.65, n.11, p.553-7, Nov. 1972.
30. FUSHIDA, C.E.; CURY, J.A. Estudo *in situ* do efeito da freqüência de ingestão de coca-cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.13, n.2, p.127-34, 1999.
31. GIBBONS, R.J.; HAY, D.I. Human salivary acidic proline-rich-proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatite surfaces. **Infect Immun**, Washington, v.56, n.2, p.439-45, Feb. 1988.
32. GOLD, O.C.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *S. mutans*. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.11, p.1357-64, Nov. 1973.
33. GORDON, J.P.; ZEIGLER, H.J.; TOWNES, C.H. The maser a new type of amplifier, frequency standard and spectrometer. **Physiol Rev**, Baltimore, v.99, p.1264-74, 1955. *Apud* ZANIN, F.A.A. *Op. cit.* Ref. 103.

34. GRIFFITHS, M.A.; WREN, B.W.; WILSON, M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro* using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. **J Antimicrobial Chemother**, London, v.40, p.873-6, 1997.
35. GUTKNECHT, N. *et al.* Bactericidal effect of the Nd:YAG laser *in vitro* in root canals. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v.14, n.2, p.77-80, Apr. 1996.
36. HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, Washington, v.44, n.2, p.331-84, June 1980.
37. HENRY, C.A. *et al.* Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilmes of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne v.34, n.2/3, p.123-8, July 1996.
38. ITO, K.; NISHIKATA, J.; MURAI, S. Effects of Nd:YAG laser radiation on removal of a root surface smear layer after root planning. A scanning electron microscopic study. **J Periodontol**, Chicago, v.64, n.6, p.547-52, June 1993.
39. JAVAN, A.; BENNETT, W.R.; HERRIOT, D.R. Population inversion and continuous optical maser oscillation in gas discharge containing a HeNe mixture. **Physiol Rev**, Baltimore, v.6, p.106-10, 1961.
40. JOHNSON, L.F. Optical maser characteristics of rare-earth ions in crystals. **J Appl Physiol**, Bethesda, n.34, p.897-909, 1961.

41. KATO, T.; KUSAKARI H.; HOSHINO, E. Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implant and subsequent cellular adhesion to irradiated area. **Lasers Surg Med**, New York, v.23, n.5, p.299-309, 1998.
42. KIRILL, I. *et al.* Photodynamic effect of laser radiation and methylene blue on some opportunistic pathogenic microorganisms of oral cavity. *In*: INTERNATIONAL BIOMEDICAL OPTICS SYMPOSIUM. San Jose: SPIE, 2000. p.49. Abstract, 3910-05.
43. KIVELA, J. *et al.* A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. **Caries Res**, Basel, v.33, n.3, p.178-84, June 1999.
44. KLOCK, J.; KRASSE, B. Microbial and salivary conditions in 9 to 12 years old children. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.85, p.56-63, Jan. 1977.
45. KRASSE, B. **Risco de cáries**. 2.ed. São Paulo: Quintessence, 1988.
46. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human decay. **Microbiol Res**, Jena, v.50, n.4, p.353-80, Dec. 1986.
47. LONGO, L. **Terapia laser**. Firenze: Scientifiche Firenze, 1988.
48. MACMILLAN, J.D.; MAXWELL, W.A.; CHICHESTER, C.O. Lethal photosensitisation of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser. **Photochem Photobiol**, Lawrence, v. 5, n.7, p.555-65, July 1966.
49. MACROBERT, A.J.; BOWN, S.G.; PHILLIPS, D. What are the ideal properties of a photosensitizer? *In*: PHOTSENSITIZING compounds: their chemistry, biology and clinical use. Chichester: Wiley, 1989. p.4-16.

50. MAH, T.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, Cambridge, v.9, n.1, p.34-9, Jan. 2001.
51. MAIMAN T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, London, v.187, p.493-4, 1960.
52. MALIK, Z. *et al.* Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v.5, n.3-4, p.281-93, May 1990.
53. MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol Mol Biol Rev**, Washington, v.62, n.1, p.71-109, Mar. 1998.
54. MARSH, P.; MARTIN, M. **Oral microbiology**. 3rd ed. London: Chapman & Hall, 1992.
55. MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**, Washington, v.8, n.2, p.263-71, July 1994.
56. MARTINETTO, P. *et al.* Bactericidal effects induced by laser irradiation and hematoporphyrin against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. **Drugs Exp Clin Res**, Geneva, v.12, n.4, p.335-42, 1986.
57. MATHEWS, M.M.; SISTROM, W.R. The function of the carotenoid pigments of *Sarcina lutea*. **Arch Microbiol**, Berlin, v.35, p.139-46, 1960.
58. MCKEE, A.S. *et al.* The establishment of reproducible, complex communities of oral bacteria in the chemostat using defined inocula. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v.59, n.3, p.263-75, Sept. 1985.

59. MCNABB, P.C.; TOMASI, T.B. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v.35, p.477-96, 1981.
60. MILLSON, C.E. *et al.* The killing of *Helicobacter pylori* by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J Med Microbiol**, London, v.44, n.4, p.245-52, Apr. 1996.
61. MISERANDINO, L.J.; PICK, R.M. **Lasers in dentistry**. Chicago: Quintessence, 1995.
62. MORITZ, A. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. **Lasers Surg Med**, New York, v.22, p.302-11, 1998.
63. MORITZ, M.D. *et al.* Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v.15, n.1, p.33-7, Feb. 1997.
64. MORLOCK, B.J. *et al.* The effect of Nd:YAG laser exposure on root surfaces when used as an adjunct to root planning: a *in vitro* study. **J Periodontol**, Chicago, v.63, n.7, p.637-41, July 1992.
65. NICKEL, J.C. *et al.* Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.27, n.4, p.619-24, Apr. 1985.
66. NYVAD, B. Microbial colonization of human tooth surfaces. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl**, Copenhagen, v.32, n.1, p.1-45, 1993.
67. PATEL, C.K.; MACFARLANE, R.A.; FAUST, W.L. Selective excitation transfer and optical maser action in N₂CO₂. **Physiol Rev**, Baltimore, n.1, p.617-19, 1964.


68. PINHEIRO, A.L.B. Bases físicas dos lasers. *In*: BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. p.27-44.
69. PINHEIRO, A.L.B. *et al.* Effects of 635 and 670 nm laser irradiation on *Candida .albicans*: study *in vitro*. *In*: INTERNATIONAL BIOMEDICAL OPTICS SYMPOSIUM. San Jose : SPIE, 1999. p.57-61.
70. RADVAR, M. *et al.* A evaluation of the effects of an Nd:YAG laser on subgingival calculus, dentin and cementum. An *in vitro* study. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.22, n.1, p.71-77, Jan. 1995.
71. ROGOSA, M.; MITCHELL, J.A.; WISEMAN, R.F.A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. **J Dent Res**, Washington, v.30, p.682-89, 1951.
72. ROONEY, J.; MIDDA, M.; LEEMING, J. A laboratory investigation of the bactericidal effect of a Nd:YAG laser. **Br Dent J**, London, v.176, n.2, p.61-4, Jan. 1994.
73. ROSENFELD, K.; FRENTZEN, M.; KOORT, H.J. Photosensitization of *Streptococcus mutans* by 650 nm Diode laser. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 6., 1998, Maui, Hawaii. **Anais...** Utah: International Society for Lasers in Dentistry, 1998. p.171-2.
74. RUSSEL, R.R.; JOHNSON, N.W. The prospects for vaccination against dental caries. **Br Dent J**, London, v.162, n.1, p.29-34, Jan. 1987.
75. SARKAR, S.; WILSON, M. Lethal photosensitisation of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v.28, n.3, p.204-10, May 1993.

76. SPIKES, J.D.; JORI, G. Photodynamic therapy of tumours and others diseases using porphyrins. **Lasers Med Sci**, Sidcup Kent, v.2, p.3-15, 1987.
77. STERN, R.M.; SOGNAES, R.F. Laser beam on dental hard tissues. *In*: International Association for Dental Research. General meeting, 42. Los Angeles, Mar. 19-22, 1964. Abstracts of papers. Chicago. **J Dent Res**, Washington, v.43, n.5, p.873, 1964.
78. STRINGER, G.J.; BIRD, P.S.; WALSH, L.J. Lethal laser photosensitization of *Streptococcus mutans* absorbed into dentine slices. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 6., 1998, Maui, Hawaii. **Anais...** Utah: International Society for Lasers in Dentistry, 1998. p.66-7.
79. TAKAHASHI, P.K. *et al.* Irradiation of *Escherichia coli* in the visible spectrum with a tunable organic-dye laser energy source. **Appl Microbiol**, Washington, v.29, n.1, p.63-7, Jan. 1975.
80. TEWFIK, H.M. *et al.* Structural and functional changes of cementum surface following exposure to a modified Nd:YAG laser. **J Periodontol**, Chicago, v.65, n.4, p.297-302, Apr. 1994.
81. THEILADE, E. Factors controlling the microflora of the healthy mouth. *In*: HILL, J.; MARSH, P.D. (Ed.) **Human microbial ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.2-56
82. THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. O ambiente oral – uma introdução. *In*: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. cap.1, p.13-16.


83. TUCKER, D. *et al.* Morphologic changes following in vitro CO₂ laser treatment of calculus-planed root surfaces. **Lasers Surg Med**, New York, v.18, n.2, p.150-6, 1996.
84. TUNÉR, J.; HODE, L. **Laser therapy in dentistry and medicine**. [s.l.]: Prima Books, 1996. 233p.
85. TUOMANEN, E. *et al.* Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.30, n.4, p.521-7, Oct. 1986a.
86. TUOMANEN, E. *et al.* The rate of killing os *Escherichia coli* by β -lactam antibiotics is strictly proporcional to the rate of bacterial growth. **J Gen Microbiol**, Spencers Wood, v.132, n.5, p.1297-1304, May 1986b.
87. VAN HOUTE, J. Role of microorganisms in caries etiology. **J Dent Res**, Washington, v.73, n.3, p.672-81, Mar. 1994.
88. VENEZIO, F.R. *et al.* Bactericidal effects of photoradiation therapy with haematoporphyrin derivative. **J Infec Dis**, Chicago, v.151, n.1, p.166-9, Jan. 1985.
89. WALSH, L.J. The current status of low-level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Aust Dent J**, St Leonards, v.42, n.5, p.302-6, Oct. 1997.
90. WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. **Caries Res**, Basel, v.21, n.2, p.126-40, 1987.

91. WHITE, J.M., GOODIS, H.E., ROSE, C.M. Nd:YAG pulsed infrared laser for treatment of root surface. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v.195, p.55-8, 1991.
92. WHITE, J.M. *et al.* Identification of the physical modification threshold of dentin induced by neodymium and holmium YAG lasers using scanning electron microscopy. **Scanning Microsc**, Chicago, v.7, n.1, p.239-46, Mar. 1993.
93. WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v.75, n.4, p.299-306, Oct. 1993.
94. WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.22, n.8, p.354-7, 1993.
95. WILSON, M.; YIANNI, C. killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. **J Med Microbiol**, London, v.42, n.1, p.62-6, June 1995.
96. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilmes using a light-activated antimicrobial agent. **J Antimicrobial Chemother**, London, v.37, n.2, p.377-81, Feb. 1996.
97. WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of *Streptococcus sanguinis* to killing by low-power laser light. **Lasers Med Sci**, Sidcup Kent, v.8, p.69-73, 1993a.
98. WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol**, New York, v.25, n.2, p.77-81, Ago. 1992.

99. WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.8, n.3, p.182-7, June 1993b.
100. WILSON, M. *et al.* Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v.78, n.5, p.569-74, May 1995.
101. WOOD, S. *et al.* An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilmes formed *in vivo*. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v.50, n.1, p.1-7, May 1999.
102. ZAKARIASEN, K.L. *et al.* Bactericidal action of carbon dioxide laser radiation in experimental dental root canals. **Can J Microbiol**, Ottawa, v.32, n.12, p.942-6, Dec. 1986.
103. ZANIN, F.A.A. **Laser Diodo 655 nm no diagnóstico da cárie oclusal**. São Paulo, 1999. 104p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Camilo Castelo Branco.
104. ZERO, D.T. *In situ* caries models. **Adv Dent Res**, Washington, v.9, n.3, p.214-30, Nov. 1995.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba




CERTIFICADO

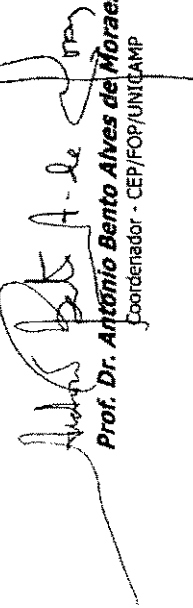
Certificamos que o Projeto de pesquisa Intitulado "Estudo *in vitro* e *in situ* da ação antimicrobiana de lasers diodos associados a fotossensibilizadores sobre microorganismos bucais", sob o protocolo nº **65/2000**, da Pesquisadora **Iriana Carla Junqueira Zanin**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 16 de agosto de 2000

We certify that the research project with title "*In Situ* and *In Vitro* study of antimicrobial effect of diodos lasers associated to photosensitizer on oral microorganisms", protocol nº **65/2000**, by Researcher **Iriana Carla Junqueira Zanin**, responsibility by Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).



Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário - CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. Antônio Bento Alves de Moraes
Coordenador - CEP/FOP/UNICAMP

Piracicaba, SP, Brazil, August 16 2000

ANEXO 2

