

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO**

**Isabela Medeiros Bevilacqua**

“Avaliação *in vitro* da radiação LED associada ao azul de toluidina  
na redução bacteriana e na formação do biofilme dentário pelo  
*Streptococcus mutans*”

São José dos Campos – SP  
2006

**Isabela Medeiros Bevilacqua**

“Avaliação *in vitro* da radiação LED associada ao azul de toluidina na  
redução bacteriana e na formação do biofilme dentário pelo  
*Streptococcus mutans*”

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Engenharia Biomédica, como  
complementação dos créditos necessários  
para obtenção do título de Mestre em  
Engenharia Biomédica.

Orientador: Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau  
Co-orientador: Profa. Msc. Sônia Khouri

São José dos Campos – SP  
2006

B467a

Bevilacqua, Isabela Medeiros

Avaliação *in vitro* da radiação LED associada ao azul de toluidina na redução bacteriana e na formação do biofilme dentário pelo *Streptococcus mutans*. / Isabela Medeiros Bevilacqua. São José dos Campos: Univap, 2006.  
1 Disco laser. Color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Placa dentária 2. *Streptococcus mutans* 3. Terapia fotodinâmica I. Nicolau, Renata Amadei, Orient. II. Khouri, Sonia, Co-Orient. III. Título

CDU: 616.314-008.8

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

Assinatura da aluna:



Data: 11 de outubro de 2006.

**“AVALIAÇÃO IN VITRO DA RADIAÇÃO LED (635 NM) ASSOCIADA AO AZUL DE TOLUIDINA NA REDUÇÃO BACTERIANA E NA DINÂMICA DA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR *STRIPTOCOCCUS MUTANS*”**

Isabela Medeiros Bevilacqua

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **RENATO AMARO ZÂNGARO** (UNIVAP)

Prof<sup>ª</sup>. Dra. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP)

Prof<sup>ª</sup>. Dra. **CRISTIANE YUMI KOGA ITO** (UNESP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Joaquim e Isa, por me ensinarem a buscar por meus objetivos, por mais pedras e obstáculos que existam em meu caminho.**

**Às minhas avós e a Tata, significado de grande luta pela vida.**

**Aos meus avôs que descansam lá em cima, mas com certeza estão olhando por mim aqui em baixo.**

**Ao Rafael, que foi fundamental na realização deste trabalho.**

**Com muito amor dedico este trabalho a todos vocês.**

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**A minha orientadora Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau pela atenção, confiança e credibilidade em meu potencial. Sem ela, com certeza esse trabalho não seria o mesmo. Um anjo que caiu do céu.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Magnífico Reitor da UNIVAP, Prof. Dr. Baptista Gargeone Filho e ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, diretor do IP&D, que possibilitaram a realização desta pesquisa.**

**A Profa. Msc. Sônia Khouri, responsável pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UNIVAP, e ao amigo Guilherme Theodoro, técnico deste laboratório, local onde foi realizado este trabalho.**

**Ao Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro e ao Prof. Msc. Luís Conrado (Microdont) por possibilitar o uso do LED e pela colaboração ao trabalho.**

**Ao amigo Leandro Procópio Alves pelos ensinamentos no laboratório de laser.**

**A Maria Lúcia Brison de Mattos, responsável pelo laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do INPE.**

**Aos meus amigos da Pós Graduação, pelo sofrimento e trabalho compartilhado, principalmente à amiga Fernanda por todo esse tempo de amizade.**

**Às secretárias Ivone e Valéria, pela ajuda na parte burocrática.**

**Aos amigos da Microbiologia Polaco, Daniel e Rodolfo.**

**A todos os funcionários do laboratório de Microbiologia, da faculdade de Odontologia e do IP&D.**

**A Rosângela Regis Cavalcanti Taranger pela ajuda na formatação deste trabalho.**

**À FAPESP.**

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

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,  
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar o autor da própria história.  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um "não".  
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Fernando Pessoa

“Avaliação *in vitro* da radiação LED associado ao azul de toluidina na redução bacteriana e na formação do biofilme dentário pelo *Streptococcus mutans*”

## RESUMO

A placa bacteriana é um depósito não calcificado, constituído de bactérias, células epiteliais descamadas, macromoléculas e restos alimentares, que se aderem à superfície do dente e constituem o primeiro passo para do desenvolvimento da cárie dentária. Os *Streptococcus mutans* são os principais agentes etiológico da doença, cujo tratamento consiste na remoção mecânica (curetas e brocas), eliminando o tecido infectado. A utilização da luz, associada a uma substância fotossensível (terapia fotodinâmica - TFD) sobre a eliminação de microrganismos, surge como uma nova modalidade de tratamento odontológico, curador e restaurador. Como a eliminação de microrganismos da cavidade oral é essencial para prevenir o risco de infecções locais e sistêmicas, este estudo avaliou a ação da substância fotossensibilizadora - azul de orto toluidina (AOT) (100 µg/mL) irradiada com LED (diodo emissor de luz) com pico de emissão em 635 nm, com 116 mW de potência, 21 J de energia e 2,18 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia sobre um meio de cultura (caldo sacarosado inoculado com *Streptococcus mutans*). Foram preparadas amostras, divididas em cinco grupos: 1-controle negativo, 2-controle positivo, 3- AOT, 4-somente LED e 5- LED + AOT. Foi feita a avaliação da formação de placa bacteriana nas amostras através de fotografia digital e microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permitiu concluir a redução na formação de placa bacteriana no grupo 5 (LED + AOT). Observou-se também o percentual de redução microbiana através da contagem de UFC/mL de cultura bacteriana nos grupo 3, 4 e 5. Os resultados mostraram uma redução de 28,4% no grupo 3 e 23,4% no grupo 4 em relação ao grupo 2 (controle positivo) com  $p < 0,001$ . No grupo 5 (LED + AOT) ocorreu redução de 100%, mostrando a eficácia da terapia fotodinâmica.

**Palavras chave:** Terapia Fotodinâmica, *S. mutans*, diodo emissor de luz.



## LETHAL FOTOSSENSIBILIZATION WITH RED LED AND TOLUIDINE BLUE ON DENTAL PLAQUE FORMATION

### ABSTRACT

The bacterial plaque is non a calcified deposit, constituted of bacteria, epithelial cells, macromolecules and alimentary remains, that adhere to the surface of the tooth and they constitute the first step for the development of the dental decay. The *Streptococcus mutans* are the principal etiologic disease agent, whose treatment consists of the mechanical removal (curette and bear), eliminating the infected tissue. The light when associated to dyes (photosensitize substance), they promote necrosis and cellular death, eliminating the bacteria in a short period of time, acting as a way less invasive, less painful and reducing the disease treatment. The elimination of microorganisms of the oral cavity is essential to prevent the risk of local infections and systemic. The aim of this study was to investigate the effect of toluidine blue (100 µg/mL), in combination with a light emitting diode (LED – 635 nm), on a middle of culture (broth sacaroses) with *Streptococcus mutans*. The LED used in this study emited a light at 640 nm and power output of 116 mW. The energy was 21 J and the fluency was 2,18 J/cm<sup>2</sup> achieved after irradiation for 180 s. Samples were prepared and it was showed in five groups: 1- Control group(-), 2- Control group(+), 3- Toluidine blue, 4- LED, 4- LED + Toluidine blue. The dental plate consisted of extremely large numbers of bacteria, 100% were killed following irradiation with LED and Toluidine Blue. The formation of dental plate was observed by digital photography and MEV. It was discovered that PDT could be efficient in reduction of microorganisms and dental plate formation without any harm in healthy tissues.

**Key world:** Photodynamic Therapy, *S. mutans* Light Emitting Diode.

## Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura morfológica de uma célula de streptococos (Jawetz et al., 1991)	7
Figura 2: Cadeia de <i>Streptococcus mutans</i> (TORTORA et al., 2000)	7
Figura 3: Ação do corante na célula (Tita, 2001)	10
Figura 4: Estrutura química do azul de orto toluidina (AOT) (Edward, 1971)	11
Figura 5: Corpo de prova em caldo sacarosado	21
Figura 6: Tubos de ensaio com caldo sacarosado	23
Figura 7: LED posicionado em plataforma de irradiação	25
Figura 8: Irradiação sobre a placa de Petri contendo a cultura de <i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	28
Figura 9: Contador de colônias Phoenix CP 600	29
Figura 10: Porta amostra com bengalas	30
Figura 11: Câmara a vácuo	30
Figura 12: Fotografia MEV-JEOL	31
Figura 13: Presença de placa bacteriana evidenciada nos grupos 2(a), 3(b) e 4(c)	33
Figura 14: Ausência de placa bacteriana no corpo de prova - grupo 5	33
Figura 15: MEV de corpos de prova grupo 1 (a) e grupo 5 (b) - 100 x.	34
Figura 16: MEV de corpos de prova grupo 1 (a) e grupo 5 (b) - 1000 x.	34
Figura 17: MEV de corpos de prova grupo 1 (a) e grupo 5 (b) - 5000 x.	34
Figura 18: MEV de corpos de prova grupo 2 (a), grupo 3 (b) e grupo 4 (c) -5000 x.	35

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Principais agentes fotossensibilizadores (corantes) e suas respectivas bandas de absorção (GARCEZ et al., 2003)	9
Tabela 2: Componentes do caldo sacarosado utilizado	22
Tabela 3: Protocolo utilizado na irradiação com o LED	25
Tabela 4: Tabela 4: Divisão dos Grupos	26
Tabela 5: Contagem em UFC de <i>S. mutans</i> /mL de caldo sacarosado nos diferentes grupos testados	36

## Lista de abreviaturas e símbolos

LED: *Light Emitting Diode* (Em Português-diodo emissor de luz)

AOT: azul de orto toluidina

TFD: Terapia fotodinâmica

S. mutans: *Streptococcus mutans*

µg/mL: micrograma por mililitro

MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura

nm: nanômetro

pH: potencial hidrogeniônico

LASER: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Em Português - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação).

He-Ne: Hélio Neônio

GaAlAs: Arsenieto de Gálio e Alumínio

mW: miliwatts

AlPcS: Ftalocianina alumínio dissulfonada

s: segundo

J: Joule

J/cm<sup>2</sup>: Joule por centímetro quadrado

µM: micro mol

TSB: caldo trípico de soja

g: grama

mL: mililitro

°C: grau Célcius

TPI: tempo pré - irradiação

UFC/mL: unidade formadora de colônia por mililitro

W: Watt

cm<sup>2</sup>: centímetro quadrado

W/cm<sup>2</sup>: Watt por centímetro quadrado

## Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	5
2.1 Microbiota bucal	5
2.1.1 <i>Streptococcus mutans</i>	6
2.2 Fototerapia	8
2.2.1 Fototerapia com luz coerente, na região do vermelho do espectro eletromagnético (laseres)	11
2.2.2 Fototerapia com luz não coerente, na região do vermelho do espectro eletromagnético (LEDs)	17
3. Objetivos	20
4. Material e método	
4.1 Aspectos éticos	21
4.2 Confecção dos corpos de prova	21
4.3 Cepa testada	22
4.4 Meio de cultura	22
4.5 Experimentos pilotos	23
4.6 Fonte de luz	24
4.7 Substância fotossensibilizadora	25
4.8 Grupos	26
4.8.1 Preparo do inóculo bacteriano (Escala Nefelométrica de Mac Farland-PROBAC)	26
4.8.2 Tratamento dos grupos	26
4.9 Interpretação dos resultados	28
5. Análise estatística	32
6. Resultados	33
6.1. Avaliação da formação de placa bacteriana <i>in vitro</i>	33
6.2. Análise da atividade antibacteriana (contagem de UFC/mL de caldo sacarosado)	35
7. Discussão	37

8. Conclusões	41
Referências	42
Apêndice A	49
Apêndice B	51
Anexo A	53
Anexo B	54
Anexo C	56

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a prevenção tem sido de fundamental importância em vários segmentos da área da saúde, e como a Odontologia é uma especialidade atenta à prevenção, as causas da cárie dental vêm sendo estudadas exaustivamente.

Os dentes são locais ideais para a colonização e crescimento bacteriano. Ao contrário das superfícies mucosas, não são constantemente renovadas pela descamação das células epiteliais (CURY et al., 2001).

A placa bacteriana está relacionada às fases iniciais do desenvolvimento da cárie dentária, que é uma doença infecto-contagiosa. A cárie atinge os tecidos calcificados dos dentes, causando primeiramente desmineralização da parte inorgânica, progredindo para a destruição da parte orgânica do dente. Clinicamente existe uma grande limitação entre a identificação de zonas infectadas das estruturas dentais saudáveis, culminando, muitas vezes, em remoção de tecido sadio durante os procedimentos restauradores (BURNS et al., 1994).

A placa bacteriana pode ser definida como uma película não calcificada, fortemente aderida às superfícies dentais (WILSON, 2001). Em sua composição são encontrados microrganismos (70-80%), polissacarídeos, células epiteliais descamadas, leucócitos, enzimas, sais minerais, glicoproteínas salivares, pigmentos e restos alimentares. Inicialmente sua colonização é formada principalmente por microrganismos facultativos Gram-positivos, como *Streptococcus* e *Actinomyces*, os quais aderem à película através de adesinas; essa película tem função determinante na composição da microbiota inicial (CURY et al., 1997) e os estreptococos constituem parte essencial da microbiota que coloniza as mucosas e os dentes (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1994).

Poucas horas após a exposição de uma superfície dental totalmente limpa ao ambiente oral, essa superfície não só estará revestida pela película, como também por vários cocos. As bactérias se espalham pela superfície em camadas, nas quais os microrganismos são embebidos em uma matriz intermicrobiana, e no período de 24 horas a superfície do dente fica completamente embebida por inúmeros microrganismos (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1994).

A maior parte das espécies microbianas está presente na estrutura de biofilmes, que são verdadeiras membranas vivas. Assim, os efeitos dos antimicrobianos, tanto tópicos quanto sistêmicos, tendem a serem minimizados pela natureza do biofilme, estimulando a avaliação de novas modalidades terapêuticas (LOPES, 2004).

Os microrganismos causadores da cárie formam colônias que aderem à superfície dentária dando origem à placa bacteriana. Sob condições favoráveis, as bactérias, podem fermentar açúcares, principalmente sacarose, produzindo ácidos que, por sua vez, causarão a desmineralização do esmalte dentário (CHANT et al., 2001) e conseqüentemente a cárie.

A redução de microrganismos patogênicos da superfície dental é fundamental na prevenção e controle da cárie, que é uma doença de origem bacteriana, infecciosa, crônica e transmissível. Depende da interação dos seguintes fatores: microrganismos cariogênicos, dieta rica em sacarose e carboidratos, hospedeiro susceptível e tempo sem higienização (PINELLI; SERRA, 1999).

A sacarose é considerada o carboidrato mais cariogênico presente na placa bacteriana (CURY et al., 2001). Sendo fermentável, mantém baixos índices de pH (potencial hidrogeniônico), o que induz a trocas na microbiota da placa bacteriana, favorecendo a um aumento dos *Streptococcus mutans*.

*S. mutans* atua como o principal agente etiológico da cárie, pois é o responsável por formar ácido láctico, o qual inicia a destruição do esmalte dentário. Como não são removidos pela saliva, formam uma camada com proteínas salivares e algumas macromoléculas, chamada de película adquirida. Essa película será a responsável pela formação do biofilme bacteriano, que é formado por bactérias mais resistentes ao tratamento com antimicrobianos que as demais bactérias (SOUKOS et al., 2003). Estes microrganismos produzem, a partir da sacarose, glucanos e frutanos, mecanismo este de virulência que permite a aderência dos microrganismos a uma superfície sólida (WHILEY; BEIGHTON, 1998).

Atualmente o tratamento da doença cárie consiste na remoção mecânica (curetas e brocas), eliminando todo ou parte do tecido contaminado. Vários métodos alternativos estão sendo estudados, com a finalidade de encontrar uma maneira menos invasiva, menos dolorosa e mais rápida para a remoção da cárie.



Como a remoção da placa bacteriana, por instrumentos manuais e ultra-sônicos tem suas limitações, o uso de agentes antimicrobianos, para que se possa fazer um controle químico da placa tem sua importância (TORRES et al., 2000). No entanto, esses agentes químicos e antimicrobianos, podem acarretar em resistência de algumas espécies bacterianas e desse modo, o uso dos lasers com diferentes comprimentos de onda pode ter um importante significado no tratamento alternativo da placa e cárie dental (TUCKER et al., 1996).

Na Odontologia, os lasers e LEDs estão sendo utilizados principalmente como auxiliares na redução bacteriana (GARCEZ et al., 2003; ZANIN, 2005). Na maioria dos casos, são lasers de alta potência, que emitem grandes intensidades luminosas, causando modificações estruturais nos tecidos dentais. No entanto, os lasers de baixa potência (LBP) ou LEDs, quando associados a corantes, podem levar à morte ou redução dos microrganismos, sem causar danos ao organismo, processo conhecido como fotossensibilização letal ou terapia fotodinâmica. Há alguns anos, essa terapia foi adaptada para a utilização em bactérias. O princípio da fotossensibilização letal é igual ao da terapia fotodinâmica (TFD), utilizada para o tratamento de tumores. A luz ativa um corante depositado no organismo alvo e o sensibilizará em duas vias distintas, seja por meio do sistema redox, promovendo, após interação com o meio, uma resposta citotóxica que produz radicais livres com conseqüente morte da célula bacteriana, seja por meio da liberação de energia ocorrida após a radiação ter atingido o corante no organismo alvo, transformando o oxigênio em nível molecular em oxigênio singlete, citotóxico para as bactérias (GONÇALVES, 2005).

Vários estudos foram feitos associando diferentes fotossensibilizadores ao LBP com diferentes comprimentos de onda (WILSON et al., 1992; BURNS et al., 1994). A substância fotossensibilizadora funciona como um agente de absorção óptica ou cromóforo, e é fundamental o uso de um corante ressonante com comprimento de onda do laser.

A TFD pode ser efetiva no tecido dentário cariado, em doenças periodontais e em canais radiculares infectados, com a vantagem de que as bactérias podem ser eliminadas em um curto período de tempo (segundos ou minutos), podendo ser uma alternativa ao uso de antibióticos e antissépticos na eliminação das mesmas (WILLIAMS et al., 2004).

As substâncias fotossensibilizadoras mais estudadas são os derivados da hematoporfirina, fenotiazinas (azul de metileno e azul de toluidina), cianinas e ftalocianinas. Possuem estruturas semelhantes à clorofila e à hemoglobina. Na eliminação de bactérias cariogênicas, o azul de metileno e o azul de toluidina são os corantes mais encontrados na literatura. São empregados em baixas concentrações, pois, em altas concentrações, mostraram efeitos tóxicos sobre células do hospedeiro e bactérias (GARCEZ et al., 2003). Em recentes estudos, o azul de metileno tem sido usado na inativação de diversos vírus, e o azul de toluidina como uma droga antifúngica e antibacteriana, inativando leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (USACHEVA et al., 2001).

A eliminação de microrganismos da cavidade bucal é fundamental para prevenir o risco de infecções locais e sistêmicas, e muitos agentes antimicrobianos têm mostrado certa eficácia, porém a resistência de algumas bactérias Gram-negativas a determinados medicamentos, mostra a necessidade de métodos alternativos. Além disso, a morte das bactérias, sem que nenhum tecido dentário seja removido, é uma vantagem a ser considerada (WILSON, 2004). Esta limitada precisão no tratamento da doença cárie justifica a investigação e desenvolvimento de técnicas que reduzam a remoção de tecido desmineralizado/contaminado, preservando tecido hígido.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Microbiota bucal

A microbiota bucal é altamente complexa e diversificada. São encontradas cerca de 500 espécies bacterianas, além de protozoários, fungos e vírus (SUZUKI et al., 2005). O aparecimento de doenças bucais depende essencialmente da presença dos microrganismos, que durante o metabolismo dos carboidratos formam ácidos e produtos metabólicos (SVENSATER et al., 2003). Esse processo só ocorre quando há um desequilíbrio no ecossistema bucal.

Os dentes são estruturas sólidas que oferecem locais ideais para a colonização de microrganismos. A placa bacteriana é definida como uma comunidade de bactérias intimamente associadas umas com as outras (BORTOLAIA; SBORDONE, 2002), que aderem à película adquirida sobre a superfície do dente. Sua microbiota inicial é formada por *Actinomyces*, *Neisseria*, *Streptococcus sanguines*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis* (ZANIN et al., 2002).

A etiologia da cárie dental baseia-se na dieta rica em carboidratos (principalmente sacarose) e na presença de microbiota com potencial cariogênico. Um aumento na frequência e consumo de sacarose favorece o desenvolvimento de espécies acidúricas, como os *S. mutans* e *Lactobacillus* (HOUTE, 1994).

A diversidade da microbiota bucal dificulta a determinação das bactérias que atuam no aparecimento das lesões de cárie. No entanto, vários autores afirmam que o grupo dos estreptococos (principalmente *S. mutans*) estão relacionados com o início da lesão de cárie (MARCHANT et al., 2001).

A desmineralização das estruturas dentais é produzida pelos ácidos provenientes das bactérias cariogênicas. Com o consumo frequente de carboidratos, ocorre a diminuição do potencial hidrogênionico (pH) bucal, o que favorece o início do processo de desmineralização, que, se não controlado, leva ao aparecimento da lesão cariosa (CURY et al., 2001).

A lesão de cárie consiste em uma grande área desmineralizada, que atinge primeiramente os tecidos calcificados dos dentes e progride para a destruição da parte

orgânica, contendo uma área infectada com bactérias que clinicamente é muito difícil de diferenciar (BURNS et al., 1994).

Como a cárie e a doença periodontal estão diretamente relacionadas com as bactérias presentes na boca, e, as conseqüências dessas doenças podem interferir na saúde de um indivíduo, tratamentos alternativos que combatam essas bactérias são fundamentais. Atualmente, têm-se aumentado o número de estudos para substituir ou complementar a terapia mecânica com o uso de antibióticos (WILSON et al., 1996), pois o uso freqüente desses agentes pode resultar no desenvolvimento de resistência por algumas bactérias. Desse modo, o uso de várias substâncias que “evidenciem” as bactérias tem sido recomendado para facilitar a remoção da dentina infectada e proporcionar o desenvolvimento de uma terapia que preserve a maior quantidade de tecido dental (BURNS et al. 1994; BURNS et al., 1995). Outra vantagem a ser considerada é que a morte bacteriana pode ser rápida, não sendo necessário o uso de agentes químicos em altas concentrações por um longo período, como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos.

### **2.1.1 *Streptococcus mutans***

Os estreptococos correspondem a um conjunto heterogêneo de cocos, que agregam-se em cadeias, com tamanho entre 0,8 e 1,0µm. Embora façam parte da microbiota residente, muitos são considerados agentes infecciosos para o homem e para os animais. É considerado o principal agente etiológico da cárie dentária, além de ser um importante agente na ocorrência de endocardite infecciosa (LOESHE, 1986). A figura 1 ilustra a estrutura de uma célula do gênero *Streptococcus* e a figura 2 uma cadeia de *S. mutans*.

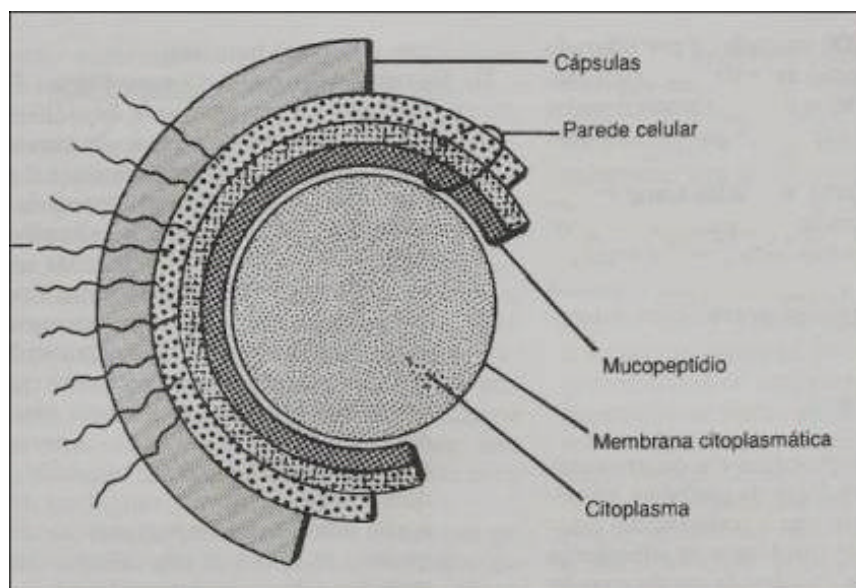


Figura 1: Estrutura morfológica de uma célula de *Streptococcus*.

Fonte: Jawetz et al. (1991)

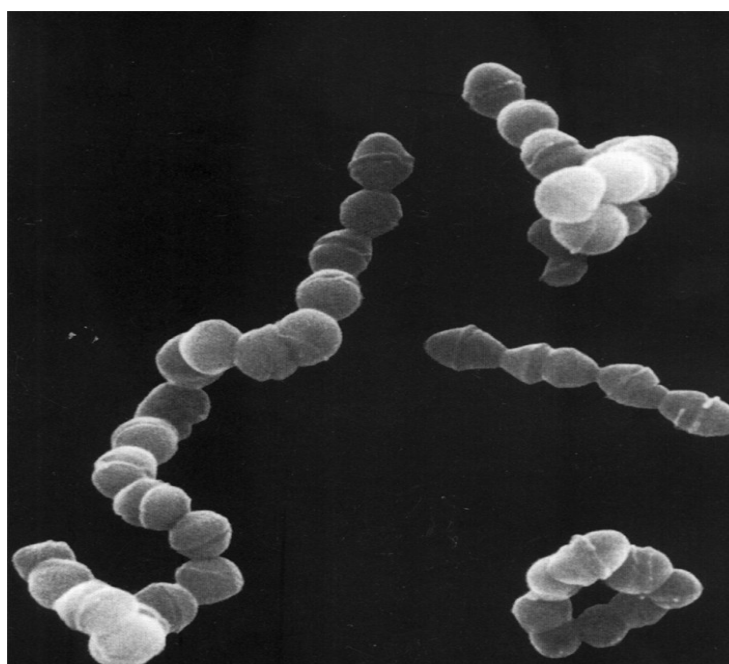


Figura 2: Cadeia de *S. mutans*.

Fonte: Tortora et al. (2000).

Os estreptococos do grupo mutans são cocos Gram-positivos, alfa-hemolíticos (causam lise parcial de hemácias) e anaeróbios facultativos (OIVEIRA, 2004). O aumento desses microrganismos está relacionado com o alto consumo de açúcar juntamente com a diminuição do pH da cavidade bucal.

Quando altos níveis de açúcar são consumidos, essas bactérias produzem ácido láctico em quantidade muito superior aos demais microrganismos da cavidade oral (LOESCHE, 1986), e sua atividade continua mesmo em baixos valores de pH, tanto em meio ácido, como em meio neutro ( KOHLER et al., 1995).

Existe uma relação inquestionável entre *S. mutans* e a cárie dentária (HOUTE, 1994; HAMADA; SLADE, 1980), e vários autores afirmam que o risco de cárie é diretamente proporcional ao aumento do número de *S. mutans* na saliva (LOESCHE, 1986; JORGE, 1998).

A boca humana é o habitat natural de *S. mutans* (HAMADA; SLADE, 1980), porque eles produzem polissacarídeos extracelulares e devido à sua viscosidade aderem facilmente a superfícies lisas como a superfície dentária (LOESCHE, 1986), facilitando a formação de placa bacteriana e posteriormente o desenvolvimento da cárie dentária.

A placa bacteriana consiste em uma mistura complexa de microrganismos que aderem facilmente uns aos outros, e na maioria dos casos à superfície dental. Os *S. mutans* possuem essa facilidade de adesão aos demais microrganismos e a superfície dental, tornando-os pioneiros na formação da placa dental.

## **2.2 Fototerapia**

A utilização da luz, associada a uma substância fotossensível sobre a eliminação de microrganismos, surge como uma nova modalidade de tratamento odontológico, curador e restaurador. A terapia fotodinâmica foi idealizada para o tratamento de câncer, surgindo como uma alternativa que pode ser associada aos tratamentos convencionais. O tratamento consiste na aplicação de uma substância fotossensibilizadora local ou por via sistêmica, a qual ficará retida nas células neoplásicas, para receber a irradiação com adequado comprimento de onda (PALECKIS et al., 2001). Há alguns anos essa terapia foi adaptada

para o uso sobre bactérias. Os estudos sobre a ação antimicrobiana dos LBPs foram iniciados na década de 90, baseados na indução de morte de bactérias previamente sensibilizadas por um cromóforo. É uma técnica minimamente invasiva que utiliza substâncias fotossensibilizadoras, com propriedade de ativação por uma fonte de luz específica (OKAMOTO et al., 1992).

Tabela 1- Principais agentes fotossensibilizadores (corantes) e suas respectivas bandas de absorção.

<b>Corantes</b>	<b>Banda de Absorção</b>
Derivados da hematoporfirina	620-650 nm
Fenotiazinas (azul de toluidina e azul de metileno)	620-700 nm
Cianinas (indocianina verde)	600-805 nm
Fitoterápicos (azuleno)	550-700 nm
Ftalocianinas	660-700 nm

Fonte: Garcez et al. (2003).

Uma substância fotossensibilizadora funciona como um agente de absorção óptica. Assim, quando as bactérias são irradiadas, ocorre absorção de fótons pelo corante, o qual tem suas moléculas convertidas para um estado de excitação. Nesse estado, a energia transferida da fonte de luz para moléculas do corante resulta na formação de moléculas reativas como o oxigênio singleto que podem danificar e /ou matar células bacterianas (DOBSON; WILSON, 1992), como mostra o esquema na figura 3.

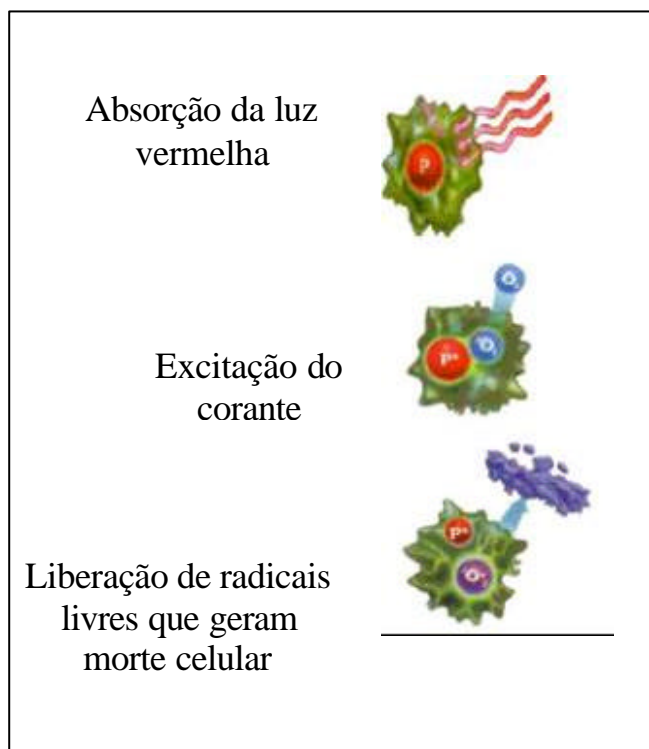


Figura 3: Ação do corante na célula.

Fonte: Tita (2001).

Para produzir efeito antibacteriano, o corante precisa ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficiente e minimamente tóxico aos tecidos normais (GARCEZ et al., 2003). Quanto menos tóxicos forem os corantes e com bandas de absorção próximas ao comprimento de onda das luzes utilizadas, a eficácia da terapia é elevada, sem causar danos aos tecidos adjacentes (BHATTI et al., 1997).

O azul de orto toluidina (AOT) é uma substância fotossensibilizante amplamente estudada (figura 4), que adere mais facilmente à membrana bacteriana do que muitos corantes utilizados, gerando grande concentração de corante na célula, o que produz maior efeito antibacteriano (USACHEVA et al., 2001). Segundo Ito (apud USACHEVA, 2001), é considerado um eficaz destruidor bacteriano, pois faz ligação com o polifosfato presente na membrana bacteriana, causando prejuízo aos lipídeos, proteínas e algumas enzimas. Pequenas quebras nas moléculas de DNA também são observadas.



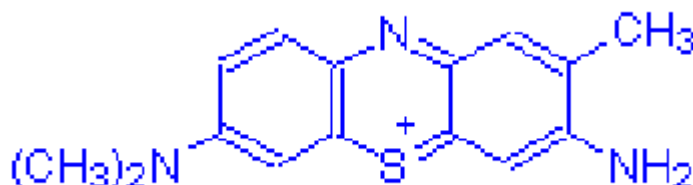


Figura 4: Estrutura química do azul de orto toluidina (AOT).

Fonte: Edward (1971).

### **2.2.1 Fototerapia com luz coerente na região do vermelho do espectro eletromagnético (laseres).**

A literatura vem mostrando a eficácia da TFD na eliminação e /ou redução de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas. A placa bacteriana é um fator etiológico para a doença cárie e doença periodontal, assim a redução microbiana da cavidade oral é extremamente válida. Vários estudos foram feitos associando diferentes fotossensibilizadores à LBP (luz coerente) com diferentes comprimentos de onda (WILSON, 1994; BURNS et al., 1994). A luz coerente na região do vermelho do espectro eletromagnético tem sido empregada na área da saúde com diversos fins terapêuticos. Com o desenvolvimento da tecnologia laser pode-se obter um número variado de equipamentos de emissão em baixa potência. A luz laser é uma radiação eletromagnética não ionizante, emitindo fótons com comprimento de onda específico. Esses fótons podem produzir reações fototérmicas (laseres de alta potência) ou reações fotoquímicas (laseres de baixa potência) (TUNER; HODE, 1999). Os laseres de diodos, emitindo em baixa potência, são os mais empregados atualmente, cujos comprimentos de onda mais utilizados, em atividades de pesquisa e clínica, compreendem de 600 a 1000nm. A luz laser é formada por ondas monocromáticas e coerentes. A monocromaticidade é considerada um dos atributos mais importantes em terapia com LBP, pois determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente determinando portanto, a interação fotobiológica e os efeitos terapêuticos específicos (BAXTER, 1997). Além de emitir um único comprimento de onda,

a onda eletromagnética correspondente a cada topo está em fase no tempo e no espaço, contribuindo com a intensidade e direcionalidade do feixe (BAXTER, 1997). A polarização ocorre quando as ondas de luz estão orientadas em um só plano, linear ou circular. Esta propriedade caracteriza a emissão de fótons unidirecionais e paralelos entre si (TUNER; HODE, 1999; BAXTER, 1997).

Os LBPs empregados com a finalidade de restabelecer o equilíbrio biológico e celular (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998), passaram a ser estudados também com a finalidade de eliminar bactérias.

Okamoto et al. (1992), já relatavam a ação antimicrobiana dos LBPs. Estudaram o laser de He-Ne (632,8 nm - 40 mW) em conjunto com dez diferentes corantes sobre os microrganismos causadores da placa e da cárie dentária (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus cricetus*). O tempo de irradiação foi de 600 s com 24 J de energia. Encontraram redução bacteriana em todas as espécies de *Streptococcus*.

Dobson e Wilson, (1992), concluíram que infecções que acometem a cavidade bucal, como a cárie e a doença periodontal, podem ser tratadas através da TFD. Os autores estudaram as seguintes bactérias: *Streptococcus sanguines*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces actinomycetemcomitans*. Utilizaram o laser de He-Ne (632,8 nm - 7,3 mW) com azul de toluidina e azul de metileno. As bactérias foram irradiadas por 10 s, 30 s e 60 s com as seguintes densidades de energia respectivamente: 5,5 J/cm<sup>2</sup>, 16,5 J/cm<sup>2</sup> e 33 J/cm<sup>2</sup>.

Sarkar e Wilson (1993), retiraram amostras de placas subgengivais de pacientes com periodontite crônica para a realização da TFD. O laser utilizado foi de He-Ne (632,8 nm - 7,3 mW) por um tempo de 30 s com 0,20 J. O corante utilizado foi o azul de toluidina (50µg/mL). Ocorreu redução de 91,1% das bactérias aeróbicas e 96,6% das bactérias anaeróbicas (94,4% dos *Streptococcus*). O corante e o laser, isoladamente, não ocasionaram redução bacteriana.

Wilson (1994), mostrou a necessidade de métodos alternativos para o tratamento da placa bacteriana e da cárie dentária, a fim de evitar a resistência das bactérias com o uso de antibióticos e anti-sépticos. Utilizou o laser de He-Ne (632,8 nm) e GaAlAs (650 nm), com o azul de toluidina e a ftalocianina alumínio dissulfonada respectivamente. Ocorreu

significativa redução das bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas em um curto período de tempo, com ambos os corantes (60 s). No mesmo ano, o autor mostrou o efeito antibacteriano de substâncias fotossensibilizadoras (azul de toluidina, ftalocianina e azuleno) em conjunto com o laser sobre bactérias da cavidade bucal responsáveis pela cárie, doença periodontal e infecções endodônticas. O estudo permitiu concluir que essa terapia pode ser usada como uma alternativa ao uso de antibióticos e antissépticos na eliminação de bactérias.

Burns et al. (1994), mostraram que a TFD pode ser usada na eliminação de bactérias da cárie dentária. Utilizaram um laser de GaAlAs (660 nm – 11 mW) com uma ftalocianina alumínio dissulfonada. Irradiaram por 30 s com 0,33 J e por 90 s com 0,99 J. Mostraram que ocorreu significativa redução bacteriana, mas a morte bacteriana ocorreu somente quando o laser foi utilizado juntamente com a substância fotossensibilizadora.

Wilson et al. (1995) mostraram o efeito da TFD sobre os *Staphylococcus aureus*, pois essa bactéria é responsável por uma variedade de infecções bucais. Utilizaram um laser de GaAlAs (660 nm – 11 mW) com uma ftalocianina alumínio dissulfonada (AlPcS – 12,5 µg/ml), por 60 s (0,66 J) e 300 s (3,3 J). Os resultados mostraram uma redução de 99,6% (60 s) e 99,9% (300 s).

Burns et al. (1995), estudaram o azul de toluidina e a ftalocianina alumínio dissulfonada em suspensões de bactérias cariogênicas, embebidas em matriz de colágeno e em secções de dentina desmineralizada. Ambas as amostras foram expostas ao laser de He-Ne (632,8 nm -7,3 mW) por 120 s (0,876 J), 240 s (1,752 J) e 480 s (3,5 J) e ao laser de GaAlAs (660 nm-11 mW) por 120 s (1,32 J), 240 s (2,64 J) e 480 s (5,28 J). Ambas as substâncias fotossensibilizadoras apresentaram concentrações de 50 µg/mL. Os resultados mostraram 99,99% de eficácia da terapia em eliminar os *S. mutans*, tanto no colágeno quanto nas secções de dentina, quando irradiados por 480s (He-Ne – 3,5 J) e (GaAlAs – 5,28 J), por ambos os lasers.

Soukos et al.(1996), avaliaram o efeito do laser de He-Ne (632,8 nm - 7,3 mW) com o azul de toluidina sobre *S. sanguines*, fibroblastos e queratocistos. A cultura de bactéria foi irradiada por 75 s (0,547 J) com 42,1 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia, obtendo resultados satisfatórios. Este estudo mostrou que o azul de toluidina pode ter um efeito tóxico sobre os

queratocistos e fibroblastos. Esse efeito é dose dependente, portanto, deve-se utilizá-lo em baixas concentrações para que possa ser eficaz sem causar danos aos tecidos. Com 0,88 J de energia por 120 s a viabilidade dos fibroblastos e queratocistos não foi alterada, mostrando a possibilidade de realização dessa terapia.

Bhatti et al. (1997), estudaram o efeito da TFD utilizando o laser de He-Ne (632,8 nm - 7,3 mW) e o corante azul de toluidina (12,5; 25 e 50 µg/ml) sobre *Porphyromonas gingivalis*, que são bactérias presentes em bolsas periodontais. Avaliaram diversos aspectos, como, a concentração da droga fotossensibilizadora, o pH, o tempo pré irradiação (TPI) e a fase de crescimento das bactérias. Os resultados mostraram maior redução bacteriana (99,9%) quando utilizou-se 4,4 J de energia que correspondeu a 2,2 J/cm<sup>2</sup>. O aumento da concentração do corante não mostrou diferenças na eliminação das bactérias.

De Simone et al.(1999), estudando a TFD, compararam dois lasers: He-Ne (632,8 nm - 0,95 mW) e GaAlAs (660 nm – 5 mW) no efeito antimicrobiano de microrganismos bucais. Ambos os lasers foram utilizados em conjunto com o azul de toluidina por 30 s (He-Ne - 0,02 J e GaAlAs - 0,15 J ), 60 s (He-Ne - 0,04 J e GaAlAs - 0,30 J) e 120 s (He-Ne - 0,08 J e GaAlAs - 0,60 J). O maior efeito bacteriano ocorreu com o laser de GaAlAs – 5 mW com 120 s de exposição.

Usacheva et al. (2001), estudaram o efeito do azul de toluidina e do azul de metileno juntamente com um laser de argônio com 630 nm e um laser de diodo com 664 nm na eliminação de algumas bactérias bucais (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*). A densidade de energia variou de 10 J/cm<sup>2</sup> a 60 J/cm<sup>2</sup> em ambos os lasers. Concluíram que a redução bacteriana é dependente da concentração do corante utilizado e da dose do laser. Ambos os corantes testados com a mesma dose de radiação foram eficazes no tratamento.

Komerik e Wilson (2002), observaram a ação da TFD sobre algumas bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*). Utilizaram o laser de He-Ne (632,8 nm – 35 mW) com o corante azul de toluidina. Relataram redução microbiana em todas as bactérias testadas.

No mesmo ano, Zanin et al. demonstraram que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus acidophilus* e *Lacobacillus casei*, podem ser eliminados pela associação de um laser diodo (660 nm) com 21 mW e 18,9 J com o corante AOT (100 µg/mL). A terapia produziu efeito bactericida total na viabilidade dos microrganismos após 900s de irradiação, atingindo densidade de energia de 28,8 J/cm<sup>2</sup>.

Seal et al. (2002), compararam o efeito bacteriano da TFD com hipoclorito de sódio sobre os *Streptococcus intermédius* nos biofilmes dos canais radiculares. Foram utilizados 35 dentes uniradiculares preparados apicalmente com a lima 25. O laser utilizado foi o He-Ne (632,8 nm – 35 mW) e o corante foi o azul de toluidina, nas seguintes concentrações: 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. A energia utilizada foi de 2,1 a 21 J e o maior efeito bactericida ocorreu com 21 J de energia com 100 µg/mL do corante. A terapia mostrou efeito bactericida, mas não foi mais eficaz que o hipoclorito de sódio a 3%.

O'Neill et al.(2002), mostraram que várias espécies de bactérias bucais que formam os biofilmes podem ser eliminadas pelo azul de toluidina (25 µg/mL) fotossensibilizado pelo laser de He-Ne (632,8 nm – 35 mW). As bactérias presentes no biofilme eram: 32,8% *Streptococcus*, 6,5% *Veillonella*, 0,1% *Actinomyces*. Ocorreu redução bacteriana de 97,4% utilizando o laser com 31,5 J e o azul de toluidina.

Williams et al.(2002), estudaram um novo modelo de acoplamento óptico para aumentar a potência da luz. Utilizaram neste estudo um laser diodo de 633 ± 2 nm com o corante azul de toluidina. Este sistema permitiu atingir uma potência de até 80 mW, contra 7,3 mW atingidos anteriormente. Os resultados mostraram que a energia de 1,8 J eliminou 100% das bactérias. Nem o corante nem o laser, isoladamente, tiveram efeito antimicrobiano significativo.

Chan e Lai (2003), compararam o efeito da TFD sobre bactérias periodontopatogênicas com lasers em diferentes comprimentos de onda. Foram utilizadas culturas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguínes*. Tais microrganismos foram expostos aos seguintes lasers : He-Ne (632,8nm - 30mW), diodo (665 nm – 100 mW) e diodo (830 nm – 100 mW), na presença do azul de metileno como

corante. Nesse estudo o laser diodo (665 nm – 100 mW) com 60 s de exposição, 6 J de energia e 21,2 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia, eliminou 95% das bactérias estudadas.

Shibli et al. (2003), avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica em um estudo com cachorros induzindo-lhes peri-implantite por dois meses. Utilizaram o azul de toluidina (100 µg/mL) e o laser de GaAlAs (685 nm – 50 mW), expostos a 80 s com 4 J de energia. As bactérias estudadas foram: *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium e Streptococcus*. A completa eliminação foi atingida em 50% das amostras de *Prevotella intermedia*, em 54,5% das amostras de *Fusobacterium* e 11,2% das amostras de *Streptococcus*. Nas demais amostras ocorreu apenas redução bacteriana.

Komerik et al. (2003), estudaram o efeito antibacteriano do azul de toluidina com um laser diodo (630nm), sobre bactérias presentes na mucosa bucal de ratos. O azul de toluidina foi utilizado nas concentrações de 50; 100 e 200 µg/mL, e o laser com doses de 110, 170 e 340 J/cm<sup>2</sup>. Um dos grupos recebeu apenas 200 µg/mL de corante e um outro grupo apenas 340 J/cm<sup>2</sup> do laser. Ocorreu redução bacteriana com 50 µg/mL de corante e menor dose de energia (6 J). O estudo mostrou que a TFD pode ser um método antimicrobiano seguro sem danos aos tecidos adjacentes.

Williams et al. (2004) estudaram a ação antibacteriana do azul de toluidina (10 µg/mL) fotossensibilizado por um laser de He-Ne (632,8 nm) sobre uma matriz de colágeno e dentina cariada, ambos infectados por *S. mutans*. No colágeno a terapia foi testada por 30 s (1,8 J) e por 180 s (14,4 J). Já na dentina o tempo utilizado foi 30 s e 60 s, ambos com 4,8 J de energia. Os resultados foram mais eficazes quando utilizado o maior período de tempo.

Mais recentemente, Lee et al. (2006), demonstraram a ação de um laser diodo na redução de *S. mutans* em pedaços de dentina humana com espessuras variadas (500, 1,000, e 2,000 µm). Inocularam 2 mL da bactéria de um lado da amostra e irradiaram o outro lado, com 0,5 W a 7 W por 30 s. Os resultados mostraram a eliminação de 97,7% das bactérias em 500 µm de espessura de dentina com 7 W. Com o aumento da espessura, a redução bacteriana diminuiu.

Apesar de inúmeros estudos realizados com laser associado à corantes em TFD, atualmente têm-se iniciado a investigação acerca do emprego de luz não coerente na região do vermelho nessa terapia.

### **2.2.2 Fototerapia com luz não coerente na região do vermelho do espectro eletromagnético (LEDs)**

A maioria dos estudos sobre TFD para obter ação antimicrobiana, utiliza lasers de baixa potência com diferentes comprimentos de onda. Atualmente, os LEDs (*light emitting diode*), diodos emissores de luz, vêm surgindo como fontes de radiação alternativa para essa terapia. Os LEDs são dispositivos semi-condutores que quando polarizados adequadamente emitem luz na faixa visível ou invisível, dependendo de seus componentes (ZANIN et al., 2005).

O LED caracteriza-se por necessitar de menos energia para emissão do comprimento de onda desejado.

A luz emitida a partir do LED é produzida pelas interações energéticas do elétron e a cor é dependente do tipo de semi-condutor e da impureza de dopagem com que o componente é fabricado. O LED que utiliza o arsenieto de gálio emite radiações infravermelhas. Dopando-se com fósforo, a emissão pode ser vermelha ou amarela, de acordo com a concentração. Utilizando-se fosfeto de gálio com dopagem de nitrogênio, a luz emitida pode ser verde ou amarela (EL SAYED; DYSON, 1990).

Os LEDs podem ser usados na Fisioterapia (dores musculares crônicas e agudas), na Odontologia (tecidos inflamados e ulcerações), na Dermatologia (redução de edemas, úlcera e dermatites), e muitas outras especialidades (KARU, 2003). São aplicados diretamente na área lesada ou em vários pontos do corpo.

A utilização da radiação LED permite uma redução significativa no custo do tratamento. Porém para produzir efeito antimicrobiano, deve possuir um comprimento de

onda dentro da faixa de absorção da substância fotossensibilizadora e com isso gerar uma reação citotóxica mediada pelo oxigênio singlete (DOUHERTY, 1993).

Wood et al. (1999), demonstraram o efeito da TFD sobre biofilmes bucais *in vivo*. Utilizaram um fotossensibilizador catiônico Zn (II) ftalocianino. Irradiaram um dispositivo intra-oral que continham biofilmes com sete dias de formação com luz branca a 400 W de potência e densidade de energia de 22,5 W/cm<sup>2</sup>, para atingir o comprimento de onda entre 600-700 nm, ideal para a ftalocianina. Foi a primeira vez que a substância foi testada em biofilmes *in vivo*. Concluíram que a terapia pode ser utilizada no tratamento da placa bacteriana como alternativa ao uso de antibióticos, ou quando não é possível fazer a remoção mecânica da placa.

Paulino et al. (2005), estudaram a ação da TFD *in vitro*, sobre *S. mutans* e fibroblastos. A bactéria foi tratada com o corante Rosa Bengal (0-50 µM), irradiada com luz branca entre 400 – 500 nm, em diferentes períodos (0-40 s). Concluiu-se que a substância fotossensibilizadora acima de 2,5 µM mostrou um efeito tóxico. A luz e 0,5 µM da substância fotossensibilizadora foram eficazes na redução microbiana sem efeitos tóxicos aos fibroblastos e aos *S. mutans*.

Zanin et al.(2005), em seu doutoramento estudaram o efeito antimicrobiano do AOT (100 µg/mL) em combinação com o laser de He-Ne (632,8 nm – 32 mW) e com LED (638,8 nm – 32 mW) na viabilidade de formação do biofilme de *S. mutans in vitro*. Foram irradiados por 300 s (9,6 J com 49 J/cm<sup>2</sup>), 900 s (28,8 J com 147 J/cm<sup>2</sup>) e 1800s (57,6 J com 294 J/cm<sup>2</sup>). Ocorreu redução de 99.2% a 99.99% das bactérias em todas as doses e tempos utilizados, mostrando que a TFD pode ser uma alternativa no tratamento de doenças provenientes da placa bacteriana.

Wong et al. (2005), estudaram o efeito antibacteriano do azul de toluidina sobre o *Vibrio vulnificus* na TFD. O *Vibrio vulnificus* é uma bactéria Gram-negativa, altamente invasiva e responsável por inúmeras infecções oportunistas na cavidade bucal. Ocorreu redução bacteriana *in vitro* com dose de 100 J/cm<sup>2</sup> e 80m W/cm<sup>2</sup> de uma luz com comprimento de onda variando de 560 nm a 780 nm e 10 µg/mL de azul de toluidina, sugerindo ser uma possível alternativa para o tratamento de infecções bucais.



Mais recentemente, Wood et al. (2006), demonstraram a ação do corante eritrosina como agente fotossensibilizador em biofilmes com *S. mutans*. Foi utilizado 22  $\mu\text{M}$  de corante, irradiada por 15 minutos com 400 W de luz branca. Os resultados mostraram que a eritrosina penetra nos biofilmes de *S. mutans*, e foi mais eficaz em eliminar os microrganismos que outros corantes, como por exemplo, o azul de metileno.

### 3. OBJETIVOS

Este estudo teve dois objetivos:

- Analisar o efeito fotodinâmico do LED com pico de emissão médio em 635nm associado ao corante azul de orto toluidina sobre a formação de placa bacteriana *in vitro* através de visualização a olho nu e microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar o efeito bactericida sobre a cepa-padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), através de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

## 4. Material e Método

### 4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba, sob o Protocolo n.º LI66/2005/CEP (anexo A).

### 4.2 Confeção dos corpos de prova

Os corpos de prova (bengalas de vidro) utilizados neste estudo foram confeccionados manualmente, por um único indivíduo, a fim de padronizar o tamanho dos mesmos. Para tal, capilares de vidro foram aquecidos para dar um formato semelhante a uma bengala. A forma de bengala foi escolhida para facilitar a remoção da mesma do interior de tubos de ensaio, através de alças metálicas estéreis. Os corpos de prova (figura 5) foram empregados em meios de cultura (caldo sacarado) para fornecer uma superfície sólida propícia à formação e agregação de microrganismos, assemelhando-se aos dentes, que também constituem superfícies duras e favoráveis à formação da placa dental. Todos os corpos de prova mediam aproximadamente 2 cm de comprimento. Foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix AV 75) por 20 minutos e divididos para a formação de cinco grupos experimentais.



Figura 5: Corpo de prova em caldo sacarado.

### 4.3 Cepa Testada

Para o desenvolvimento do presente estudo utilizou-se a cepa padrão de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, ATCC 25175), previamente incubadas a 37°C por 24-48 horas em microaerofilia, pelo método da vela, para controle e análise da viabilidade da cepa. A cepa foi fornecida pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Paraíba.

### 4.4 Meio de Cultura

Tabela 2: Componentes do caldo sacarosado utilizado:

Componentes	Quantidade
TSB (caldo tripsina de soja) (DIFCO)	20 g
Cloreto de Sódio (SYNTH)	2 g
Fosfato de Potássio Dibásico (SYNTH)	3 g
Fosfato de Potássio Monobásico (SYNTH)	2 g
Carbonato de Potássio (SYNTH)	1 g
Sulfato de Magnésio (SYNTH)	0,12 g
Sulfato de Manganês (SYNTH)	0,015 g
Sacarose (SYNTH)	50 g
Água destilada	1000 mL

Os itens acima foram diluídos e aquecidos até a diluição completa. O caldo sacarosado foi dividido em tubos de ensaio (2 mL) (figura 6) e esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C; depois, foi mantido por 24 horas em estufa (incubadora Fanem 002 DB) a 37°C.

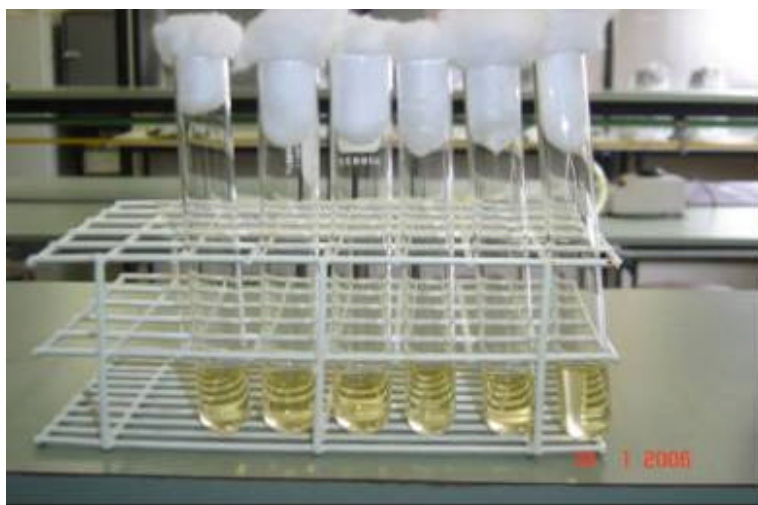


Figura 6: Tubos de ensaio com 2 mL de caldo sacarosado.

#### 4.5 Experimentos Pilotos

Para obter a padronização da técnica, vários experimentos piloto foram realizados utilizando-se amostragem exploratória (n=2). O corante (azul de toluidina) foi escolhido considerando-se a banda de absorção entre 620 e 700 nm (GARCEZ et al., 2003). A fonte de luz selecionada foi compatível a banda de absorção do corante, ou seja, um LED com pico de emissão em 635 nm, para que se possa obter efeito antibacteriano.

Foram realizados vários experimentos antes de escolher uma dose e tempo de irradiação que fossem eficaz em eliminar/reduzir as bactérias. O tempo de irradiação piloto variou de 90 s a 600 s. Foi escolhido o menor tempo capaz de promover o efeito antibacteriano. Também foram testadas várias concentrações do corante. A primeira concentração testada foi 10  $\mu\text{g/mL}$ . Essa concentração não foi eficaz em reduzir os microrganismos, então foi testada 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$ , até a escolha de uma concentração que fosse eficaz em eliminar as bactérias em associação com o LED, sem causar efeito tóxico (se empregada sozinha, reduzisse todas as unidades formadoras de colônias). Desse modo, estabeleceu-se a concentração do corante em 100  $\mu\text{g/mL}$  (BURNS et al., 1994; 1995; SEAL et al., 2002; KOMERIK et al., 2003; SHILIBI et al., 2003; ZANIN et al., 2002) e a densidade de energia de 2,18  $\text{J/cm}^2$ , obtida após 180 s

de exposição das bactérias à luz (KOMERIK et al., 2003). O volume do meio de cultura foi determinado pela quantidade necessária de líquido, nos tubos de ensaio, para cobrir totalmente o corpo de prova durante o experimento (2 mL).

Posteriormente foi avaliado o tempo pré – irradiação (TPI), ou seja, o tempo necessário para que o corante se ligue à bactéria alvo (BURNS et al., 1994; 1995; SEAL et al., 2002; ZANIN et al., 2002). Vários experimentos foram realizados variando o TPI de 1 a 30 minutos, determinando o TPI em 5 minutos, que foi o menor tempo capaz de produzir o efeito antibacteriano, reduzindo o tempo de trabalho e diminuindo também o risco de contaminação das amostras.

#### **4.6 Fonte de luz**

A fonte de luz utilizada foi um LED (Microdont®) emitindo radiação eletromagnética na faixa de 600 nm a 670 nm, com pico em 635 nm (Anexo C). A potência foi mensurada antes do início dos procedimentos (116 mW) e o tempo de irradiação foi de 180s. A distância do feixe de luz até o corpo de prova foi de 2,0 cm, para que toda a extensão da placa recebesse a mesma densidade de energia. A área irradiada foi de 9,62 cm<sup>2</sup> com densidade de energia de 2,18 J/ cm<sup>2</sup> (figura 7 e tabela 3).

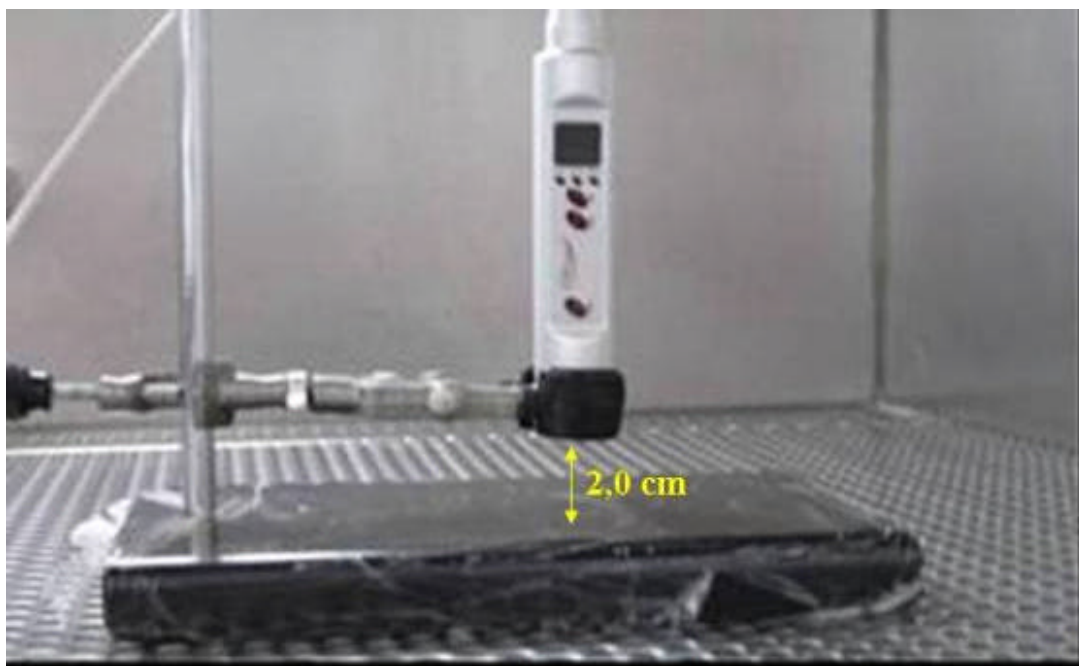


Figura 7: LED posicionado em plataforma de irradiação.

Tabela 3: Protocolo utilizado na irradiação com o LED.

Comprimento de onda (nm)	Densidade de Energia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	Energia (J)	Potência (W)	Densidade de Potência ( $\text{W}/\text{cm}^2$ )	Área ( $\text{cm}^2$ )	Tempo (s)
635	2,18	21	0,116	0,01	9,62	180

#### 4.7 Substância Fotossensibilizadora

A substância fotossensibilizadora utilizada foi o azul de orto toluidina (AOT-Fórmula & Ação) com concentração de  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  (diluição feita em água destilada), (BURNS et al., 1994; ZANIN et al., 2002). A substância estava com pH 6, medido com fita identificadora de pH (Merck).

## 4.8 Grupos

### 4.8.1 Preparo do inóculo bacteriano (Escala Nefelométrica de Mac Farland-PROBAC)

O preparo dos inóculos de *S. mutans* (ATCC 25175) seguiu o tubo da escala 0,5 de Mac Farland, obtendo-se assim, uma concentração final de  $1,5 \times 10^8$  (150 milhões) de células de *S. mutans* em 2 mL de caldo sacarosado (cultura bacteriana). Depois do preparo dos inóculos foi feita a divisão dos grupos (tabela 4), os quais foram separados em tubos de ensaio estéreis. O procedimento foi realizado em fluxo laminar, com equipamento de proteção individual.

Tabela 4: Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Bengala	Caldo sacarosado com <i>S. mutans</i>	AOT	LED
1	X			
2	X	X		
3	X	X	X	
4	X	X		X
5	X	X	X	X

### 4.8.2 Tratamento dos Grupos

GRUPO 1 (controle negativo): Neste grupo foi empregada uma bengala de vidro, a qual não foi colocada em cultura bacteriana, não recebeu irradiação com LED e nem foi fotossensibilizada pelo AOT. Foi utilizada como parâmetro para ausência de formação de placa bacteriana na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);

GRUPO 2 (controle positivo): Neste grupo, utilizou-se tubos de ensaio contendo 2mL de cultura bacteriana com corpo de prova estéril, não foram irradiadas com LED e nem fotossensibilizadas pelo AOT. Foram utilizadas como parâmetro para verificar a formação de placa bacteriana através da MEV;



GRUPO 3 : Neste grupo empregou-se tubos de ensaio contendo 1mL de cultura bacteriana e 1mL de AOT, aos quais foram adicionados os corpos de prova estéreis. Os tubos de ensaio (cultura bacteriana + corante + bengala) foram levados para estufa, onde permaneceram por 5 minutos (TPI) para permitir a absorção do corante. Após esse tempo foram incubados em microaerofilia por 48 horas;

GRUPO 4: Neste grupo, os tubos de ensaio com 2mL de cultura bacteriana foram transferidos para placas de Petri e irradiados de acordo com os parâmetros citados na tabela 3.. Posteriormente foram adicionados os corpos de prova, sendo novamente transferidos para os tubos de ensaio, nos quais foram incubados em microaerofilia por 48 horas;

GRUPO 5: Neste grupo, empregou-se tubos de ensaio com 1mL de cultura bacteriana e 1mL de AOT. Este conjunto (cultura bacteriana + corante) foi transferido para a placa de Petri e levado para a estufa, onde permaneceu por 5 minutos (TPI) para ocorrer à absorção do corante. Por fim, foram irradiados (figura 8) de acordo com os parâmetros citados na tabela 3 e adicionados os corpos de prova. Também foram levados novamente aos tubos de ensaio e incubados em microaerofilia por 48 horas.

Todos os procedimentos descritos acima foram realizados, assepticamente, dentro do fluxo laminar.

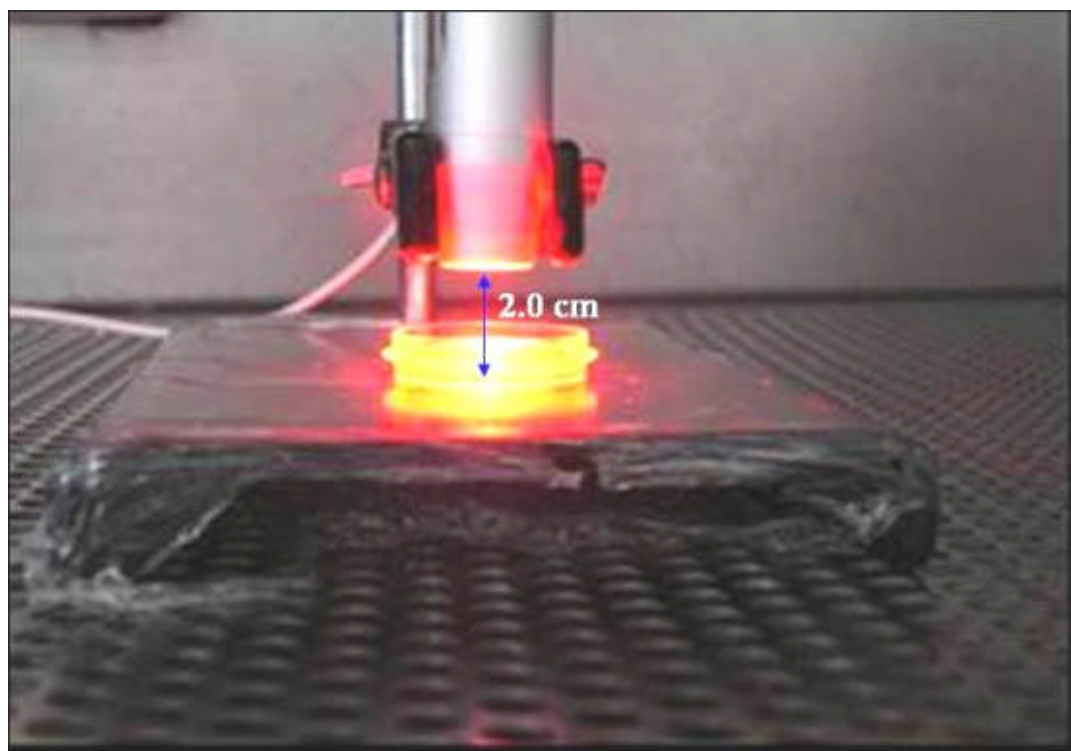


Figura 8: Irradiação da placa de Petri contendo a cultura de *S. mutans* (ATCC 25175)

#### 4.9 Interpretação dos resultados

Os grupos foram incubados por 48 horas a 37°C em microaerofilia, para posterior análise e interpretação da formação de placa bacteriana nos diferentes grupos testados. A interpretação dos resultados foi feita, visualmente, a olho nu e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Anexo B). Esta última foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos- SP.

Após 48 horas de incubação, todas as amostras foram plaqueadas em ágar sangue e foram feitas diluições em série decimal de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  em solução de NaCl 0,9%. Para fazer a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), utilizou-se um contador de

colônias Phoenix CP-600 (figura 9). Todos os testes foram feitos em triplicata, com três repetições para todos os grupos.

Primeiramente foram registradas fotografias das bengalas de vidro em máquina fotográfica digital (Sony Cyber-Shot). Após isto, as bengalas de cada grupo foram submetidas à análise pela MEV. Para tal, foram fixadas em um porta-amostra (figura 10) e levadas a uma câmara a vácuo (figura 11), onde foi realizado um banho eletrolítico para o recobrimento de toda a bengala por ouro. Depois de cobertas pelo ouro, as bengalas foram colocadas na câmara de amostras dentro do microscópio para visualização das mesmas (figura 12).

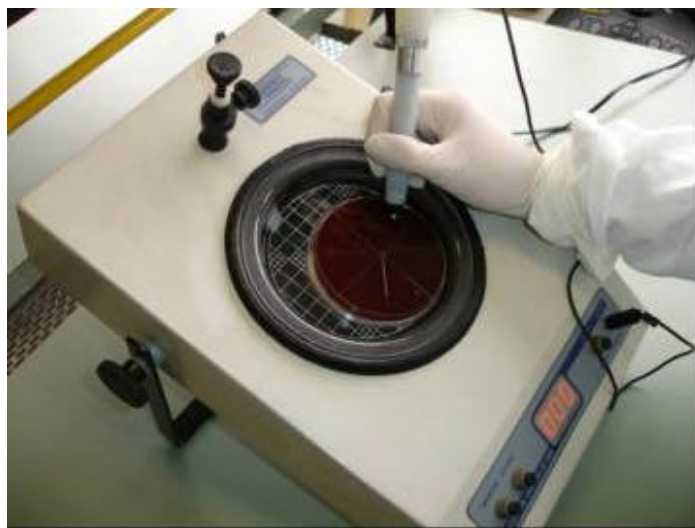


Figura 9: Contador de colônias Phoenix CP 600



Figura 10: Porta a mostra com bengalas



Figura 11: Câmara a vácuo



Figura 12: MEV JEOL

## **5. Análise estatística (Anexo B)**

Os resultados foram armazenados e processados com o programa Microsoft Office (Excel como forma de cálculo). Os valores dos dados obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os cálculos estatísticos foram feitos com o programa GraphPad Prism 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA – USA). Foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 6. Resultados

### 6.1 Avaliação da formação de placa bacteriana *in vitro*

Através da análise de imagem, magnificada em 3 vezes, observou-se formação de placa bacteriana nos seguintes grupos experimentais: 2, 3 e 4. Na figura 13 a (controle positivo – grupo 2) e 13 c (LED – grupo 4) ocorreu formação de placa bacteriana sem a presença do corante, já na figura 13 b (corante – grupo 3) a placa bacteriana ficou evidenciada pelo corante AOT. Contudo no grupo 5, os resultados mostraram que o LED associado ao AOT reduziu a formação de placa bacteriana em comparação com os demais grupos (figura 14).



Figura 13: Presença de placa bacteriana evidenciada nos grupos: 2 (a), 3 (b) e 4 (c).



Figura 14: Ausência de placa bacteriana na superfície do vidro do grupo 5.

A análise qualitativa dos corpos de prova, através da MEV, mostrou que a associação do LED ao AOT (grupo 5) reduziu a formação de placa bacteriana, como mostra as figuras (15b, 16b e 17b). As superfícies dos corpos de prova tratados (grupo 5) foram semelhantes aos utilizados como controle negativo (grupo 1- figuras 15a, 16a e 17a).

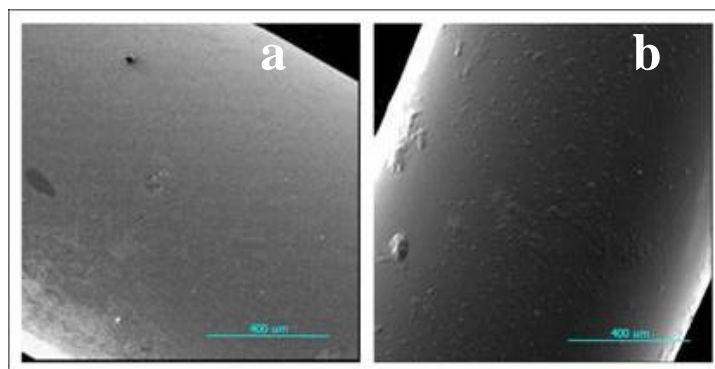


Figura 15: MEV de corpos de prova grupo 1 (a) e grupo 5 (b)- 100 x.

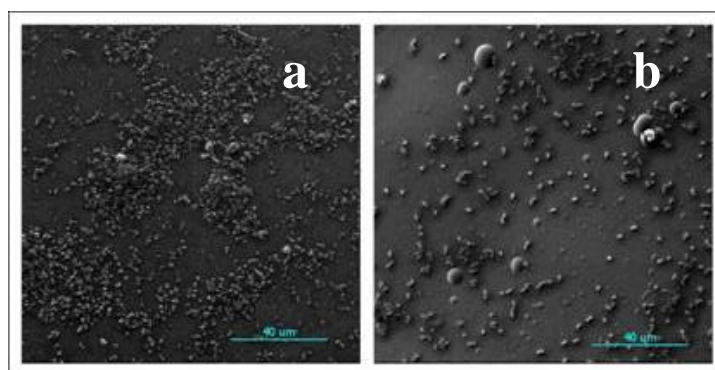


Figura 16: MEV de corpos de prova grupo 1 (a) e grupo 5 (b)- 1000 x.

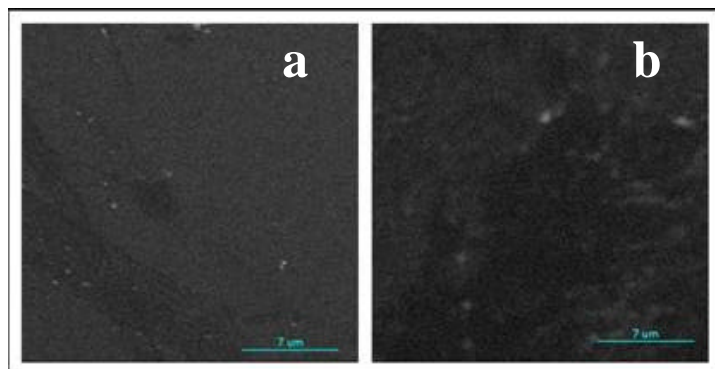


Figura 17: MEV de corpos de prova grupo 1 (a) e grupo 5 (b)- 5000 x.

Nos demais grupos: 2 (controle positivo), 3 (corante) e 4 (LED) observou-se a formação de uma matriz intermicrobiana (síntese de dextrano) envolvendo as cadeias de *S.*



*mutans* (placa bacteriana ou biofilme), não ocorrendo redução do aglomerado bacteriano, como pode ser visto na figura 18 (a, b e c).

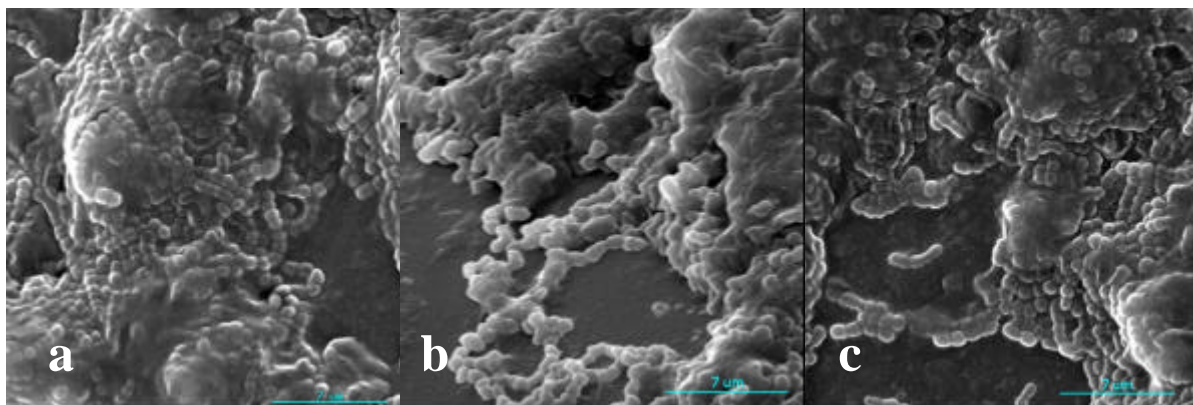


Figura 18: MEV de corpos de prova grupo 2 (a), grupo 3 (b) e grupo 4 (c) -5000 x.

## 6.2 Análise da atividade antibacteriana (contagem de UFC/mL de caldo sacarado).

No grupo 5, a ação do LED juntamente com corante AOT (100µg/mL) mostrou uma ação antibacteriana de 100%, eliminando todas as bactérias presentes (Apêndice A). Nos demais grupos, foram feitas diluições seriadas para fazer a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). A tabela 5 ilustra os diferentes grupos e suas respectivas UFC/mL (Apêndice A).

Tabela 5: Contagem em UFC de *S. mutans*/mL de caldo sacarosado nos diferentes grupos testados.

GRUPOS	grupo 2	grupo 3	grupo 4	grupo 5
UFC de	a,b,c	d	e	
<i>S. mutans</i> /mL X 10 <sup>7</sup>	8,1 ± 0,3	2,3 ± 0,2	1,9 ± 0,2	0

Dados expressos em média ± desvio padrão. P<0,05= a:grupo 2 vs grupo 3, b:grupo 2 vs grupo 4, c: grupo 2 vs grupo 5, d: grupo3 vs grupo 5, e: grupo 4 vs grupo 5.

Observou-se um percentual de redução microbiana de 28,4% no grupo 3 e 23,4% no grupo 4 em relação ao grupo 2 (controle positivo) com p< 0,001. A terapia testada neste estudo apresentou 100% de redução microbiana (grupo 5).

## 7. DISCUSSÃO

A maioria das espécies bacterianas da cavidade bucal está presente na forma de biofilme. Assim, o efeito de um antimicrobiano, tanto tóxico quanto sistêmico, tende a ser minimizado pela natureza do biofilme (LOPES, 2004). Como os dentes são locais ideais para colonização e crescimento bacteriano (CURY et al., 2001), existe a necessidade de estimular a avaliação de novas modalidades terapêuticas.

O emprego adequado da terapia fotodinâmica (TFD), como método alternativo na eliminação de microrganismos patológicos do meio bucal, tem norteadado, a realização de pesquisas na área médica e tecnológica (PAULINO et al., 2005). Vários pesquisadores têm realizado estudos experimentais e clínicos com fontes de luz de baixa potência na terapia fotodinâmica, porém a literatura é confusa quanto às doses, comprimento de onda e forma de emissão que são mais eficazes (BEVILACQUA et al., 2006).

A fonte de luz utilizada é fundamental para a eficácia da TFD. A radiação na região do vermelho do espectro eletromagnético é reconhecida por sua ação analgésica e anti-inflamatória sobre tecidos biológicos (BRUGNERA JUNIOR; PINHEIRO, 1998). Quando associadas a determinados corantes produzem efeito antibacteriano, o que pode auxiliar no tratamento de infecções bucais (WILSON, 1992; DOBSON; WILSON, 1992; BURNS et al., 1994; WILSON et al., 1995; BHATTI et al., 1997; KOMERIK et al., 2002; O'NEILL et al., 2002; CHAN; LAI, 2003; WONG et al., 2005), tendo como vantagem à efetivação da terapia em curto período de tempo (segundos ou minutos), o que pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos e anti-sépticos (WILLIAMS et al., 2004).

Atualmente, os LEDs estão surgindo como uma fonte de luz alternativa na TFD aplicada à redução bacteriana (ZANIN et al., 2003). O emprego da luz não polarizada dos LEDs é atestado como válido nesta terapia, pois para produzir efeito antibacteriano, a fonte de radiação deve apresentar comprimento de onda dentro da faixa de absorção da substância fotossensibilizadora utilizada (WILSON et al., 1992; GARCEZ et al., 2003).

No presente estudo utilizou-se um LED com comprimento de onda médio de 635 nm, uma vez que o pico de absorção do corante estudado (azul de toluidina) está entre 620-700 nm (GARCEZ et al., 2003). O azul de toluidina foi utilizado a 100 µg/mL, pois nesta

concentração não causa dano aos tecidos bucais (manchamento dos dentes e toxicidade celular) (BURNS et al., 1994; De SIMONE et al., 1999; KOMERICK et al., 2003; WILLIAMS et al., 2004). Concordando com esse fato, Takahashi et al. (apud ZANIN, 2002), demonstraram que o AOT não produz efeito antibacteriano sobre *Escherichia coli* quando irradiado por uma luz com comprimento de onda de 590 nm.

Outro fator importante na ação do corante é o pH. É fundamental que não seja ácido. Foi demonstrado que em pH alcalinos tem-se um aumento na produção de oxigênio singlete pelo AOT (BHATTI et al., 1997), e desse modo aumenta a eficácia da terapia. Williams et al. (2004) e Komerik e Wilson (2002), mostraram diminuição na ação antimicrobiana em pH ácidos. Assim, no presente estudo, antes do início dos experimentos, o pH do AOT foi medido, permanecendo em 6. O fator pH é de extrema importância, pois em pacientes que estão sendo submetidos a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos têm saliva mais ácida, podendo comprometer a TFD nesse tipo de pacientes (KOMERIK; WILSON, 2002).

O AOT mostrou-se um eficaz destruidor bacteriano por penetrar facilmente na membrana externa e se concentrar preferencialmente no mesmo no interior da célula bacteriana. O corante liga-se com a membrana externa bacteriana causando prejuízo aos lipídeos, proteínas e enzimas. Pequenas quebras nas moléculas de DNA bacteriano também são observadas (ITO, apud USACHEVA, 2001). Além dessas propriedades, o AOT é um corante fácil emprego, não só pelo baixo custo, como também pela facilidade de aquisição em relação a alguns corantes, como por exemplo a ftalocianina.

Fatores bacterianos 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 interpretação dos resultados. Nesse estudo, o crescimento bacteriano provavelmente estava na fase logarítmica (crescimento exponencial), assim, existe uma facilidade do corante em penetrar na membrana bacteriana, que não é muito densa nessa fase, como é na fase estacionária (BHATTI et al., 1997). Quando culturas de células bacterianas atingem uma situação de falta de nutrientes ou excesso de produtos metabólicos

ocorre uma diminuição no ritmo de crescimento. Essa transição da fase exponencial para a fase estacionária, e posteriormente para a fase de declínio, normalmente é acompanhada por um aumento de resistência das células aos agentes antimicrobianos (KOMERIK; WILSON, 2002). Alguns autores discordam desse fato, relatando redução bacteriana, após TFD em todas as fases de crescimento bacteriano (WILSON et al., 1995).

Neste estudo optou-se por avaliar a ação LED em conjunto com um agente fotossensibilizador na redução microbiana. Como é uma luz não coerente, produz bandas de emissão que favorecem a interação com o corante e a amplitude da área a ser irradiada. O LED utilizado possui espectro eletromagnético na faixa de 600 nm a 670 nm, com pico de emissão em 635 nm e o AOT possui bandas de absorção entre 620 nm a 700 nm, o que possibilitou a fotossensibilização das bactérias.

Após diversos experimentos pilotos foi estabelecido um tempo de irradiação de 180s (WILLIAMS et al., 2003), atingindo uma densidade de energia de 2,18 J/cm<sup>2</sup>, a qual foi capaz de eliminar os *S. mutans*. Com doses e tempo menores não foi possível a eliminação das bactérias, o que demonstra a importância da relação dose/ efeito nessa terapia.

O tempo pré-irradiação (TPI) é fundamental para a realização do efeito antibacteriano. Ele pode facilitar a fixação da substância fotossensibilizadora no interior da bactéria. ITO (1997), demonstrou que a terapia fotodinâmica depende do TPI, pois ele permite penetrar uma barreira de difusão celular, fazendo com que a substância alcance a localização ideal na célula bacteriana para ocorrer maior absorção de luz. Porém, existe uma contradição na metodologia utilizada em diversos estudos sobre TFD. Vários autores divergem sobre doses, potência e comprimento de onda da fonte de luz, não existindo um parâmetro padrão que possa ser seguido para facilitar futuros trabalhos.

Em 2005, Zanin, em seu doutorado, estudou a redução de *S. mutans* com azul de toluidina associado a um laser de He-Ne (632,8 nm) e a um LED (638,8 nm). Verificou significativa redução microbiana (99,99%), independente da luz utilizada (LED ou laser). Esse resultado permite reafirmar a possibilidade de utilização de uma tecnologia de menor custo, assim como foi realizado nesse estudo.

Com relação à Microscopia Eletrônica de Varredura, os resultados obtidos mostraram que a superfície do corpo de prova do grupo 5 (LED e AOT) foi semelhante ao do corpo de prova do grupo 1 (controle negativo) em aumentos de 100 x, 1000 x e 5000 x. Isso permitiu concluir a ocorrência de redução de formação de placa bacteriana no grupo tratado com TFD. Nos demais grupos, AOT (grupo 3) e LED (grupo 4) houve formação de uma matriz intermicrobiana que envolvia as cadeias de *S. mutans*, bem semelhante com a superfície do corpo de prova do grupo 2 (controle positivo), onde o corpo de prova não foi submetido a tratamento com o LED ou corante. Isso permite afirmar, a importância da utilização do LED juntamente com o AOT para que possa ocorrer uma redução bacteriana eficaz, interferindo diretamente na formação da placa bacteriana.

Os resultados obtidos demonstraram que a eliminação total de UFC/mL de *S. mutans* ocorreu somente quando o LED e o AOT (grupo 5) foram aplicados simultaneamente (100% de eficácia da terapia). O uso do corante (grupo 3) ou LED (grupo 4), isoladamente, sobre a bactéria estudada, promoveram redução no número de UFC/mL, que não atingiu 30% da ação do grupo 5. Observou-se um percentual de redução microbiana de 28,4% no grupo 3 e 23,4% no grupo 4 em relação ao grupo 2 (controle positivo) com  $p < 0,001$ . Clinicamente, isso provavelmente acarretaria em uma pequena redução da quantidade de placa bacteriana, já que restaria um grande número de bactérias que podem se organizar e formar novos biofilmes.

Os resultados deste estudo vão de encontro aos dados obtidos por Zanin em 2005, os quais atestam que o uso do corante ou LED isoladamente não é eficaz na eliminação total das bactérias. Este fato torna possível o uso da terapia de forma seletiva no que se refere a cariologia clínica (WILSON, 1994). Estes dados corroboram estudos realizados com TFD, empregando laser associado a corante na redução microbiana (OKAMOTO et al., 1992; WOOD et al., 1999; WILLIAMS et al., 2004; SHILIBI et al., 2003; ZANIN et al., 2005). Porém, nesse estudo, a redução bacteriana ocorreu pela presença de uma luz não coerente (LED) em contato com o AOT.

## 8. CONCLUSÕES

Com o presente estudo foi possível concluir que:

A terapia estudada exerceu efeito de redução na formação da placa bacteriana *in vitro* pelo *Streptococcus mutans* sobre os corpos de prova (bengala de vidro).

A terapia teve efeito bactericida, sendo capaz de eliminar 100% dos *S. mutans* presentes em caldo sacarosado.

Apesar dos resultados satisfatórios com a terapia utilizando LED juntamente com o AOT, outros estudos são necessários *in vivo* para poder confirmar a efetividade da mesma e utilizá-la na prática clínica. É muito importante essa confirmação para que a terapia possa ser utilizada na prevenção de várias patologias bucais.

## Referências

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. New York:Ed. Churchill Livingstone, 1997.

BAXTER, G. D. **Laser therapy**, v.10, n.3, 1998. Disponível em:  
<[http://www.laser.nu/lllt/lllt\\_discussion.htm](http://www.laser.nu/lllt/lllt_discussion.htm). Acesso em 30 jun.2006.

BEVILACQUA, I. M.; NICOLAU, R.A.; PACHECO, M. T. Susceptibility of oral bacterias in biofilms to photodynamic therapy-Review. In: INTERNATIONAL WORKSHOP IN IMRT/IGRT & INTERNATIONAL WORKSHOP IN PD/PDT, 2-3., 2006, Rio de Janeiro. **Abstracts Book of Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.1, p. 8-8, 2006.

BHATTI, M.; ROBERT, A.M.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Effect of Dosimetric and Physiological Factors on the Lethal Photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. **Photochem Photobiol.**, v.65, n.6, p.1026-1031, 1997.

BORTOLAIA, C.; SBORDONE, L. Biofilms of the oral cavity. Formation, development and involvement in the onset of diseases related to bacterial plaque increase. **Minerva Stomatol.**, v.51, n.5, p.187-192, 2002.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON. Effect of Dentine and Collagen on the Lethal Photosensutization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v.29, p.192-197, 1995.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Killing of bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. **J Dent.**, v.22, p.273-278, 1994.

CHAN, Y.; LAI, C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med Sci.**, v.18, n.1, p.51-55, 2003.

CHANT, M.; BRAILSFORD, S.R.; TWOMEY, A.C.; ROBERTS, G.; BEIGHTON, D. The Microflora of Nursing Caries Lesions. **Caries Res.**, v.35, p.397-406, 2001.



CURY, J.A.; FRANCISCO, S.B.; CURY, A.A. D.B.; TABCHOURY, C.P.M. In situ Study of Sucrose exposure, Mutans Streptococci in Dental Plaque and Dental Caries. **Braz Dent J.**, v.12, n.2, p.101-104, 2001.

CURY, J.A.; REBELLO, M.A.B.; CURY, A.A. In situ Relationship between Sucrose Exposure and the Composition of Dental Plaque. **Caries Res.**, v.31, p.356-360, 1997.

DeSIMONE, N.A.; CHRISTIANSEN, C.; DORE, D. Bacterial effect of 0,95mW helium-neon and 5mW indium-gallium-aluminium-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Phys Ther.**, v. 79, n.11, p.1082, 1999.

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

DOUGHERTY, T.Y. Photodynamic therapy. **Photochem Photobiol Sci.**, v.58, p.895-900, 2001.

EDWARD, G. Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry. Academic Press, London, England, 1971. Disponível em: <<http://stainsfile.info/stainfile/dyes>>. Acesso em 06 set. 2006.

EL SAYED, S.A.; DYSON, M. Comparisson of the effect of multiwavelength light produced by a clister of semiconductor diodes each individual diode on master cell number and phosphorus metabolism. **Laser Surg Méd.**, v.10, p. 559-568, 1990.

GALLETI, S.R. Introdução a Microscopia Eletrônica, *InstitutoBiológico*, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35, jan./dez., 2003. Disponível em <<http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/galleti>>. Acesso em 15 maio 2006.

GARCEZ, A.S.; SOUZA, F.R.; NÚÑEZ, S.C.; KATHER, J.M.; RIBEIRO, M.S. Terapia Fotodinâmica em Odontologia - Laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev APCD.**, v.57, n.3, p. 223-226, 2003.

GONÇALVES, L. **Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal**. 2005. 124f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GRIMSTONE, A.V. **O microscópio eletrônico em biologia**. São Paulo: E.P.U./EDUSP, 1980. 70p.

HAMADA, S.; SLADE, H. Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev.**, v.44, n.2, p.332-384, 1980.

HOUTE, J. Role of Micro-organisms in Caries Etiology. **J Dent Res.**, v.73, n.3, p.672-681, 1994.

ITO, T. Toluidine Blue: The mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochem Photobiol**, v.25, p.47-53, 1997.

JAWETZ, E.; MELVICK, J.L.; BROOKS, G.A.; ADELBERG, E.A.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N. **Microbiologia Médica**. 18.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1991.

JORGE, A.O.C. **Microbiologia bucal**. 2.ed. São Paulo:Santos, 1998.

KARU, T.I. Low-Power Laser Therapy. Biomedical Photonics Handbook, p.1-48, 2003. <<http://www.isan.troitsk.2003/ru/dls/pub/300.pdf>>. Acesso em 26 jun. 2006.

KOLHER, B.; BRATTALL, D.; KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium streptococcus mutans in their infants. **Arch Oral Biol.**, v.28, n.3, p.225-31, 1995.

KOMERIK, N.; NAKANISHI, H.; MaC ROBERT, A.J.; HENDERSON, B.; WILSON, M. In Vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine Blue. Photosensitization in an Animal Model. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.47, n.3, p.932-940, 2003.

KOMERIK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **J Applied Microbiol.**, v.92, p.618-623, 2002.

LEE, B.S.; LIN, Y.W.; CHIA, J.S. Bacterial effects of diode laser on *Streptococcus mutans* after irradiation through different thickness of dentin. **Lasers Surg Med.**, v.38, p.62-69, 2006.

LOESHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human decay. **Microbiol Res.**, v.50, n.4, p.353-380, 1986.

LOPES, A.M.; JARDIM JÚNIOR, E.G.; KINA, J. R. Influência de aplicações do laser érbio:yag sobre a viabilidade bacteriana. **Cienc Odontol Brás.**, v.7, p.75-83, 2004.

MALISKA, A.M. **Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise**. Disponível em: <[http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf)>. Acesso em 10 maio 2006.

MARCHANT, S.; BRASILSFORD, S.R.; TWOMEY, A. C. et al. The Predominant Microflora of Nursing Caries Lesions. **Caries Res.**, v.35, p.397-406, 2001.

MOSELEY, H. Light distribution and calibration of comercial PDT LED arrays. **Photochem Photobiol Sci.**, v.4, p.911-914, 2005.

OLIVEIRA, A.M.G. **Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e Streptococcus mutans**. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

O'NEILL, J.F.; HOPE, C.K.; WILSON, M. Oral bacteria in Multi-Species Biofilms Can be Killed by Red Light in the Presence of Toluidine Blue. **Lasers Surg Med.**, v.31, p.86-90, 2002.

OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-Mediated Bacterial Effect of He-Ne Laser Irradiation on Oral Microorganisms. **Lasers Surg Med.**, v.12, p.450-458, 1992.

PALECKIS, L.G.P.; NICOLAU, R.A.; ZÂNGARO, R.A.; FAVA, A.S.; ROSA, M.P.; RODRIGUES, K.C.; PACHECO, M.T. Photodynamic Therapy Effect on Chemically Induced Malignant and Premalignant lesions in Hamster Cheek Pouch. **Oral Oncol.**, v.7, p.313-317, 2001.

PAULINO, T.P.; RIBEIRO, K.F.; THEDEI JR., G.; TEDESIO, A.C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*, **Arch Oral Biol.**, v. 50, n.3, p.353-359, 2005.

PINELLI, C.; SERRA, M.C. Diagnóstico de cárie. **Rev APCD**, v.53, n.2, p.127-132, 1999.

RUBINOV, A.N. **Physical mechanisms of biological effect of coherent and noncoherent light**. Disponível em: <:[http://www.laser.nu/lllt/lllt\\_editorial13.htm](http://www.laser.nu/lllt/lllt_editorial13.htm). > Acesso em 3 jul.2006.

SARKAR, S.; WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. **J Periodontal Res.**, v.28, n.3, p.204-210, 1993.

SEAL, G.J.; Ng, Y.L.; SPRATT, D.; BHATTI, M.; GULABIVALA, K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. **Int Endodon J.**, v.35, p.268-274, 2002.

SHIBILI, J.A.; MARTINS, M.C.; THEODORO, L.H.; LOTUFO, F.M.; GARCIA, V.G.; MARCANTONIO Jr., E. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. **J Oral Sci.**, v.45, n.1, p.17-23, 2003.

SOUKOS, N.S.; WILSON, M.; BURNS, T. Photodynamic Effects of Toluidine Blue on Human oral Keratinocytes and Fibroblasts and *Streptococcus sanguis* Evaluated *In Vitro*. **Lasers Surg Med.**, n.18, p.253-259, 1996.

SUZUKI, N.; YOSHIDA, A.; NAKANO, Y. Quantitative Analysis of Multi-Species Oral Biofilms by Taq-Man Real-Time PCR. **Clin Med Res.**, v.3, n.3, p.176-185, 2005.

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

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 2.ed. São Paulo: Santos, 1994.

TITA, S.P.S.; PERUSSI, J.R. The effect of Porphyrins on normal and transformed mouse cell lines in the presence of visible light. **Braz J of Med Biol Res.**, v.34, p.1331-1336, 2001.

TORRES, C.R.G.; KUBO, C.H.; ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J.R. Agentes microbianos e seu potencial de uso na Odontología. **Rev Pós-Grad. Fac. Odontol, São José dos Campos**, v.3, n.2, p.43-52, 2000.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.F.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TUCKER, D.; COBB, C.M.; RAPLEY, J.W. Morphologic Changes Following In Vitro CO<sub>2</sub> Laser Treatment of Calculus- Ladened Root Surfaces. **Lasers Surg Med.**, v.18, p.150-156, 1996.

TUNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy** : Clinical practice and scientific background. Stocoholm:Sweden: Prima Books, 1999.

USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.A. Comparision of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobacterial Efficacy Against Gram – Positive and Gram Negative Microorganisms. **Laser Surg Med.**, v.29, p. 165-173, 2001.

WHILEY, R.A.; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci. **Oral Microbiology and Immunology** , v.13, p.195-216, 1998.

WILLIMAS, J.A.; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The Effect of Variable Energy Input from a Novel light Source on the Photoactivated Bacterial Actinon of Toluidine Blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v.37, p.190-193, 2003.

WILLIMAS, J.A.; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The photo-activated Antibacterial Action of Toluidine Blue O in a Collagen Matrix and in Carious Dentine. **Caries Res.**, v.38, p.530-536, 2004.

WILSON, M.; BURNTS, T.; PRATTEN, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilmes using a light-activated agent. **J Antimicrobial Chemother.**, London, v.37, n.2, p.377-381, 1996.

WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int Dent J.**, v.44, n.2, p.181-189, 1994.

WILSON, M. Biofilms and Human Disease. **Sci Progress.**, v. 84, n. 3, p.235-254, 2001.

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

WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J. Bacteria in supragingival samples can be killed by low-laser light in the presence of a photosensitizer. **J Appl Bacteriol.**, v.78, n.5, p.569-574, 1995.

WILSON, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol.**, v.3, p.412-418, 2004.

WONG, T.W.; WANG, Y.Y.; SHEU, H.M.; CHUANG, Y.C. Bactericidal Effects of Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Action on *Vibrio vulnificus*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 49, n. 3, p. 895-902, 2005.

WOOD, S.; NATTRESS, B.; KIRKHAM, J.; SHORE, R.; BROOKES, S. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **J Photochem Photobiol Biol.**, v.50, n.8, p.1-7, 1999

WOOD, S. et al. **Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms**. Clarendon Way, Leeds: Division of Oral Biology, Leeds Dental Institute, University of Leeds, v.57, n. 4, p. 680-684, 2006.

ZANIN, I.C.J. **Estudo *in vitro* e *in situ* da ação antimicrobiana do laser diodo associado a fotossensibilizador sobre microrganismos bucais**. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2002.

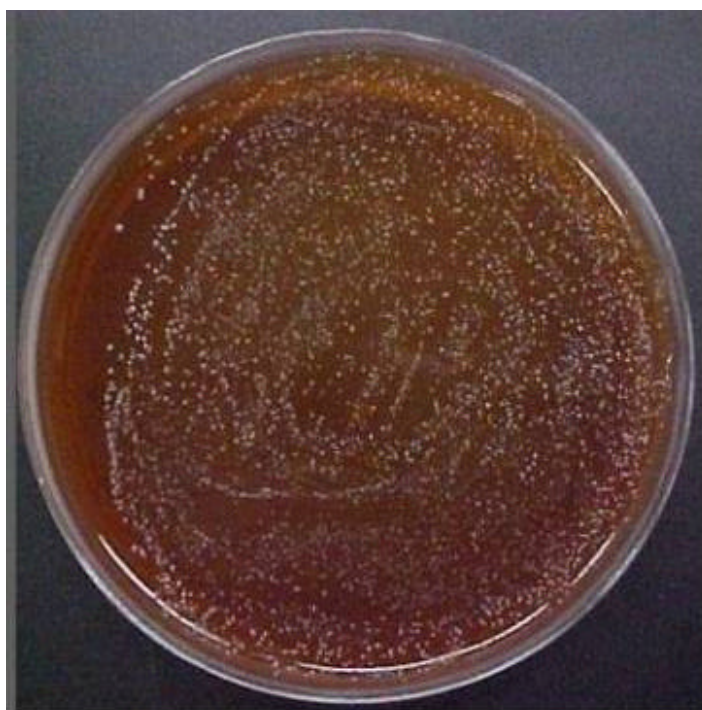
ZANIN, I.C.J.; BRUGNERA JUNIOR, A.; GONÇALVES, R.B. Aplicação da Terapia Fotodinâmica na Descontaminação Bacteriana. **Rev APCD.**, v. 56, p.7-11, 2002.

ZANIN, I.C.J.; BRUGNERA JUNIOR, A.; ZANIN, F.A.A.; GONÇALVES, R.B. Terapia fotodinâmica na odontologia. **RGO**, v.3, n.51, p.179-182, 2003.

ZANIN, I.C.J.; GONÇALVES, R.B.; BRUGNERA JUNIOR, A. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an vitro study. **J Antimicrob Chemother.**, v.56, n.2, p.324-30, 2005.

**APÊNDICE A**

Placa de Petri com ágar sangue do grupo 2 (controle positivo) após realizada a terapia.



Placa de Petri com ágar sangue do grupo 3 (corante) após realizada a terapia.





Placa de Petri com ágar sangue do grupo 4 (LED) após realizada a terapia.



Placa de Petri com ágar sangue do grupo 5 mostrando ausência total de UFC de *S. mutans*/mL de caldo sacarosado.

## **APÊNDICE B**

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura é a técnica de caracterização micro-estrutural mais versátil disponível atualmente, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento. Segundo Grimstone (apud GALETTI, 2003) o uso desta técnica vem se tornando mais freqüente por fornecer informações de detalhes, com aumentos de até 300.000 vezes, o que possibilitou a observação direta de aspectos ultraestruturais das células, até então desconhecidos.

No MEV um feixe de elétrons extremamente estreito é usado para varrer a amostra – isto é, ele é movido para diante e para trás enquanto passa através da amostra. A imagem é construída em seqüência a medida em que a amostra é varrida (GALETTI, 2003).

Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, várias radiações são emitidas, tais como: elétrons secundários, elétrons retro - espalhados, raios-X característicos, elétrons, fótons, etc...

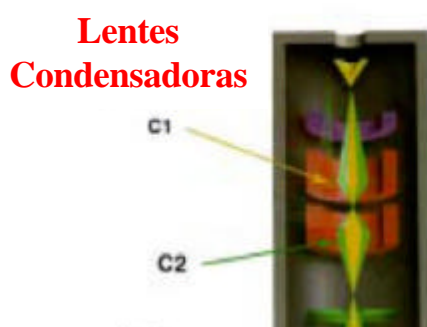
A versatilidade do microscópio eletrônico de varredura deve-se à diversidade de interações entre a amostra e o feixe de elétrons. Essas interações fornecem informações sobre composição, topografia, cristalografia, potencial elétrico, entre outras.

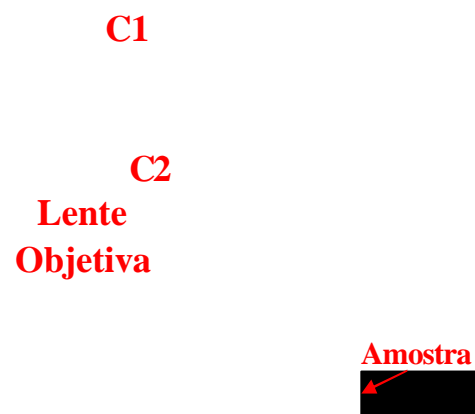
Na MEV os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retro - espalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra, estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retro - espalhados fornecem imagem característica de variação de composição (DUARTE et al., 2003).

Os microscópios eletrônicos apareceram no mercado, pela primeira vez, em 1965, e desde então se revelaram indispensáveis em muitos tipos de pesquisa, sendo fundamentais em pesquisas biológicas (MALISKA, 2006). A MEV tem uma série de aspectos extremamente valiosos. O microscópio pode ser operado em uma escala ampla de aumentos, desde 10X até 300.000X. Uma das vantagens de sua utilização é a rapidez e facilidade na preparação das amostras, que depende do tipo e objetivo da pesquisa.

### **Princípio de funcionamento do MEV**

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é formado basicamente de duas partes principais: coluna e câmara de amostras. A coluna é constituída por um canhão de elétrons, na parte superior, e lentes magnéticas, na parte inferior, que têm a função de focalizar um fino feixe de elétrons sobre a amostra. A quantidade de corrente neste feixe de elétrons incidente sobre a amostra determina a intensidade dos sinais a serem emitidos, que, por sua vez, é diretamente proporcional ao diâmetro do feixe (figura 24).





Esquema representativo de um microscópio eletrônico de varredura

Fonte: Galetti (2003).

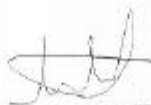
## ANEXO A

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo n.º 1166/2005/CEP, intitulado "*Avaliação da formação de placa bacteriana através da fotoativação de Streptococcus mutans, com utilização do laser AsGaAl e azul de toluidina*", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vissecação de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 04 de novembro de 2005.



**PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR**  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP

### One-way Analysis of Variance (ANOVA)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	110.06	36.688
Residuals (within columns)	8	0.3400	0.04250
Total	11	110.40	

F = 863.24

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Bartlett's test for homogeneity of variances.

ANOVA assumes that all columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

Bartlett's test cannot be performed because at least one column's standard deviation is zero.

#### Bonferroni Multiple Comparisons Test

If the value of t is greater than 3.479 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	t	P value
Grupo 2 vs Grupo 3	5.800	34.457	*** P<0.001
Grupo 2 vs Grupo 4	6.200	36.833	*** P<0.001
Grupo 2 vs Grupo 5	8.100	48.121	*** P<0.001
Grupo 3 vs Grupo 4	0.4000	2.376	ns P>0.05
Grupo 3 vs Grupo 5	2.300	13.664	*** P<0.001
Grupo 4 vs Grupo 5	1.900	11.288	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	Lower 95% CI	Upper 95% CI
Grupo 2 - Grupo 3	5.800	5.214	6.386
Grupo 2 - Grupo 4	6.200	5.614	6.786
Grupo 2 - Grupo 5	8.100	7.514	8.686
Grupo 3 - Grupo 4	0.4000	-0.1856	0.9856
Grupo 3 - Grupo 5	2.300	1.714	2.886
Grupo 4 - Grupo 5	1.900	1.314	2.486

#### Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Grupo 2	3	8.100	0.3000	0.1732	Unknown
Grupo 3	3	2.300	0.2000	0.1155	Unknown
Grupo 4	3	1.900	0.2000	0.1155	Unknown
Grupo 5	3	0.000	0.000	0.000	Unknown

Group	Minimum	Maximum	Lower 95% Confidence Interval	Upper 95% Confidence Interval

## ANEXO C

### Espectro do LED

