

ANGÉLICA MARQUEZIM LOPES

*INFLUÊNCIA DE APLICAÇÕES DO “LASER”
ÉRBIO:YAG SOBRE A VIABILIDADE
MICROBIANA, SUA RESISTÊNCIA A
DROGAS E ATIVIDADE HEMOLÍTICA*

ANGÉLICA MARQUEZIM LOPES

***INFLUÊNCIA DE APLICAÇÕES DO “LASER”
ÉRBIO:YAG SOBRE A VIABILIDADE
MICROBIANA, SUA RESISTÊNCIA A
DROGAS E ATIVIDADE HEMOLÍTICA***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração em Periodontia)

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo Kina

Co-Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

Araçatuba
2003

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

L864i Lopes, Angélica Marquezim
Influência de aplicações do laser érbio :YAG sobre a viabilidade microbiana, sua resistência a drogas e a atividade hemolítica / Angélica Marquezim Lopes. -- Araçatuba : [s.n.], 2003
176 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2003

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo Kina

Co-orientador : Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

1.Lasers em alta intensidade. 2.Bactérias. 3. Desinfecção.

Black D64
CDD 617.601

Dados Curriculares

Angélica Marquezim Lopes

NASCIMENTO.....:	08 de setembro de 1977
NATURALIDADE.....:	Osvaldo Cruz / São Paulo
FILIAÇÃO.....:	Alberto Maria Lopes Eliete Marquezim Lopes
1996/1999.....:	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
2001/2002.....:	Estágio de Aperfeiçoamento no Curso de Especialização em Periodontia da Associação Paulista de Cirurgiões -Dentistas - Regional de Araçatuba.
2001/2003.....:	Curso de Pós-Graduação em Periodontia na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

Dedicatória

Dedicatória

À Deus, por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que puderam me ajudar e por ter estado constantemente em minha vida, dando-me força espiritual para continuar a luta;

Aos meus queridos pais Alberto Maria Lopes e Eliete Marquezim Lopes, que por maiores que tenham sido as dificuldades, muito incentivo, apoio e dedicação me foram dados;

À minha irmã Simone Marquezim Lopes, pelo apoio e compreensão, pois sem a sua ajuda, eu não teria completado essa jornada;

À minha irmã Rosane Marquezim Lopes, pelo carinho dedicado e pela grande torcida, mesmo que à distância;

Aos meus avós Mário Marquezim (*in memoriam*) e Terezinha Marquezim, que sempre estiveram ao meu lado, com muito carinho;

Ao meu querido namorado Ary Locci Junior, pelo companheirismo, ajuda e muito incentivo durante essa trajetória e, por me fazer acreditar e sentir o verdadeiro amor...

A todos vocês, o meu muito obrigada por tanto amor...!!

Agradecimientos

Agradecimentos

Essa minha conquista foi possível também graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas que sempre estiveram, de uma certa forma, ao meu lado.

Ao Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica,

aos funcionários, pelos sorrisos e dias de trabalho;

em especial, ao técnico da disciplina de Microbiologia e Imunologia José Carlos de Mendonça Neto, pelo intenso apoio e grande ajuda não só na elaboração experimental desse trabalho, mas também pelo carinho e grande laço de amizade conquistado;

ao Prof. Dr. Gilson Machado D'Antônio, pelo carinho, conselhos e amizade cultivados desde a minha graduação;

ao secretário Washington de Brito Martins, pela imensa ajuda e amizade;

a todos os estagiários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, em especial Samir e Allan, pelo grande apoio e ajuda prestados na realização experimental deste trabalho;

À Disciplina de Periodontia,

aos professores Álvaro Francisco Bosco, Glauco Issamu Miyhara, José Ricardo Kina, Maria José Hitomi Nagata e Valdir Gouveia Garcia, pelo exemplo de seriedade no trabalho e pelos ensinamentos desde a graduação;

aos funcionários Antônia Ferreira Artioli, pelo incentivo, imensa ajuda e demonstração de carinho e Claudiomiro Pereira, pela generosa colaboração prestada;

Às funcionárias particulares do Prof. Dr. José Ricardo Kina,

Isabel Cristina Gon e Patrícia Cristina Marco, pelo grande apoio e ajuda prestados e pela grande demonstração de carinho e paciência;

À Dr^a. Eunice Fumico Umeda Kina,

pela intenso apoio e laço de amizade conquistado;

Aos pais de meu namorado Ary,

D. Gilda Angelina Locci e Sr. Ary Locci, pelas preces e incentivo nos momentos mais difíceis dessa caminhada;

À Disciplina de Dentística,

ao Prof. Carlos Holland Júnior e à funcionária Rosa Maria Moraes Ferreira pelo auxílio e ajuda na confecção dos corpos-de-prova utilizados nesse trabalho;

À Biblioteca,

à todos os bibliotecários e funcionários;

em especial, Isabel Pereira de Matos, Helena Otsuki, Izamar da Silva Freitas pela orientação bibliográfica, paciência e dedicação e Marina Alves dos Santos, Maria Cláudia de Castro Benez, Luzia Anderline, Cláudia de Souza Frare, Ivone Rosa de Lima e Alexandra Bento pelo convívio diário, além da grande atenção, carinho e preocupação demonstrada por todas vocês;

À Seção de Pós-graduação,

à Marina Midori Sakamoto e Adélia Barreto Claro da Silva, pela orientação, paciência e grande ajuda nos momentos difíceis;

Aos colegas, alunos da Pós-graduação,

especialmente em Periodontia, Ary Locci Junior, Cristiane Motta Leite, Joseane Maria Dias Bosco, Luís Gustavo Nascimento de Melo e Luciane Liarte Gasparini Ribeiro, pela troca de conhecimentos e pela grande ajuda prestada;

Ao Departamento de Ciências, Computação e Estatística da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, de São José do Rio Preto,

ao professor Fernando Ferrari, pela Análise Estatística desse trabalho;

Aos pacientes,

que contribuíram de forma grandiosa com essa pesquisa;

Por fim, a todos aqueles que auxiliaram nesse trabalho e que porventura eu tenha omitido, o meu muito obrigada.

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

É com intenso amor e carinho que agradeço, de uma forma mais que especial, ao Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior,

pela imensa orientação prestada.

Sem você, o qual considero o meu irmão e grande amigo, esse trabalho não teria um término tão gratificante.

À você, o meu muito obrigada e a minha eterna gratidão pelo carinho, incentivo, paciência e grande apoio demonstrado desde a minha graduação.

Seu exemplo de dedicação e seriedade no trabalho, no ensino e na pesquisa muito me motiva.

Muito obrigada, por acreditar e confiar em mim...

Ao Prof. Dr. José Ricardo Kina,

que da sua maneira, nunca deixou de me incentivar, demonstrando-me que a uma das formas de conhecer é descobrindo, e por ter me oferecido condições de aprender sempre mais;

À minha grande amiga, de graduação e pós-graduação, Aimée Maria Guiotti,

pela imensa ajuda e presença em todos os momentos dessa difícil caminhada;

À Devânia Ribeiro Gomes,

que com muita dedicação e carinho, sem medir esforços, prestou-me toda a ajuda possível e pela grande amizade cultivada.

Epígrafe

Epígrafe

*“vencer não é competir com o outro.
É derrotar seus inimigos interiores.*

É a própria realização do ser”.

Roberto Shinyashiki

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1. <i>Atuação do laser sobre a superfície radicular.....</i>	<i>26</i>
2.2. <i>Ação do laser sobre microrganismos “in vitro”.....</i>	<i>33</i>
2.3. <i>Ação do laser “in vivo”</i>	<i>42</i>
3. PROPOSIÇÃO.....	50
4. MATERIAL E MÉTODO.....	52
4.1. <i>Espécimes.....</i>	<i>52</i>
4.1.1. <i>Espécimes de pacientes com doença periodontal.....</i>	<i>52</i>
4.1.2. <i>Isolamento e identificação bacteriana.....</i>	<i>53</i>
4.2. <i>Laser.....</i>	<i>56</i>
4.3. <i>Atividade bactericida do laser sobre biofilme microbiano de composição conhecida.....</i>	<i>58</i>
4.3.1. <i>Formação do biofilme de composição conhecida.....</i>	<i>58</i>
4.3.2. <i>Atividade do laser de érbio:YAG em diferentes tempos sobre biofilme microbiano de composição conhecida.....</i>	<i>60</i>
4.4. <i>Atividade bactericida do laser sobre biofilme de microrganismos salivares.....</i>	<i>62</i>
4.7.1. <i>Formação do biofilme de microrganismo salivares.....</i>	<i>62</i>
4.7.2. <i>Atividade do laser de érbio:YAG em diferentes tempos sobre biofilme de microrganismos salivares.....</i>	<i>64</i>
4.5. <i>Atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG sobre Fusobacterium nucleatum na superfície de corpos-de-prova.....</i>	<i>65</i>
4.6. <i>Atividade de exposições subinibitórias do laser de érbio:YAG sobre a atividade hemolítica e susceptibilidade a antimicrobianos.....</i>	<i>67</i>
4.6.1. <i>Método.....</i>	<i>68</i>
4.6.2. <i>Inóculo bacteriano, condições de incubação e leitura.....</i>	<i>68</i>

4.6.3. Influência de exposições subinibitórias do laser de érbio:YAG sobre atividade hemolítica de <i>Fusobacterium nucleatum</i> e susceptibilidade a antimicrobianos.....	70
4.6.4. Atividade hemolítica.....	70
4.6.5. Susceptibilidade a antimicrobianos.....	72
4.6.5.1. Antimicrobianos.....	72
4.6.5.2. Método, meio de cultura e inóculo.....	73
4.6.5.3. Incubação e cepas controles.....	74
4.6.5.4. Leitura e interpretação dos resultados.....	74
4.7. <i>Análise Estatística</i>	75
5. RESULTADO	77
5.1. <i>Atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG</i>	77
5.2. <i>Atividade de exposições subinibitórias do laser de érbio:YAG sobre a atividade hemolítica e susceptibilidade a antimicrobianos</i>	80
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÃO	121
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
ANEXOS	157
RESUMO	172
ABSTRACT	175

Lista de Figuras

Figura 1 - Características morfocelulares de <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	55
Figura 2 - (a, b) - Colônias de <i>Fusobacterium nucleatum</i> em ágar sangue. a) <i>Fusobacterium nucleatum</i> subespécie <i>nucleatum</i> ; b) <i>Fusobacterium nucleatum</i> subespécie <i>polymorphum</i>	55
Figura 3 - Aparelho fonte do laser de érbio:YAG (Kavo Key Laser)	57
Figura 4 - Caneta: um dos sistemas de entrega do feixe do laser de érbio:YAG	57
Figura 5 - Aplicação do laser de érbio:YAG sobre a microplaca	61
Figura 6 - Morfotipos bacterianos presentes no biofilme salivar	64
Figura 7 - (a, b) - Inoculação do corpo-de-prova com auxílio de micropipeta (a); corpo-de-prova inoculado (b)	67
Figura 8 - Replicador de Steers	72
Figura 9 - Aspectos característicos da atividade hemolítica de diferentes cepas de <i>Fusobacterium nucleatum</i> (α -hemólise e β -hemólise)	159

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Influência de aplicação do laser de érbio:YAG sobre a viabilidade do biofilme microbiano de composição conhecida	78
Tabela 2 - Influência de aplicação do laser de érbio:YAG sobre a viabilidade do biofilme de microrganismos salivares	79
Tabela 3 - Tempos de exposição inibitórios e subinibitórios sobre cepas de <i>Fusobacterium nucleatum</i> em suspensão em microplacas.	82
Tabela 4 - Concentrações subinibitórias de diferentes drogas sobre cepas de <i>Fusobacterium nucleatum</i> irradiadas com laser de érbio:YAG	83

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
β	beta
<	menor
μm	micrômetro
°	graus
°C	Graus Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infuso Cérebro e Coração
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
CVE	Cristal Violeta Eritromicina
Er:YAG	Érbio: Yttrium Alluminium Garnet (Ítrio, Alumínio, Granada)
g	grama
Ho:YAG	Hólmio: Yttrium Alluminium Garnet (Ítrio, Alumínio, Granada)
Hz	Hertz
J	Joules
J/cm ²	Joules/centímetro quadrado

kJ/cm^2	kilojoules/centímetro quadrado
Laser	Light Amplification Stimulated Emission Radiation (Luz Amplificada pela Emissão Estimulada de Radiação)
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	miligrama
mJ	milijoules
ml	mililitro
mm	milímetro
N_2	Nitrogênio
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
Nd:YAG	Neodímio: Yttrium Alluminium Garnet (Ítrio, Alumínio, Granada)
nm	namômetro
PBS	Salina Fosfatada Tamponada
RAD	Raspagem e Alisamento Dental
W	Watts

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é resultado da inter-relação entre uma microbiota potencialmente patogênica e um hospedeiro susceptível, em condições ambientais que possibilitam a expressão dos fatores de virulência (Socransky & Haffajee, 1992;¹³⁵ Jenkinson & Dymock, 1999;⁷² Forng et al., 2000)⁴⁰. Sua classificação ocorre de acordo com a atividade da doença, causa, resposta ao tratamento, extensão, tipo de gengivite (dependente ou não de placa bacteriana), severidade, distribuição das lesões e alterações sistêmicas (Slots, 2002)¹³².

Essas patologias são infecções associadas a determinadas espécies microbianas, sendo clara a participação de grupos microbianos específicos, particularmente os bastonetes Gram-negativos anaeróbios obrigatórios e microaerófilos, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* (Tonetti & Mombelli, 1999)¹⁴⁴ e *Fusobacterium nucleatum* (Moore & Moore, 1994)⁹³.

Os microrganismos envolvidos nas infecções periodontais progressivas apresentam características peculiares, o que lhes permite aderir e colonizar o hospedeiro, além de lesá-lo e evadir seu sistema de defesa (Travis et al., 1997;¹⁴⁵ Fives-Taylor et al., 1999)³².

Fusobacterium nucleatum, em particular, representa, de acordo com Kolenbrander & London (1993)⁷⁸ uma ponte entre os colonizadores iniciais da placa bacteriana, representada principalmente por estreptococos, e os colonizadores finais, como *Selenomonas flueggei*, *Eubacterium* spp., *Treponema* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, entre outros. Esse microrganismo apresenta componentes celulares de superfície e elabora produtos que podem contribuir para a destruição periodontal e agressão por meio de diversos processos patológicos (Bolstad et al., 1996)¹⁸.

O tratamento das doenças periodontais tem o intuito de proporcionar a estabilização das condições periodontais, bem como, se possível, reduzir os danos produzidos nos tecidos de suporte e revestimento periodontais. Para tanto, torna-se necessário o tratamento básico periodontal através da raspagem e alisamento dental (RAD) para proporcionar o controle das populações dos principais microrganismos anfíbios envolvidos na etiopatogênese dessas doenças, particularmente das superfícies radiculares e bolsas periodontais, além de criar condições para impedir a recolonização dessas superfícies (Gómez et al., 1998)⁵².

Em anos recentes, tem sido proposto o uso de antimicrobianos, local ou sistêmico, como adjuvante a terapia mecânica periodontal (Abu Fanas et al., 1991)¹, na tentativa de modificar o prognóstico do tratamento das formas mais agressivas da doença periodontal, constituindo dessa forma, nova filosofia terapêutica (Slots & Ting, 2002)¹³¹.

No entanto, considera-se que a maior parte das espécies microbianas está presente na estrutura do biofilme, que são verdadeiras membranas vivas, onde há proteção frente aos competidores externos e fatores ambientais desfavoráveis (sistema imunológico e drogas antimicrobianas) além de intensas interações ecológicas (Socransky & Haffajee, 2002)¹³⁴. Desta forma, os efeitos dos antimicrobianos tópicos e sistêmicos tendem a ser minimizados pela própria natureza do biofilme, estimulando a avaliação de novas modalidades terapêuticas, como o uso de aparelhos sônicos e ultra-sônicos (Beuchat et al., 2001)¹⁶ e mais recentemente, os aparelhos de laser de vários comprimentos de onda (Moritz et al., 1998;⁹⁶ Falk et al., 2000;²⁹ Usacheva et al., 2001;¹⁴⁸ Folwaczny et al., 2002)³⁴.

Estudos referentes à atuação de diferentes lasers em periodontia têm demonstrado resultados significativos no que diz

respeito à remoção de cálculo, curetagem de tecido mole, descontaminação de bolsas periodontais e alisamento corono-radicular (Aoki et al., 1994;⁷ Spencer et al., 1998;¹³⁶ Israel et al., 1997;⁶⁸ Folwaczny et al., 2000;³⁵ Folwaczny et al., 2000)³⁸.

Dessa forma, desde a introdução do primeiro laser, o estudos a respeito da atuação do laser na odontologia tem crescido muito. Quanto aos lasers de alta potência, existem inúmeros, como o laser de CO₂, que tem demonstrado importante atuação antimicrobiana, quando aplicado sobre microrganismos em estado planctônico (Adrian & Gross, 1979;² Zakariassen et al., 1986)¹⁶¹, bem como o laser de neodímio:YAG, com atividade significativa, principalmente sobre microrganismos endodônticos (Hardee et al., 1994;⁶⁰ Gutknecht et al., 1996;⁵⁵ Folwaczny et al., 2002)³⁴.

Existem também outros lasers YAG, ou seja, meio ativo composto por cristais de ítrio, alumínio e granada, sendo o laser de hólmio:YAG e o de érbio:YAG. Quanto a esse último, vários estudos têm demonstrado atividade satisfatória sobre tecidos duros, como a hidroxiapatita e tecido ósseo (Hibst & Keller, 1989;⁶² Aoki et al., 1994;⁷ Aoki et al., 2000)⁸, devido ao seu comprimento de onda de 2,94 nm, não causando alterações térmicas mensuráveis (Gaspirc & Skaleric (2001)⁴⁸.

No entanto, a despeito da comprovada ação antimicrobiana dos diferentes tipos de lasers sobre *Staphylococcus epidermidis* (Gronqvist et al., 2000)⁵³, *S. aureus* (Mehl et al., 1999)⁹⁰, *Escherichia coli* (Coffelt et al., 1997;²² Mehl et al., 1999)⁹⁰, *Serratia marcescens* (Ward et al., 1996)¹⁵², *Bacillus steano thermophilus* (Ward et al., 1996)¹⁵²e *Streptococcus mutans* (Klinle et al., 1997)⁷⁶, pouco se sabe sobre a ação do laser de Er:YAG sobre microrganismos anoxibiontes isolados de pacientes com doença periodontal, como *Fusobacterium nucleatum*, que compartilha poucas características fisiológicas como os microrganismos acima mencionados e sobre biofilmes constituídos por esse e outros microrganismos.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ATUAÇÃO DO LASER SOBRE A SUPERFÍCIE RADICULAR

Evidencia-se um crescente interesse na utilização do laser sobre as superfícies radiculares, com o intuito de ser útil na terapia das periodontopatias e suas seqüelas. Quanto aos lasers de alta potência, a literatura é vasta nesse sentido. Desta forma, será feita uma breve colocação dos principais estudos a respeito da atuação de lasers de alta potência, de diferentes comprimentos de onda, sobre a estrutura radicular.

Hibst & Keller (1989)⁶² avaliaram a influência da radiação do laser de Er:YAG sobre a dentina e o esmalte, comparando-o com o laser de CO₂. Verificou-se que a ação do laser de Er:YAG sobre a dentina foi maior do que sobre o esmalte e que após 0,1 segundo de irradiação, a temperatura do espécime se elevou a 50°C, retornando ao normal após 2 segundos da exposição, sem, no entanto, causar injúrias térmicas nas áreas adjacentes (Li et al., 1992)⁸⁴. O mesmo foi observado por Visuri et al. (1996)¹⁵⁰ quando utilizaram o laser de Er:YAG; mas, quando utilizado sob irrigação com água, a temperatura não excedeu a 3°C.

A despeito do efeito térmico, quando os espécimes foram observados em microscopia eletrônica de varredura (Keller & Hibst, 1989)⁷⁴, foi evidenciada a presença de áreas rugosas sem sinais de injúrias térmicas, preservando a estrutura dos cristais de hidroxiapatita, quando comparado com o laser de CO₂, que produziu diversas fissuras e bolhas no centro da área irradiada.

Quanto ao laser de Nd:YAG, White et al. (1991)¹⁵⁵ observaram que quanto maior o tempo de exposição e a potência utilizada, maiores foram os efeitos do laser sobre a dentina e a concomitante elevação da temperatura pulpar, além de interferir também no processo de inserção fibroblástica sobre a superfície radicular, quando ocorria uma diminuição na distância laser-alvo, bem como no nível de energia liberado durante a irradiação (Tewfik et al., 1994)¹⁴². Nesse aspecto, Morlock et al. (1992)⁹⁷ também verificaram que o uso desse laser, mesmo em baixas energias, resultava em alterações da superfície radicular.

Quando feita a aplicação do laser de Nd:YAG a 80 mJ de energia, 10 Hz de frequência por 1 minuto, com a fibra em contato (90°) com a superfície radicular tratada com endotoxina de *Escherichia coli* “in vitro”, Trylovich et al. (1992)¹⁴⁶ verificaram que após adição de cultura de

fibroblastos, não ocorria a adesão dessas células mesenquimais, uma vez que esse tipo de laser tornou, de acordo com os autores, a superfície de cimento menos propícia à adesão e, subsequente inserção dos tecidos gengivais adjacentes.

Posteriormente, Aoki et al. (1994)⁷ estudaram as alterações morfológicas e térmicas provocadas pelo laser de Er:YAG durante a remoção do cálculo subgengival de dentes extraídos envolvidos periodontalmente e observaram que esse laser em associação à irrigação com água, promovia a remoção do cálculo sem causar injúrias térmicas sobre o tecido pulpar, quando a energia era de 30 mJ de energia ou menos. No entanto, esse valor de energia levou a formação de microrrugosidades e irregularidades, as quais podem tornar-se um nicho para a recolonização bacteriana ou, talvez, promover a nova inserção do tecido periodontal perdido, o que é contraditório. Esses resultados evidenciaram que o tratamento com o laser de Er:YAG, como coadjuvante ao procedimento convencional de raspagem subgengival, poderia ser utilizado clinicamente, uma vez que promove menores danos térmicos sobre a superfície radicular, quando comparado com os lasers de CO₂ e de Nd:YAG (Israel et al., 1997)⁶⁸.

Com o intuito de avaliar a diferença na susceptibilidade do cálculo, cemento e dentina à exposição do laser de Nd:YAG, Radvar et al. (1995)¹¹² observaram que existe uma variabilidade no grau de susceptibilidade desses tecidos ao laser testado, o que poderia estar associado com a cor, textura, conteúdo hídrico, bem como outros fatores inerentes ao hospedeiro e ao local de aplicação os quais poderiam influenciar o grau de absorção de energia, limitando, portanto, a aplicação clínica desse laser em bolsas periodontais.

No mesmo período, Wilder-Smith et al. (1995)¹⁵⁶ observaram que o laser de Nd:YAG a 5 W de potência, 0,77 J/cm² de densidade de energia, a 5 mm de distância da superfície radicular e em diferentes tempos de exposição (1, 2, 3, 4 e 5 minutos) removeu, com sucesso, a camada de “smear layer” da raiz. No entanto, a temperatura superficial e intrapulpar induzida pela irradiação foram incompatíveis com a integridade tecidual.

Comparando a atuação do laser de Er:YAG, em energias de 25 a 100 mJ, e a raspagem e alisamento dental com curetas manuais sobre o cemento radicular, Fujii et al. (1998)⁴² verificaram que a irradiação desse laser sob irrigação com água e com a fibra do laser perpendicular com a raiz

provocava crateras na superfície de 600 μm de diâmetro e profundidade de 15 μm a 45 μm , dependendo da energia utilizada, sendo que as alterações superficiais não levavam à carbonização e fundição da estrutura; verificando maior efeito biológico nas camadas superficiais com pouca ação em maiores profundidades. No entanto, as alterações superficiais podiam atuar como nicho de retenção de placa, além de representar a destruição dos componentes protéicos do cimento, o que poderia impedir a nova inserção do tecido conjuntivo, sugerindo, portanto, a necessidade de um aplainamento radicular com curetas manuais após o uso do laser sobre o cimento.

Por outro lado, aplicando esse mesmo laser, sob refrigeração com água, mas em contato oblíquo sobre a superfície radicular, Aoki et al. (2000)⁸ verificaram que esse laser proporcionou a remoção de cálculo de forma equivalente quando comparado ao ultra-som. O mesmo ocorreu com a rugosidade superficial, quando analisada macroscopicamente. No entanto, considerando a eficiência da raspagem, o ultra-som se mostrou superior ao laser.

Jeng et al. (1999)⁷¹ observaram que a aplicação do laser de Nd:YAG podia produzir alterações dramáticas na superfície radicular, com

formação de crateras, fundição e carbonização da estrutura dental. No entanto, quando associaram a aplicação química de ácido cítrico (3 minutos), tetraciclina (5 minutos) ou uso do ultra-som após a aplicação desse laser, verificaram que as alterações topográficas poderiam ser removidas satisfatoriamente com o ácido cítrico ou o ultra-som, indicando, portanto, essa técnica em procedimentos periodontais cirúrgicos e não cirúrgicos.

Folwaczny et al. (1999)³⁶ estudaram a atuação do laser de Excimer (XeCl), com comprimento de onda de 308 nm e emissão no espectro ultravioleta, sobre a superfície radicular com e sem cálculo, em diferentes densidades de energia (1 J/cm², 2 J/cm², 3 J/cm², 4 J/cm² e 5 J/cm²) e observaram que baixos valores de densidade de energia são capazes de remover estrutura dental e cimento com cálculo, criando uma superfície homogênea, sem “smear layer” e sem a indução de efeitos térmicos, indicando-o como acervo de grande importância para a terapia periodontal; o que também foi verificado quando testado o laser de Er:YAG (Folwaczny et al., 2000)³⁸, que demonstrou, em menor valor de energia (60 mJ), a remoção seletiva do cálculo e sem causar injúrias térmicas.

Quando Schenk et al. (2000)¹²⁵ estudaram a atuação do laser de Er:YAG sobre superfícies radiculares de dentes extraídos, inoculados com 15 µl de suspensão de LPS derivado de *Escherichia coli*, observaram, que dentro dos níveis de energia estudados, o laser não foi capaz de reduzir a endotoxina bacteriana da superfície radicular. Esse estudo, no entanto, contrapõe Yamaguchi et al. (1997)¹⁵⁹ que observaram que o espectro do LPS de *E. coli* era igual ao comprimento de onda do laser de Er:YAG (2.940 nm), que por sua vez, proporcionou uma remoção de 83.1% desse LPS, sem causar alterações estruturais agressivas na superfície radicular irradiada.

Gaspirc & Skaleric (2001)⁴⁸ compararam o efeito do laser de Er:YAG e do laser de Nd:YAG sobre a morfologia e estrutura química radicular e verificaram que valores de energia de 60 mJ, 80 mJ e 100 mJ por 1 minuto e distância focal de 1,5 cm do espécime levou a alterações morfológicas e a um processo de difusão da superfície radicular sem causar injúrias térmicas. Por outro lado, o laser de Nd:YAG com potências de 0,5 W, 1,0 W e 1,5 W aplicado em contato, por 1 minuto, provocou, além dessas alterações citadas, uma desnaturação das proteínas da superfície radicular.

2.2. AÇÃO DO LASER SOBRE MICRORGANISMOS “IN VITRO”

A atividade antibacteriana de diferentes tipos de laser, tanto os de alta potência como os de baixa potência, tem sido demonstrada sobre microrganismos da cavidade bucal e outros, exógenos a esse ambiente.

Dentro desse ponto de vista, com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana dos lasers de rubi, de Nd:YAG e de hélio-neônio, McGuff & Bell (1966)⁸⁹ observaram que esses lasers não foram capazes de impedir o crescimento bacteriano quando irradiados sobre culturas em ágar de *Ps aeruginosas*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

No entanto, mais tarde Adrian & Gross (1979)² estudaram a atuação do laser de CO₂ sobre lâminas de bisturi contaminadas com esporos de *Bacillus subtilis* e de *Clostridium sporogenes*. Com aplicações contínuas de 1,5 a 2,0 minutos, os autores verificaram a completa eliminação dos microrganismos. Nesse sentido, Hooks et al. (1980)⁶⁷ também comprovaram a eficácia do laser de CO₂, na eliminação de esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 9372 e de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953, enquanto que Mullarky et al. (1985)¹⁰⁰ verificaram essa atividade sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na superfície de pele de suínos.

O laser de CO₂ demonstrou também um significativo efeito bactericida quando aplicado em canais radiculares experimentais contaminados com *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Bacillus cereus* ATCC 15987, *Pseudomonas aeruginosas* ATCC 10145 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, em altas densidades de energia (entre 6 e 18 KJ/cm²) (Zakariasen et al., 1986)¹⁶¹. Sobre esses mesmos microrganismos, quando inoculados em lâminas de vidro, o laser de CO₂ produziu uma redução de 90 % no conteúdo séptico, sendo que não se observou diferença da resistência à irradiação do laser entre os microrganismos estudados (Dederich et al., 1990)²⁶.

No entanto, apesar da efetiva atividade antibacteriana demonstrada pelo laser de CO₂, Powell & Whisenant (1991)¹¹⁰ demonstraram que o laser de argônio, quando comparado com o laser de CO₂ e de Nd:YAG possuía uma melhor atividade antimicrobiana sobre limas endodônticas contaminadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* e esporos de *Bacillus subtilis*, a uma energia de 60 J por 60 segundos.

Com o intuito de avaliar a atuação do laser de alta potência sobre superfícies radiculares contaminadas, White et al. (1991)¹⁵⁴

observaram a ação do laser de Nd:YAG sobre corpos de dentina contaminados com *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus*, sendo útil na redução desses microrganismos quando aplicado em nível de potência maior que 0,5 W e em tempo de 2 minutos, apesar de *B. stearothermophilus* ter se mostrado mais resistente. O mesmo foi observado por Tseng et al. (1991)¹⁴⁷ quando aplicou esse laser ‘in vitro’, em dentes extraídos, envolvidos periodontalmente, comparando-o com a remoção mecânica de microrganismos através de curetas.

Associando a atividade antibacteriana do laser de Nd:YAG sobre a superfície radicular, Klinke et al. (1997)⁷⁶ observaram que o laser, a uma potência de 1,5 W, 15 Hz de frequência e irradiação por 10 a 20 segundos, produziu uma diminuição da contaminação de *Streptococcus mutans* em corpos de dentina, sendo que quanto mais profundo o microrganismo estivesse infiltrado, mais difícil era a sua eliminação. Essa observação também foi feita por Gutknecht et al. (2000)⁵⁷ quando estudaram o laser de diodo a 0,6W de potência, por 30 segundos de irradiação, sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 19433.

Além da atividade antibacteriana dos lasers de alta potência ter sido demonstrada sobre superfícies radiculares contaminadas, o mesmo

tem sido verificado em canais radiculares infectados experimentalmente, apesar de não serem colocados como substitutos dos outros métodos de descontaminação radicular, como observado por Hardee et al. (1994)⁶⁰, que compararam o laser de Nd:YAG a 3,0 W de potência, a 1 minuto de exposição, com a solução de hipoclorito de sódio a 0.5%, associados ou não, com ultra-som e instrumentação mecânica, sobre *Bacillus stearothermophilus*, uma vez que levaram a uma redução bacteriana semelhante, mas sem esterilizar o sistema de canais radiculares.

Resultado semelhante também foi observado quando células de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram introduzidas em canais radiculares de dentes extraídos para avaliar a ação do laser de Nd:YAG, comparado com a irrigação de hipoclorito de sódio a 1%, a qual se mostrou mais efetiva do que o laser testado (Folwaczny et al., 2002)³⁷.

Além da atividade antibacteriana do laser de Nd:YAG, outros tipos de laser, como o de hólmio:YAG e de érbio:YAG, foram também efetivos sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 em canais radiculares, verificando um nível de, aproximadamente, 99% de redução microbiana, sem causar elevação

significativa de temperatura (Moritz et al., 1999)⁹⁵. No entanto, dependendo da densidade de energia empregada, os tecidos periapicais não são atingidos por efeitos de ablação do laser de érbio:YAG, não afetando, conseqüentemente, os microrganismos presentes nesse local, pois esse tipo de laser possui alta absorção por hidroxiapatita e partículas de água, concentrando sua atuação somente ao nível da superfície radicular (Jelinkóva et al., 1999)⁷⁰.

O laser de hólmio:YAG também demonstrou uma redução de 99,5% sobre cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 292/2 no interior de canais radiculares (Gutknecht et al., 1997)⁵⁶. Quanto ao laser de Er:YAG, ele é tão efetivo quanto ao hipoclorito de sódio a 1,25% na eliminação de *E. coli* ATCC 25922 e de *S. aureus* ATCC 25023 quando aplicado em canais radiculares (Mehl et al., 1999)⁹⁰, não sendo, no entanto observada essa semelhança quando comparado o laser de CO₂ com o hipoclorito de sódio a 3% sobre *Actinomyces odontolyticus* inoculadas no interior de canais radiculares (Le Goff et al., 1999)⁸².

O laser de Nd:YAG em níveis de energia acima de 30 J, tem se mostrado também bastante efetivo sobre *Enterococcus faecalis*, bactéria com relativa termorresistência e comumente encontrada em dentes com polpa

necrótica (Rooney et al., 1994;¹¹⁹ Gutknecht et al., 1996)⁵⁵, concordando com Moshonov et al. (1995)⁹⁸ quando verificaram uma redução de 99% de *Enterococcus faecalis* após 1 minuto de irradiação com o laser de Nd:YAG, a 4,5W de potência, em associação com substância corante negra,; apesar de não ter eliminado todo o conteúdo bacteriano quando comparado com hipoclorito de sódio a 5,25%.

O mesmo foi também encontrado por Ramsköld et al (1997)¹¹⁵ quando avaliaram a ação desse laser a 60 mJ de energia sobre *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mitis* inoculadas no interior de canais radiculares em associação com substância corante negra.

Os estudos anteriormente mencionados, onde fazem a associação da irradiação do laser de Nd:YAG com substâncias corantes em suspensões bacterianas, concordam com estudos de Schultz et al. (1986)¹²⁶ que verificaram que a adição de substância corante de azul de metileno em suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* FC 004, levou a um aumento do efeito antibacteriano desse laser, demonstrando uma susceptibilidade aumentada de *P. aeruginosa*.

Quando analisado o efeito antibacteriano do laser de Er:YAG sobre culturas de *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em ágar, o laser demonstrou efeito inibitório a partir de 0,3 J/ cm². Quanto ao efeito bactericida, observou-se em densidade de energia igual ou superior a 7,1 J/cm² (Ando et al., 1996)⁶.

Nesse sentido, a partir da metodologia de aplicação de laser em culturas bacterianas em ágar, o laser de Nd:YAG também se mostrou efetivo sobre tipos bacterianos Gram positivos e Gram negativos e também em leveduras, eliminando a viabilidade microbiana, de modo geral, com 10 J de energia em aproximadamente 20 segundos (Ward et al., 1996)¹⁵².

No entanto, Coffelt et al. (1997)²² ao aplicar laser de CO₂ sobre colônias de *Escherichia coli*, em diferentes densidades de energia (3 J/cm² a 110 J/cm²), verificaram que as densidades de energia capazes de provocar a eliminação do microrganismo, sem destruir a superfície radicular, foram de 11 J/cm² a 41 J/cm².

Mais tarde, Folwaczny et al. (1998)³³ estudaram a ação antibacteriana do laser de luz ultravioleta, com 308 nm de comprimento de onda, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,

Lactococcus lactis ATCC 19435 e *Deinococcus radiodurans* ATCC 13939, verificando uma redução de 90% na viabilidade celular de todas as cepas bacterianas estudadas, sendo que essa atividade foi dependente do tempo, da densidade de energia utilizada e da cepa bacteriana irradiada, sendo que o microrganismo mais resistente foi *Deinococcus radiodurans*, pois precisou de 1107 pulsos para ter sua viabilidade celular eliminada, e a mais sensível foi *Enterococcus faecalis*, precisando de 93 pulsos.

Esse estudo concorda com Stabholz et al. (1993)¹³⁸ quando estudaram esse mesmo laser em diferentes densidades de energia (0,1 J/cm² a 1 J/cm²) e diferentes tempos de irradiação (2, 4, e 8 segundos) sobre *Streptococcus mutans* em estado planctônico e em culturas em ágar, verificando que a atividade antibacteriana do laser testado estava diretamente associado com a densidade de energia e o tempo de irradiação aplicados.

Posteriormente, Ward et al. (2000)¹⁵³ conseguiram demonstrar, utilizando o laser de neodímio:YAG, com 100 W de potência e 1,33 cm² de área irradiada, que a atuação bactericida desse laser sobre suspensão de *Escherichia coli* provavelmente não dependia somente do aquecimento térmico dos líquidos, mas também de outros mecanismos, como o mecanismo de ablação, sugerido por Sadoudi et al. (1997)¹²¹, o qual

corresponde ao efeito de remoção da área atingida, após terem estudado a ação desse mesmo laser sobre biofilme de *Escherichia coli*.

No entanto, Grönqvist et al. (2000)⁵³ observaram que a morte de *Staphylococcus epidermidis*, quando cultivados em ágar, estava mais associada aos efeitos fototérmicos da irradiação do laser de Nd:YAG do que aos efeitos fotoquímicos.

Associando o laser de CO₂ com a água oxigenada, Mouhyi et al. (2000)⁹⁹ observaram que esse laser foi efetivo, quando aplicado em lâminas e peças de titânio contaminadas com *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae* e *B. fragilis*.

Esse estudo concorda com Kato et al. (1998)⁷³ que também observaram redução significativa de *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC 381, inoculadas em discos de titânio na dimensão de 8,0 mmX 2,0 mm, após irradiação com laser de CO₂ a 286 J/cm² e 245 J/cm² respectivamente, por 3 a 8 segundos. Esses mesmos autores também observaram uma atividade osteoblástica e aderência celular favorável sobre as superfícies de titânio irradiadas, mesmo naquelas onde haviam restos microbianos.

O laser de Er:YAG, a 60 mJ de energia e 10 Hz de frequência, mostrou uma leve redução de *Peptostreptococcus micros* ATCC 33270, *Eikenella corrodens* ATCC 51724 e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 43719 inoculados em superfícies radiculares de dentes extraídos (Folwaczny et al., 2000)³⁵, e também sobre *Escherichia coli* ATCC25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, quando inoculadas em superfícies radiculares de 4,0 mm X 4,0 mm de dimensão (Folwaczny et al., 2002)³⁴.

A partir de uma recente pesquisa desenvolvida por Nandakumar et al. (2002)¹⁰², onde avaliaram a atividade do laser de Nd:YAG sobre suspensão de *Pseudoalteromonas carrageenovora*, em diferentes densidades de energia (300 J/cm² a 900 J/cm²) e tempos de irradiação (5, 10 e 15 minutos), esses autores verificaram que os diferentes níveis de efetividade do laser dependem, de forma geral, do estado fisiológico da bactéria no momento da irradiação.

2.3. AÇÃO DO LASER “IN VIVO”

O grande interesse em estudar a atuação “in vivo” de lasers de alta potência sobre os parâmetros clínicos e microbiológicos da doença

periodontal tem sido de grande importância no sentido de complementar e até mesmo concretizar pesquisas a nível laboratorial.

Cobb et al. (1992)²¹ aplicando o laser de Nd:YAG em pacientes com doença periodontal crônica, durante 1 minuto e 3 minutos, e comparado com a raspagem e alisamento dental (RAD) com curetas, associando os dois procedimentos, verificaram que ambos os tratamentos, isolados ou associados, proporcionaram uma redução nos níveis de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* e menores alterações superficiais radiculares em menor energia. No entanto, notou-se cálculo subgingival e placa bacteriana residual em todos os grupos, indicando assim, a terapia a laser associada a RAD mecânica, a fim de evitar possível recolonização bacteriana e eliminar fatores irritantes.

Estudo semelhante desenvolvido por Radvar et al. (1996)¹¹³ avaliando a ação desse laser e da RAD sobre os índices clínicos periodontais (índice de placa bacteriana, índice gengival, fluído gengival, profundidade de bolsa periodontal), os quais foram avaliados antes e após 6 semanas do tratamento, permitiu observarem que, de modo geral, os resultados clínicos foram semelhantes nos dois procedimentos. Quanto à redução bacteriana, observou-se que RAD e o laser de Nd:YAG, a 80 mJ levaram a uma

redução significativa imediatamente após o tratamento, mas essa se manteve somente no grupo tratado com RAD. Deste modo, os autores concluíram que as baixas energias estudadas, embora não prejudiciais para a superfície radicular, não foram efetivas sobre os parâmetros microbiológicos da doença periodontal.

Em outro estudo avaliando a atividade do laser de Nd:YAG em bolsas periodontais com profundidade maior ou igual a 5,0 mm, sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, Bem Hatit et al. (1996)¹⁴ verificaram que no grupo com raspagem radicular convencional seguida pela aplicação desse laser em diferentes potências, durante 60 segundos, proporcionava uma diminuição satisfatória dos grupos microbianos estudados, quando comparado com o grupo controle (somente raspagem convencional), apesar de *A.actinomycetemcomitans* ter se mostrado mais resistente.

Moritz et al. (1997)⁹⁴ avaliaram a ação do laser de diodo quanto à redução nos níveis de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*, durante raspagem e curetagem de bolsas periodontais “in vivo”. Verificaram que o laser, após 3 a 4 segundos de irradiação, proporcionou uma redução entre 49% e 62% dos tipos

bacterianos testados, sendo mais eficiente quando comparado com o controle (somente raspagem com cureta). Posteriormente, verificaram que o laser proporcionou uma redução efetiva, entre 70% e 85% de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*, após 6 meses de tratamento; além de melhoras nos índices clínicos (índice de sangramento e profundidade de sondagem) (Moritz et al., 1998)⁹⁶.

Esse mesmo laser, associado a um acesso cirúrgico, foi avaliado no tratamento de periimplantite (Bach et al., 2000)¹¹. Os autores observaram que a aplicação desse laser por 20 segundos, a 1 W de potência, proporcionou uma redução de todas as bactérias testadas (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e fusobactérias), bem como nenhum sinal clínico de sangramento, índice de placa ou profundidade de sondagem nos primeiros 2 anos. No entanto esses aspectos tiveram uma leve alteração nos anos seguintes de avaliação, sendo, no entanto insignificante quando comparado com o controle, que receberam somente raspagem e alisamento dental.

Quanto ao laser de Nd:YAG, foi pesquisado por Liu et al. (1999)⁸⁷, que compararam a atuação desse laser com a raspagem e alisamento dental (RAD) sobre níveis de interleucina-1 β no fluido sulcular,

observando que ambos os procedimentos, isoladamente ou em associação, produziam uma boa resposta clínica. No entanto, o uso do laser seguido pela RAD após seis semanas resultou em uma redução mais significativa de interleucina-1 β .

Em um estudo que avaliou a atividade do laser de Nd:YAG sobre a composição bacteriana das bolsas periodontais, Paraskevas (2000)¹⁰⁷ observou que após o tratamento com o laser, houve uma redução pronunciada de periodontopatógenos, nas 2, 6 e 12 semanas após o tratamento, quando comparado com o controle (RAD). Por outro lado, Anastasakis (2000)⁴ verificou que o laser de Nd:YAG, quando aplicado em bolsas periodontais com profundidade clínica de sondagem superior ou igual a 6,0 mm, proporcionou uma redução nos parâmetros clínicos da doença (sangramento à sondagem e profundidade de bolsa) após 2 semanas de tratamento. No entanto, após 6 e 12 semanas, o controle (RAD) demonstrou uma melhora mais significativa, limitando a indicação do laser como uma alternativa nas fases iniciais do tratamento periodontal básico.

No entanto, quando feita a irradiação do laser de argônio, a 0,4W de potência no interior de bolsas periodontais com profundidade clínica de sondagem maior ou igual a 4,0 mm, associado com irrigação com

clorexidina a 0,06%, Finkbeiner (1995)³¹ verificou que houve uma redução bastante significativa da profundidade de bolsa, bem como redução de 75% do sangramento à sondagem, após 4 a 6 meses de avaliação, quando comparado com o grupo controle, que recebeu somente raspagem e alisamento radicular convencional.

Quanto ao laser de Er:YAG, Schwarz et al. (2000, 2001)¹²⁷,¹²⁸ avaliaram a ação desse laser, a 160 mJ de energia e 10 Hz de frequência, em bolsas periodontais com profundidade clínica de sondagem superior ou igual a 4,0 mm, em tempos de irradiação de 10 minutos para dentes unirradiculares e de 15 minutos para multirradiculares, e observaram que após 3 meses de tratamento, o laser proporcionou uma significativa redução na profundidade de sondagem e melhoras nos níveis de inserção quando comparado com o controle (RAD com curetas). Assim, os autores concluíram que o uso do laser de Er:YAG no tratamento periodontal básico possui efeitos favoráveis quanto aos resultados clínicos em curto prazo, necessitando, por outro lado, de outros estudos em longo prazo.

Quando verificado a atuação do laser de Nd:YAG nessas mesmas condições, Lioubaviana et al (2000)⁸³ observaram que esse laser e procedimento de raspagem e alisamento dental cirurgicamente levaram a

uma redução similar nos índices de profundidade de bolsa e no ganho de inserção clínica após três a seis meses de tratamento.

Avaliando a atuação do laser de Er:YAG, a 120 mJ de energia e 15 Hz de frequência, nos processos inflamatórios e nos níveis bacterianos da doença periodontal e comparando-o com o debridamento mecânico convencional das bolsas periodontais com profundidade clínica de sondagem superior ou igual a 6,0 mm, Falk et al. (2000)²⁹ observaram que o laser proporcionou uma redução de *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Bacteroides forsythus* significativa e semelhante ao debridamento mecânico, após 12 semanas de tratamento.

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

Tendo em vista a importância do controle microbiano no tratamento de diversos tipos de doença periodontal; a presença de fusobactérias na formação do biofilme microbiano, além do possível papel terapêutico dos lasers de alta potência, o presente estudo teve como objetivos:

- a) avaliar a atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG sobre biofilmes microbianos constituídos por cepas de *Fusobacterium nucleatum*, isoladas de pacientes com doença periodontal crônica, e cepas de referência *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, e sobre biofilme microbiano constituído por microrganismos salivares;
- b) avaliar a ação antimicrobiana do laser de érbio:YAG sobre corpos-de-prova de superfícies radiculares contaminadas com *F. nucleatum*, isolados de pacientes com doença periodontal;
- c) avaliar a capacidade do laser de érbio:YAG em afetar, quando aplicado em períodos de tempos subinibitórios, a atividade hemolítica e a susceptibilidade a antimicrobianos de *F. nucleatum*.

4. Material e Método

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Espécimes

Os espécimes clínicos utilizados foram coletados de pacientes com doença periodontal, utilizando-se metodologia empregada por Gaetti-Jardim Jr. et al. (1996)⁴⁷.

Foram também utilizadas cepas bacterianas da American Type Culture Collection, sendo *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

4.1.1. Espécimes de Pacientes com Doença Periodontal

A coleta dos espécimes clínicos foi aprovada pelo Comitê de Ética Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP (Anexo 1).

Os espécimes clínicos utilizados foram obtidos de nove pacientes regularmente matriculados na clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba (UNESP), adultos, de ambos os sexos e com doença periodontal crônica. Clinicamente, esses pacientes apresentavam bolsa periodontal de profundidade clínica de sondagem maior

ou igual a cinco milímetros e não haviam feito uso de drogas antimicrobianas nos seis meses que precederam a coleta.

A coleta dos espécimes foi realizada através de três cones de papel absorvente (Dentsply Co., RJ, Brasil), esterilizados, os quais eram introduzidos no interior das bolsas periodontais, permanecendo por um minuto, sendo em seguida, transferidos para tubos contendo 2,0 ml de solução de transporte de tioglicolato, os quais foram levados para processamento em laboratório.

4.1.2. Isolamento e Identificação Bacteriana

Esse procedimento foi realizado seguindo-se metodologia descrita por Slots (1982)¹³⁰.

Os espécimes foram dispersos por agitação em vortex (Fanen, Brasil), por 60 segundos, e em seguida, realizavam-se diluições seriadas em caldo de tioglicolato. A partir de diluições pré-estabelecidas (10^{-1} a 10^{-5}), alíquotas de 0,1 ml foram transferidas, em duplicata, para placas de Petri contendo ágar infuso de cérebro e coração, suplementado com extrato de levedura (0,5%) e enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de cavalo, e também para placas de Petri contendo ágar seletivo CVE (Walker et al.,

1979)¹⁵¹. Em seguida, com auxílio de alças Drigalsky previamente esterilizadas, espalhava-se o material pela superfície dos meios com ágar.

As placas inoculadas, em duplicata, foram incubadas em condições de anaerobiose (90% N₂ + 10% CO₂), a 37°C, por quatro dias realizando-se, em seguida, a observação das colônias características com auxílio de microscópio estereoscópico,

A partir dessas colônias, realizaram-se avaliações morfocolonial, morfotintorial (coloração de Gram) (FIGURA 1) e teste da catalase. A seguir, colônias sugestivas de *F. nucleatum*, mostrando-se convexas, inteiras, com aparência granular e diâmetro de 3 a 4 mm (FIGURA 2), foram repicadas em placas de ágar sangue para obtenção de cultura pura. Após o crescimento, realizou-se novamente a coloração de Gram e o teste da catalase (Bennett & Duerden, 1985)¹⁵, além de outros testes para a identificação definitiva de *F. nucleatum*. Os isolados foram mantidos por vários repiques, os quais eram feitos semanalmente.

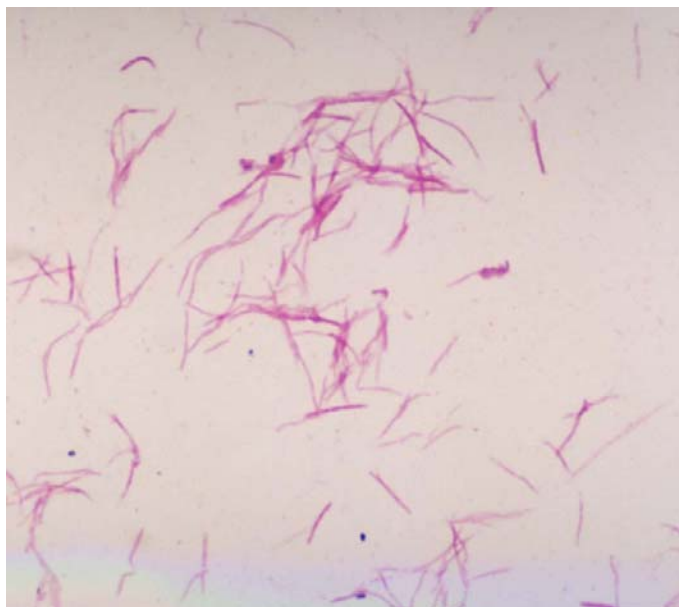
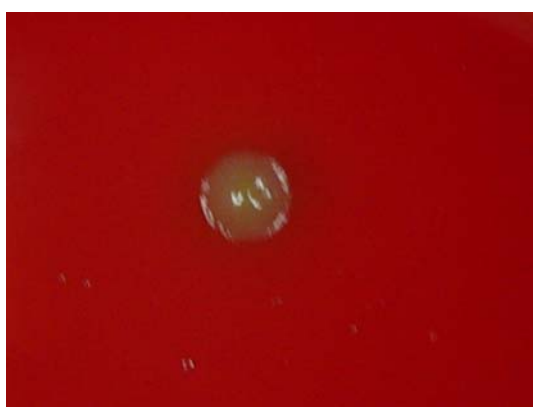
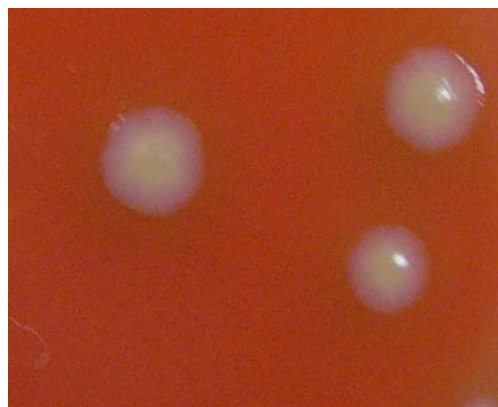


FIGURA 1 - Características morfofoculares de *Fusobacterium nucleatum*



2 a



2 b

FIGURA 2 - (a, b) - Colônias de *Fusobacterium nucleatum* em ágar sangue. a) *Fusobacterium nucleatum* subespécie *nucleatum*; b) *Fusobacterium nucleatum* subespécie *polymorphum*

Assim, os testes para caracterização fisiológica desse microrganismo foram os teste de motilidade, de produção de sulfeto de hidrogênio e indol (Moore et al., 1984)⁹², teste da hidrólise da esculina (Holdeman et al., 1977)⁶⁴ e o teste da produção de gás (Holt et al., 1994)⁶⁶. O teste para a identificação definitiva de *F. nucleatum* foi o teste de fermentação de carboidratos (Holdeman et al., 1977)⁶⁴.

4.2. Laser

Utilizou-se o laser de érbio:YAG (Kavo Key Laser) (FIGURA 3), com comprimento de onda de 2.940 nm. A forma de entrega do feixe da luz laser foi realizada com o uso da caneta (FIGURA 4). Os parâmetros físicos utilizados foram os mesmos em todos os testes realizados e seguiram as recomendações do fabricante, para irradiação em superfície radicular, sendo:

- potência: 1,2 W
- frequência: 10 Hz
- distância: 2,5 cm
- área irradiada: 0,28 cm²

Os valores de densidades de energia variaram de acordo com os diferentes tempos de irradiação que foram testados.



FIGURA 3 – Aparelho fonte do laser de érbio:YAG (Kavo Key Laser)



FIGURA 4 – Caneta: um dos sistemas de entrega do feixe do laser de érbio:YAG

4.3. Atividade bactericida do laser sobre biofilme microbiano de composição conhecida

Foram testadas 3 cepas de *Fusobacterium nucleatum* isoladas de pacientes com doença periodontal crônica, conforme já descrito, e as cepas de referência de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

4.3.1. Formação do biofilme microbiano de composição conhecida

A partir de uma cultura de 72 horas em ágar infuso de cérebro e coração, acrescido de 0.5% de extrato de levedura e 5% de sangue desfibrinado de cavalo (ágar sangue), uma colônia de cada uma das três cepas-teste de *Fusobacterium nucleatum* foi repicada, separadamente, para tubos contendo 5 ml de caldo infuso de cérebro coração suplementado com extrato de levedura (0,5%) e incubada em anaerobiose, a 37°C, por 48 - 72 horas.

As amostras de referência de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram cultivadas em ágar sangue, em anaerobiose, a 37°C, por 24 horas. A seguir,

uma colônia de cada uma das três cepas-teste foi repicada, separadamente, para tubos contendo 5 ml de caldo infuso de cérebro coração suplementado e foram incubados em anaerobiose, a 37°C, por 24 horas.

Após o tempo de incubação, os tubos com crescimento bacteriano foram submetidos à agitação em vortex (Fanen, Brasil), por 30 segundos, para dispersão das células. A seguir, 20 µl de cada tubo contendo as cepas de fusobactérias (10^9 células/ml), bem como 20 µl ($2 \cdot 10^7$ células bacterianas) de cada uma das culturas, de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922 e de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, foram transferidos para microplacas com o auxílio de micropipetas.

Deste modo, cada cavidade da microplaca continha 120 µl com todas as cepas bacterianas. Em seguida, adicionaram-se 30 µl de caldo de tripticaseína de soja acrescido de 1% de glicose e 1% de sacarose.

As microplacas foram incubadas em anaerobiose, a 37°C, por 72 horas, seguindo-se trocas diárias do meio de cultura por 7 dias, para a formação de espesso biofilme. As trocas diárias do caldo de tripticaseína de soja acrescido de 1% de glicose e de 1% de sacarose foram realizadas

com auxílio de micropipeta, de forma que eram colocados 150 µl desse meio de cultura.

4.3.2. Atividade do Laser de érbio:YAG em Diferentes Tempos sobre Biofilme Microbiano de Composição Conhecida

Após a formação do biofilme, fez-se a remoção do meio de cultura líquido nas microplacas, com auxílio de uma micropipeta, tomando-se o cuidado para que o conteúdo líquido fosse removido sem que se alterasse a estrutura macroscópica do biofilme formado sobre a superfície das cavidades da microplaca.

Em seguida, as cavidades das microplacas foram submetidas à aplicação do laser de érbio:YAG (FIGURA 5), por 5, 10, 15, 20, 30 e 60 segundos, posicionado a 2,5 cm das cavidades da microplaca, tendo como densidades de energia os valores de 21,43 J/cm²; 42,86 J/cm²; 64,28 J/cm²; 85,71 J/cm²; 128,57 J/cm² e 257,14 J/cm², respectivamente.

Após a aplicação do laser, removeu-se o biofilme residual com auxílio de zaragatoas esterilizadas, as quais foram transportadas para

caldo de tioglicolato, para minimizar o seu contato com o oxigênio atmosférico.

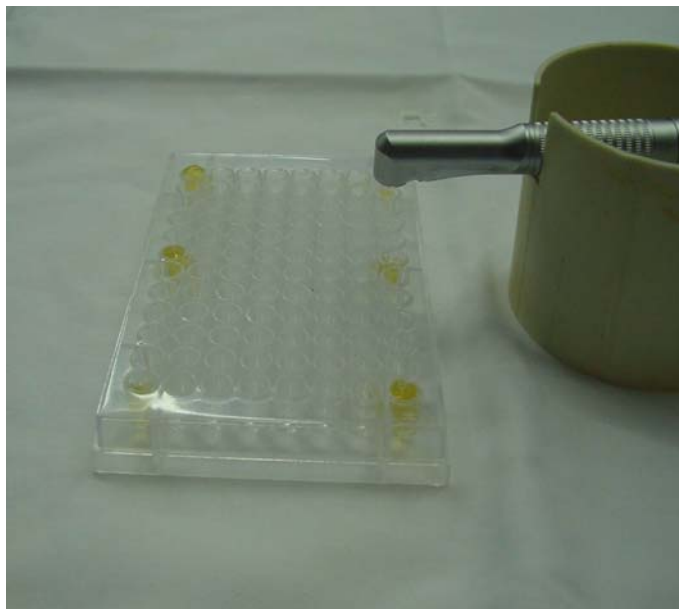


FIGURA 5 - Aplicação do laser de érbio:YAG sobre a microplaca

Em seguida, os tubos com as zaragatoas foram submetidos à agitação em vortex, por 30 segundos para dispersão das células bacterianas. Faziam-se diluições seriadas em caldo de tioglicolato, e de diluições pré-estabelecidas, alíquotas de 0,1ml foram transferidas para as placas de ágar

sangue, em duplicata, as quais foram incubadas em anaerobiose (90% N₂, 10% CO₂), a 37°C por 3 dias.

Nos testes, as cavidades da microplaca com o biofilme que não foram submetidos à ação do laser atuaram como controles da viabilidade do biofilme microbiano e de contaminação.

A leitura dos resultados foi realizada com o auxílio de contador de colônias (Comet S.A.) verificando-se o crescimento bacteriano nas placas inoculadas com as cepas submetidas ao tratamento com o laser em relação às placas controle. Os resultados foram expressos como o percentual de redução do conteúdo microbiano nos grupos testes em relação ao controle.

4.4. Atividade bactericida do laser sobre biofilme de microrganismos salivares

4.4.1. Formação do biofilme de microrganismos salivares

Inicialmente coletaram-se 2 ml de saliva estimulada, pelo uso de base de goma de mascar, de um doador do sexo masculino,

periodontalmente sadio. Em seguida a amostra da saliva foi submetida à centrifugação a 600 xg, por 3 minutos, para a remoção dos restos orgânicos macroscópicos e das células eucarióticas, seguido de três lavagens sucessivas, em solução salina fosfatada tamponada (PBS), a 3000 xg por 5 minutos, para o preparo das células bacterianas (FIGURA 6).

Em seguida, o precipitado foi diluído em 1 ml de PBS e 50 µl (10^6 células bacterianas) foram transferidos para cada cavidade das microplacas, com o auxílio de micropipetas. Adicionavam-se então, 100 µl de caldo de tripticaseína de soja acrescido de 1% de glicose e 1% de sacarose.

As microplacas foram incubadas em anaerobiose, a 37°C, por 72 horas, seguindo-se trocas diárias do meio de cultura por sete dias, para a formação de espesso biofilme. As trocas diárias do caldo de tripticaseína de soja acrescido de 1% de glicose e de sacarose foram realizadas com auxílio de micropipeta, de forma que foram colocados 150 µl desse meio de cultura.

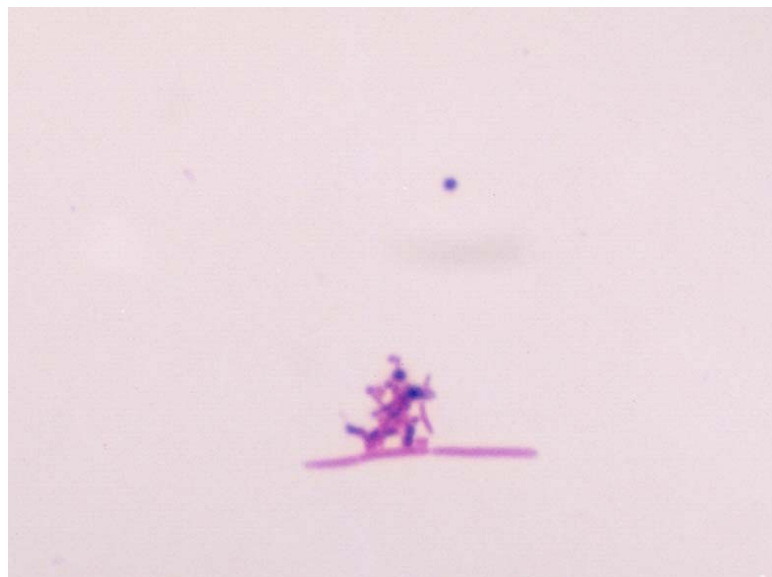


FIGURA 6 - Morfotipos bacterianos presentes no biofilme salivar

4.4.2. Atividade do Laser de érbio:YAG em Diferentes Tempos sobre Biofilme de Microrganismos Salivares

O tratamento do biofilme de microrganismos salivares foi realizado de forma análoga ao previamente descrito para o biofilme de cepas de referência, tanto no que concerne aos aspectos físicos do laser, quanto aos procedimentos microbiológicos.

4.5. Atividade antimicrobiana do laser de Er:YAG sobre *Fusobacterium nucleatum* na superfície de corpos-de-prova.

Foi avaliada sobre corpos-de-prova retangulares (5 mm X 4 mm) constituídos da superfície de 30 dentes extraídos, mantidos em estoque.

Após a exodontia, por indicação periodontal, os dentes foram mantidos em solução fisiológica. Antes de serem cortados, as suas raízes foram raspadas e alisadas com curetas, a fim de remover resíduos da superfície radicular. Estes dentes ficaram mantidos em solução fisiológica, durante todo o período de seu preparo. Em seguida, as raízes dos dentes foram submetidas a cortes padronizados, em aparelho de precisão (Isomet 2000 - Buehler), mantendo uma forma retangular (5mm X 4mm). Após, os corpos-de-prova foram posicionados em placas de Petri e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Foram utilizadas 7 cepas de *Fusobacterium nucleatum*. O seu preparo foi realizado se forma semelhante ao previamente descrito para as cepas de *Fusobacterium nucleatum* na formação do biofilme de composição definida.

Posteriormente, esses fragmentos foram inoculados individualmente, com 1 µl (10^5 células bacterianas) de cada cepa (cepas 1, 3, 4, 8, 9, 10 e 11) de *Fusobacterium nucleatum* (FIGURA 7). A seguir, os corpos-de-prova foram submetidos à aplicação do laser de érbio:YAG por 15 segundos, mantendo o feixe do laser a 2,5 cm de distância do espécime, e com 64,28 J/cm² de densidade de energia. Após, os fragmentos tratados com laser e os controles (não submetidos à ação do laser de érbio:YAG) foram transferidos para tubos contendo 3 ml de solução de tioglicolato e submetidos à agitação em vortex (1 minuto) para dispersão das células bacterianas e o conteúdo séptico sofreu diluições seriadas na própria solução pré-reduzida.

De diluições pré-estabelecidas, alíquotas de 0,1 ml foram inoculadas em ágar sangue em duplicatas e incubadas em anaerobiose, a 37°C, por 3 dias para isolamento dos microrganismos.

Após o tempo de incubação, a leitura da contaminação residual foi realizada com auxílio de contador de colônias (Comet, S.A.), sobre cada uma das sete cepas de *F. nucleatum* testadas.

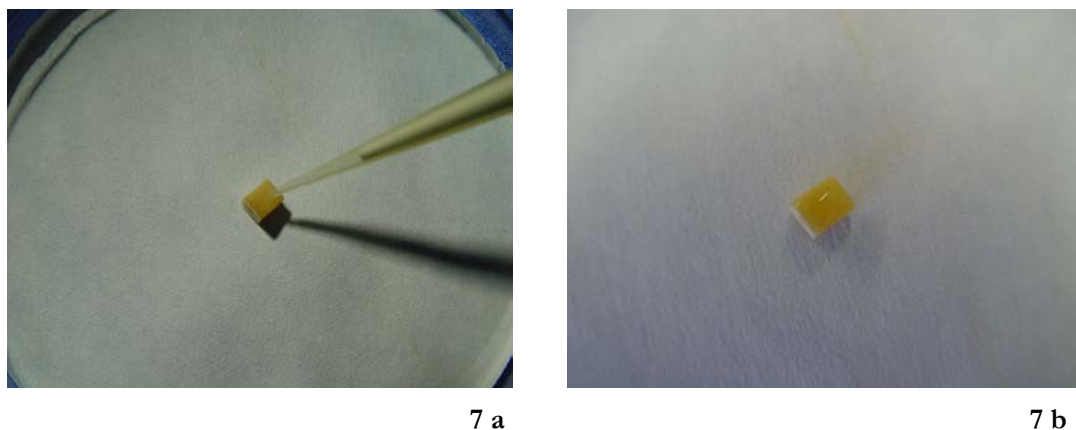


FIGURA 7 - (a, b). Inoculação do corpo-de-prova com auxílio de micropipeta (a); corpo-de-prova inoculado (b)

4.6. Atividade de exposições subinibitórias do laser de érbio:YAG sobre a atividade hemolítica e susceptibilidade a antimicrobianos.

Inicialmente determinou-se o tempo de exposição inibitório sobre os isolados em estado planctônico. Foram testadas 9 cepas de *Fusobacterium nucleatum* isoladas de pacientes com doença periodontal crônica, como descrito anteriormente.

4.6.1. Método

Adaptou-se a metodologia de diluição em caldo para a determinação do tempo inibitório do laser de érbio:YAG, na qual uma cultura de cada cepa teste em caldo (estado planctônico) era irradiada pelo laser em diferentes períodos de tempo.

4.6.2. Inóculo bacteriano, condições de incubação e leitura

A partir de uma cultura de 72 horas em ágar infuso de cérebro e coração, acrescido de 0.5% de extrato de levedura e 5% de sangue desfibrinado de cavalo (ágar sangue), uma colônia de cada cepa-teste foi repicada para tubo contendo 5 ml de caldo infuso de cérebro coração suplementado e incubada a 37°C, por 48 - 72 horas.

Após o tempo de incubação, os tubos com crescimento bacteriano foram submetidos à agitação em vortex (Fanen, Brasil), por 30 segundos, para dispersão das células. A turbidez dos tubos foi ajustada em espectrofotômetro para conter, aproximadamente, 10^8 células bacterianas/ml. A seguir, um inóculo bacteriano de 10^7 células bacterianas de cada cepa foi transferido para microplacas com o auxílio de micropipetas.

Nas microplacas, os inóculos foram submetidos à aplicação do laser de érbio:YAG por 5, 10, 20, 30, 60, 180, 240 e 300 segundos, a 2,5 cm da superfície da microplaca e com densidades de energia de 21,43 J/cm²; 42,86 J/cm²; 85,71 J/cm²; 128,57 J/cm²; 257,14 J/cm²; 771,43 J/cm²; 1028,57 J/cm² e 1285,71 J/cm², respectivamente.

A seguir, o conteúdo microbiano foi inoculado em ágar sangue, em duplicata, e incubado em anaerobiose (90% N₂, 10% CO₂), a 37°C por 3 dias. A leitura dos resultados foi realizada verificando-se o crescimento bacteriano nas placas inoculadas com as cepas submetidas ao tratamento com o laser em relação ao controle, definindo-se, assim, o menor tempo de exposição inibitório sobre os isolados, o qual foi conceituado como a mais curta exposição do laser que levou a perda total da viabilidade microbiana (Tabela 3).

Nos testes, inóculos que não foram submetidos à ação do laser atuaram como controles da viabilidade celular bacteriana e de contaminação.

4.6.3. Influência de exposições subinibitórias do laser érbio:YAG sobre atividade hemolítica de *Fusobacterium nucleatum* e susceptibilidade a antimicrobianos

Com a determinação do menor tempo de exposição do laser Er:YAG, as bactérias foram cultivadas em caldo infuso de cérebro coração suplementado, e após seu crescimento foram submetidas ao laser érbio:YAG por um tempo de exposição que levou a inibição de 50% das cepas após a exposição no tempo inibitório para cada cepa (Tabela 3). Como controle, utilizaram-se, em todos os testes, células bacterianas não submetidas à ação do referido laser.

Os isolados foram submetidos a testes para verificar a atividade hemolítica e susceptibilidade a antimicrobianos. A incubação dos isolados foi realizada em anaerobiose pela técnica da mistura gasosa (90% N₂, 10% CO₂).

4.6.4. Atividade hemolítica

Foi determinada em placas contendo o meio ágar infuso de cérebro e coração (ágar BHI) acrescido de extrato de levedura (0,5%),

hemina (0,5µg/ml), menadiona (5µg/ml) e enriquecido com sangue humano na concentração final de 5%. Utilizou-se o tipo sanguíneo A, Rh-positivo.

Os isolados foram cultivados em caldo infuso de cérebro coração suplementado, a 37°C, por 48-72 horas. Tubos com crescimento bacteriano foram submetidos à agitação em vortex (Fanen, Brasil), por 30 segundos, para a dispersão das células. Em seguida, com o auxílio de espectrofotômetro, foi ajustada a turbidez dos tubos para padronização do inóculo, equivalente a 10^8 células/ml. Paralelamente, as dimensões do inóculo foram confirmadas por contagem de colônias em placas de ágar sangue.

Padronizado o inóculo bacteriano, realizou-se o teste com o laser érbio:YAG, previamente descrito, e, em seguida, alíquotas foram transferidas para os meios de cultura, em duplicata, com o auxílio do replicador de Steers (Cefar Ltda, SP, Brasil) (Figura 8), depositando-se, aproximadamente, 10^5 células/botão. Em seguida, as placas inoculadas foram incubadas em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas, após o que foi realizada a leitura dos testes. A formação de um halo claro ou esverdeado

foi interpretada como β -hemólise (hemólise total) ou α -hemólise (hemólise parcial), respectivamente. (Figura 9)



FIGURA 8 – Replicador de Steers

4.6.5. Susceptibilidade a antimicrobianos

4.6.5.1. Antimicrobianos

Utilizaram-se: amoxicilina, eritromicina, metronidazol e tetraciclina.

As soluções-estoque de cada antimicrobiano (10 mg/ml) foram preparadas em água destilada, no mesmo dia do teste, e esterilizadas por filtração (membranas Millipore 0,22 μ m). Aliquotas foram transferidas para os meios de cultivo para se atingir as concentrações desejadas (0,125

$\mu\text{g/ml}$ até $512 \mu\text{g/ml}$). Os meios de cultura foram preparados no dia da realização dos testes.

4.6.5.2. Método, meio de cultura e inóculo

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada empregando-se o método de diluição em ágar, descrito por Sutter et al. (1979)¹⁴¹ e sancionado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1985)¹⁰⁴. Utilizou-se o ágar BHI enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de cavalo.

A partir de uma cultura de 72 horas em meio ágar sangue, uma colônia da cepa-teste foi repicada para um tubo contendo 5 ml de caldo infuso de cérebro coração suplementado e incubada em anaerobiose, a 37°C , por 48 horas. Após esse tempo de incubação, o tubo com crescimento bacteriano foi submetido à agitação em vortex (Fanen, Brasil), por 30 segundos, para dispersão das células.

A turbidez do tubo foi ajustada em espectrofotômetro para conter, aproximadamente, 10^8 células bacterianas/ml. Padronizado o inóculo bacteriano, realizou-se o teste com o laser érbio:YAG, como descrito anteriormente e, em seguida, alíquotas foram transferidas para os

meios de cultura, em duplicata, com o auxílio do replicador de Steers, depositando aproximadamente 10^5 células bacterianas/botão.

4.6.5.3. Incubação e cepas controles

As placas inoculadas, em duplicata, foram incubadas em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas.

Como controle dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram empregadas as cepas de referência *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953.

Em todos os testes, foram inoculados meios de cultura sem droga no início e no final do processo de inoculação, para verificação da viabilidade celular bacteriana e de contaminação.

4.6.5.4. Leitura e interpretação dos resultados

Após 48 horas de incubação, realizou-se a leitura dos resultados verificando-se a inibição ou não do crescimento microbiano nas placas com as cepas irradiadas, quando comparadas com as placas com as cepas não irradiadas (controle) com laser de érbio:YAG. A concentração inibitória mínima para os antimicrobianos foi definida como a menor

concentração da droga capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano.

4.7. Análise Estatística

Foi realizada sob orientação do Prof. Fernando Ferrari do Departamento de Ciências, Computação e Estatística da Universidade do Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

Os dados dos testes sobre a atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG, em diferentes tempos de aplicação, sobre biofilme de composição conhecida e biofilme salivar foram submetidos ao teste de proporção entre duas variáveis para comparação de proporção entre os tempos utilizados em relação ao controle (Anexo 3).

O nível de significância adotado foi de $\alpha < 0,05$.

5. Resultado

5. RESULTADO

5.1. Atividade Antimicrobiana do Laser de érbio:YAG

A Tabela 1 demonstra a atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG sobre biofilme de composição microbiana conhecida. Pôde-se verificar, a partir da porcentagem de redução dos tempos estudados em relação ao grupo controle, que, após 5 segundos de irradiação, houve um nível de redução de 59,63%, sendo que aos 20 segundos de exposição ao laser, a redução na população microbiana do biofilme atingiu 93,58%, mantendo-se praticamente estável entre 20 e 30 segundos. A eliminação total do conteúdo séptico se deu após irradiação por 60 segundos.

Estatisticamente, observou-se que o número de unidades formadoras de colônias do biofilme estudado foi reduzido significativamente após irradiação com o laser de érbio:YAG quando feita a comparação de todos os tempos com o controle ($p < 0,001$). Foi possível também observar que, quando feita uma comparação de proporção na redução de unidades formadoras de colônias entre os tempos de irradiação em relação ao controle, houve uma diferença altamente significativa entre os tempos estudados ($p < 0,001$).

Tabela 1 - Influência da aplicação do laser de érbio:YAG sobre a viabilidade do biofilme microbiano de composição conhecida

Tempo (em segundos)	CFU*	% de redução em relação ao controle
5	633.600	59,63
10	374.400	76,15
15	244.800	84,40
20	100.800	93,58
30	104.400	93,35
60	0,0	100
CONTROLE	1.569.600	—

* Unidade Formadora de Colônias

Ao se analisar a Tabela 2, verifica-se uma notável sensibilidade do biofilme salivar ao laser de érbio:YAG, quando se analisa o percentual de redução do conteúdo séptico em relação ao controle após os diferentes tempos estudados de irradiação. Após 5 segundos de irradiação, a redução foi de 90%, a qual corresponde a uma redução bastante significativa dentro dos parâmetros microbiológicos. Após 10 segundos de aplicação do laser, 94,80% dos microrganismos perderam a viabilidade, atingindo 99,99%

após 30 segundos de irradiação e de 100% após 60 segundos de aplicação do laser de Er:YAG.

Considerando que a irradiação do laser de érbio:YAG, durante 5 segundos ou mais, proporciona uma redução do biofilme salivar de forma significativa, na análise estatística observou-se que, quando feita uma comparação entre os tempos estudados, o teste demonstrou diferenças altamente significativas ($p < 0,001$).

Tabela 2 - Influência da aplicação do laser de érbio:YAG sobre a viabilidade do biofilme de microrganismos salivares

Tempo (em segundos)	CFU*	% de redução em relação ao controle
5	450.000	90,0
10	231.500	94,86
15	414.000	90,80
20	225.000	95,0
30	424	99,99
60	0,0	100
CONTROLE	4.500.000	—

* Unidade Formadora de Colônias

Quanto à atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG sobre cepas de *Fusobacterium nucleatum* inoculadas em corpos-de-prova de dentina, observou-se que 15 segundos de irradiação foram suficientes para inibir todas as cepas testadas, quando comparada com os corpos-de-prova controle, ou seja inoculados com as cepas bacterianas e não submetidas à irradiação do laser.

5.2. Atividade de Exposições Subinibitórias do Laser de érbio:YAG sobre a Atividade Hemolítica e Susceptibilidade a Antimicrobianos

Frente aos tempos de exposições subinibitórios as quais cada cepa de *Fusobacterium nucleatum* foi irradiada (Tabela 3) e depois de analisadas quanto à ação do laser de érbio:YAG sobre alguns fatores de virulência desse microrganismo, verificou-se que, no que concerne à atividade hemolítica, o laser não afetou essa característica e todas as cepas se mostraram α -hemolíticas, ou seja, tiveram hemólise parcial.

Quanto à influência do laser de érbio:YAG, utilizado por tempos subinibitórios, sobre a susceptibilidade de *F. nucleatum* a antimicrobianos foi possível observar que o laser não produziu efeitos mensuráveis, de forma que a CIM de cada droga para cada cepa permaneceu constante.

Desse modo, a concentração inibitória mínima de amoxicilina utilizada para inibir as cepas testes foi menor ou igual a 0,125 µg/ml. Apenas uma cepa foi inibida com concentração de 2 µg/ml (Tabela 4). Quanto a eritromicina, os microrganismos testados se mostraram mais resistentes à droga, uma vez que a CIM que inibiu todas as cepas foi de 4µg/ml; somente uma cepa foi inibida com concentração menor ou igual a 0,125 µg/ml dessa droga (Tabela 4). Quanto à tetraciclina e metronidazol, verificou-se que a concentração inibitória mínima de ambas as drogas, para todas as cepas foi menor ou igual a 0,125 µg/ml (Tabela 4).

Tabela 3 - Tempos de exposição inibitórios e subinibitórios sobre cepas de *Fusobacterium nucleatum* em suspensão em microplacas

Cepa	Tempo de exposição inibitório*	Tempo de exposição subinibitório*
1	300	180
2	180	120
3	180	120
4	180	120
6	180	60
8	180	180
9	180	120
10	180	120
11	180	120

* tempo em segundos

Tabela 4 - Concentrações subinibitórias de diferentes drogas sobre cepas de *Fusobacterium nucleatum* irradiadas com laser de érbio:YAG

Antimicrobiano	N° de isolados (%)		
	(teste e controle)		
	CIM ¹ (µg/ml)		
	≤ 0,125 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml
Amoxicilina	8 (88,9%)	1 (11,1%)	0 (0%)
Eritromicina	1 (11,1%)	0 (0%)	8 (88,9%)
Metronidazol	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Tetraciclina	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

¹Concentração Inibitória Mínima

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

A prevenção e o tratamento das doenças periodontais têm como objetivo principal o controle do biofilme bacteriano supra e subgingival, através de intervenções mecânicas e/ou químicas, prevenindo ou retardando os períodos de exacerbação das doenças periodontais (Gaetti-Jardim Jr, 2002)⁴⁶.

A utilização de instrumentos manuais para a raspagem corono-radicular e curetagem das bolsas periodontais associada ou não a regimes terapêuticos, baseados no emprego de uma extensa gama de antimicrobianos, tem sido o procedimento mais utilizado no tratamento das diversas formas da doença periodontal (Slots & Ting, 2002)¹³¹. Entretanto, a utilização dos lasers de alta e de baixa potência também vem sendo amplamente estudado em periodontia na tentativa de controlar a contaminação bacteriana presente nas bolsas periodontais (Cobb et al., 1992;²¹ Sarkar & Wilson, 1993,¹²³ Radvar et al., 1996;¹¹³ Bem Hatit et al., 1996;¹⁴ Bhatti et al., 1998;¹⁷ Yilmaz et al., 2002)¹⁶⁰.

Assim, tendo em vista que, em muitas condições, o tratamento através da raspagem e alisamento corono-radicular possui efeitos transitórios, devido a sua incapacidade de erradicar os principais

periodontopatógenos das bolsas periodontais (Quirynen et al., 2002)¹¹¹, faz-se a associação ou até mesmo a substituição por antimicrobianos tópicos, como a tetraciclina (Radvar et al., 1996)¹¹⁴ ou metronidazol (Stelzel et al., 2000)¹³⁹.

Desta forma, o uso do laser de alta potência poderia também ser um coadjuvante ou até mesmo um substituto na terapia periodontal convencional (Cobb et al., 1992;²¹ Anastasakis, 2000)⁴, uma vez que esse tipo de laser possui ação de debridamento e remoção do cálculo dental (Aoki et al., 1994;⁷ Radvar et al., 1995)¹¹², controle da microbiota das bolsas periodontais (Coob et al., 1992;²¹ Moritz et al., 1998;⁹⁶ Schwarz et al., 2001)¹²⁷, bem como a atividade de descontaminação e condicionamento radicular (Keller & Hibst, 1989;⁷⁴ Li et al., 1992;⁸⁴ Visuri et al., 1996;¹⁵⁰ Folwaczny et al., 1999)³⁶. No entanto, alguns autores questionam essa efetividade (Radvar et al., 1996)¹¹³.

A partir desse ponto de vista, foi utilizado na presente pesquisa, um laser de alta potência, o de érbio:YAG. Esse tipo de laser possui a capacidade de ser altamente absorvido pela água, o que lhe permite efetiva atuação nas superfícies mineralizadas e dos tecidos atingidos, que ocorre através da vaporização do conteúdo hídrico da estrutura,

promovendo microexplosões, proporcionando menor desprendimento de energia e conseqüentemente, menores danos térmicos à superfície radicular (Aoki et al., 1994)⁷, principalmente quando utilizados nos parâmetros desejáveis, como a irrigação e com baixas e médias energias (Theodoro et al., 2001)¹⁴³.

Para tanto, tendo em vista que a doença periodontal inflamatória é resultado da presença do biofilme bacteriano nas superfícies radiculares (Donlan & Costerton, 2002)²⁷, o presente estudo avaliou a atividade antibacteriana desse laser sobre biofilmes microbianos, suspensões bacterianas inoculadas sobre corpos-de-prova de raízes dentais, bem como a atividade do mesmo sobre fatores de virulência microbianos.

Quanto aos biofilmes bacterianos estudados, desenvolveu-se um biofilme de composição conhecida, o qual foi composto por microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que são consideradas bactérias resistentes a processos físicos e compostos químicos (Holmes & Gross, 1983;⁶⁵ Parker, 1983)¹⁰⁸, quando comparadas com bactérias bucais, e também *Fusobacterium nucleatum*, o qual é um dos microrganismos mais freqüentemente associados a todos os tipos de doença periodontal, (Moore & Moore, 1994)⁹³. Estudou-se também a ação desse

mesmo laser sobre biofilme constituído por microrganismos salivares, o qual poderiam representar as condições mais próximas do uso do laser “in vivo”.

Quanto à atuação do laser de érbio:YAG sobre o biofilme microbiano de composição conhecida verificou-se que o biofilme mostrou alguma resistência, principalmente nos tempos iniciais de irradiação, uma vez que após 5 segundos de irradiação, a redução do conteúdo séptico foi de 59,63% e, em 15 segundos, de 84%. Quanto aos tempos de 20 segundos a 60 segundos de aplicação, a redução atingiu níveis bastante significativos, sendo de 93,58% a 100% respectivamente, evidenciando-se um efeito de somação temporal (Tabela 1), como também demonstrado por Folwaczny et al. (1998)³³.

Para biofilme de microrganismos salivares, observou-se também eliminação total do conteúdo séptico após 60 segundos, no entanto, nos primeiros tempos de irradiação, esse biofilme demonstrou maior sensibilidade quando comparado com o biofilme de composição conhecida, pois em 5 segundos de exposição ao laser, a redução microbiana foi de 90% (Tabela 2). Dessa forma, a despeito da maior sensibilidade do biofilme salivar em períodos mais curtos de tempo de irradiação, verifica-se

que não há diferença na sensibilidade entre os dois tipos de biofilmes estudados, quando aplicado o laser por períodos maiores de tempo.

Para tanto, tendo em vista que, dentro dos aspectos microbiológicos, uma redução de 90% é considerada significativa (Gutknecht et al., 1997)⁵⁶, 20 segundos de irradiação com o laser de érbio:YAG sobre o biofilme de composição definida e 5 segundos sobre biofilme salivar podem ser considerados indicativos de uma considerável atividade antimicrobiana, mesmo tendo sido observadas diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) na redução bacteriana, entre todos os tempos estudados para os dois tipos de biofilme.

A maior resistência demonstrada pelo biofilme de composição definida nos tempos iniciais de irradiação pode estar associada aos microrganismos testados, uma vez que *S. aureus* e *E. coli* têm sido colocados como resistentes ao laser de alta potência (Schultz et al., 1986;¹²⁶ Henry et al., 1995;⁶¹ Folwaczny et al., 2002)³⁴ e se mostram resistentes a compostos químicos e outros processos físicos (Holmes & Gross, 1983;⁶⁵ Parker, 1983)¹⁰⁸, sendo que sua eliminação requer uma exposição de uma hora a 55° C/60° C, para perderem a viabilidade celular (Parker, 1983)¹⁰⁸.

A resistência térmica desses microrganismos ao laser é relatada por Ward et al. (2000)¹⁵³ que evidenciaram que o simples aquecimento térmico da suspensão contendo *Escherichia coli* não é suficiente para a perda da viabilidade desse microrganismo, sendo que Mullarky et al. (1985)¹⁰⁰ observaram termo-resistência de *S. aureus* ao vapor liberado durante irradiação com laser de alta potência.

Entretanto, outros estudos verificaram que o aumento da temperatura após irradiação com outros lasers de alta potência parece contribuir com a susceptibilidade de *S. aureus* e *E. coli* ao laser (Folwaczny et al., 1998;³³ Folwaczny et al., 2002)³⁴. Nesse particular, talvez, com o laser de érbio:YAG, a temperatura ou os outros atributos do seu mecanismo de ação não tenha se mostrado muito efetivo no interior da estrutura do biofilme, nos tempos iniciais de irradiação sobre esses microrganismos, já que para ocorrer uma atividade bactericida do laser, há a necessidade da total cobertura da superfície bacteriana pela radiação do mesmo (Jelínková et al., 1999)⁷⁰, o que é bastante difícil na estrutura do biofilme, pois os microrganismos podem se encontrar em camadas, protegidos uns pelos outros e por grande quantidade de matriz extracelular (Liljemark et al., 1997)⁸⁵.

A resistência demonstrada por *E. coli* e *S. aureus* não é, no entanto, compartilhada por *F. nucleatum*. Embora os três microrganismos tenham sobrevivido à ação do laser de forma semelhante, nos diferentes períodos de tempo, *F. nucleatum* se mostrou mais sensível, pois o seu crescimento em ágar sangue, após a irradiação com o laser, era representado por menor número de colônias, sendo que no biofilme original, a população dos três microrganismos testados era semelhante.

A maior sensibilidade de *F. nucleatum* pode refletir, a despeito dos cuidados tomados em relação às condições respiratórias, o fato do teste ter sido realizado em aerobiose, mesmo que o controle também tenha permanecido em aerobiose e não sofreu uma redução significativa. Portanto, esse fator não pode ser desprezado, uma vez que *F. nucleatum* é um anaeróbio obrigatório moderado e *E. coli* e *S. aureus* são anaeróbios facultativos.

Entretanto, deve-se considerar que, durante o procedimento de raspagem e alisamento dental “in vivo”, também se dá um aumento do contato do biofilme com o oxigênio atmosférico, interferindo, portanto, em maior ou menor grau no ambiente subgengival. Dessa forma, o oxigênio associado ao laser também pode ser considerado como potencializador

mútuo na eliminação dos anaeróbios durante o tratamento das periodontopatias marginais.

Muito embora alguma resistência microbiana tenha sido demonstrada nos primeiros segundos de irradiação do laser, a eliminação microbiana total observada após um minuto de irradiação pode estar relacionada com a atividade de fotoablação do laser de érbio:YAG (Ando et al., 1996)⁶. No entanto, a despeito de alguns autores responsabilizarem esse mecanismo de ação para a atividade antimicrobiana do laser de Er:YAG (Ando et al., 1996)⁶, outros estudos são necessários para comprovar uma possível atividade fotoquímica e fotomecânica com a utilização desse tipo de radiação eletromagnética.

As informações disponíveis a esse respeito não permitem maiores extrapolações quanto ao mecanismo de ação do laser sobre bactérias, tampouco se o mecanismo principal para um grupo microbiano particular está presente sobre outros microrganismos geneticamente não relacionados, como os testados no presente estudo, bem como a possível interferência representada pelo estado fisiológico do microrganismo irradiado.

De forma análoga, é importante verificar se a quantidade de energia necessária para o processo de fotoablação sobre a superfície radicular demonstrada em estudos “in vitro” (Fujii et al., 1998;⁴² Folwaczny et al., 2000)³⁸ é superior ou não àquela necessária para os outros efeitos deletérios do laser sobre o metabolismo microbiano, sendo provável que vários mecanismos estejam ocorrendo simultaneamente.

Nesse ponto de vista, o tempo e a densidade de energia necessária para atingir atividade antibacteriana pela fotoablação devem ser avaliados cuidadosamente (Dostálova et al., 1997)²⁸, uma vez que a literatura relata efeitos adversos dos vários tipos de laser de alta potência sobre a superfície radicular, mantendo-o com ou sem contato com essas estruturas, pois sérias conseqüências podem ocorrer.

Dentre os efeitos decorrentes da ação dos lasers de alta potência podem ser citadas as alterações deletérias sobre a superfície radicular, decorrentes da atividade térmica do laser (Aoki et al., 1994;⁷ Wilder-Smith et al., 1995;¹⁵⁶ Aoki et al., 2000)⁸, podendo ocasionar irregularidades, que poderiam propiciar o desenvolvimento de microambientes favoráveis à proliferação microbiana (Aoki et al., 1994)⁷, ou uma diminuição na proporção proteína/mineral, podendo afetar a nova

inserção tecidual na superfície radicular (Spencer et al., 1992;¹³⁷ Trylovich et al., 1992)¹⁴⁶, bem como aumento de temperatura no tecido pulpar (White et al., 1991;¹⁵⁵ Wilder-Smith et al., 1995)¹⁵⁶, apesar de esse último efeito ser mínimo com o laser de érbio:YAG (Jayawardena et al., 2001)⁶⁹.

Verifica-se na presente pesquisa, que a atividade bactericida do laser de érbio:YAG sobre os dois biofilmes testados foi demonstrada após 60 segundos de radiação, o que corresponde, dentro dos parâmetros físicos utilizados, a uma densidade de energia de 257,14 J/cm². Esse valor pode ser deletério para a superfície radicular, pois não condiz com a utilizada em outros estudos “in vitro” (Visuri et al., 1996;¹⁵⁰ Israel et al., 1997;⁶⁸ Aoki et al., 2000;⁸ Folwaczny et al., 2000;³⁸ Gaspirc & Skaleric, 2001)⁴⁸, que apresentam densidades de energias menores (110 J/cm², 120 J/cm²), as quais trariam resultados efetivos, sem, no entanto, acarretar efeitos deletérios sobre a superfície, bem como menores injúrias térmicas principalmente quando utilizado sob irrigação com água

Entretanto, tendo em vista que uma redução satisfatória dos microrganismos presentes no biofilme de composição definida foi demonstrada após 20 segundos (87,71 J/cm²) e para biofilme salivar, após 5 segundos (21,43 J/cm²), pode-se determinar que essas densidades de

energia podem proporcionar redução microbiana significativa sem causar efeitos deletérios sobre a superfície radicular, que possam comprometer a nova inserção periodontal.

No entanto, existem dúvidas ainda quanto à verdadeira atividade antimicrobiana dos lasers de alta potência no interior de bolsas periodontais, pois os estudos “in vivo” têm demonstrado essa efetividade somente durante períodos curtos de tempo de avaliação, necessitando, portanto, de pesquisas em longo prazo (Moritz et al., 1997;⁹⁴ Schwarz et al., 2001)¹²⁷.

A resistência do biofilme de composição microbiana conhecida, como observada principalmente nos primeiros tempos de aplicação do laser, também pode estar associada com o tempo de formação do biofilme. Nesse sentido, o tempo utilizado, no presente estudo, para a formação do biofilme microbiano foi de sete dias, o que pode ter permitido uma maior interação entre as três espécies presentes, destacando-se a presença de *F. nucleatum* pela capacidade de estabelecer ampla variedade de pares de coagregação (Kolembrandt et al., 1989;⁷⁷ Andersen et al., 1998)⁵, o que colaboraria para a estabilização do biofilme microbiano (Cook et al., 1998)²³, além de aumentar a própria massa do mesmo (de Beer et al., 1994;²⁵

Donlan & Costerton., 2002)²⁷, dificultando a ação do laser sobre os microrganismos cultivados.

A comparação dos resultados apresentados na tabela 1 com os da literatura, por vezes, se mostra problemática, uma vez que o tempo utilizado para a formação do biofilme, no presente estudo, difere significativamente dos trabalhos presentes na literatura consultada, os quais variam de 2 horas a dois dias, apenas (Sadoudi et al., 1997;¹²¹ Mehl et al., 1999;⁹⁰ Moritz et al., 1999;⁹⁵ Seal, et al., 2002)¹²⁹.

No presente estudo, o período de sete dias foi utilizado, pois, em testes preliminares, verificou-se que a formação do biofilme se mostrou significativa até o sétimo dia, não evoluindo, em massa, a partir desse período. Assim, a utilização desse período de tempo proporcionou a formação de uma maior quantidade de biofilme, o que provavelmente criaria condições extremas para a ação do laser, como já mencionado.

A atuação limitada do laser sobre microrganismos em biofilme pode estar associada, principalmente, ao estado fisiológico das bactérias presentes e das interações entre elas (Wilson, 1994;¹⁵⁷ Nandakumar et al., 2002)¹⁰². No interior do biofilme microbiano, podem existir canais semelhantes ao sistema circulatório que banham com água e nutrientes, as

microcolônias microbianas constituintes desses biofilmes, sendo que cada microcolônia é constituída por várias espécies, como no biofilme testado (Carlsson, 1997;¹⁹ Gaetti-Jardim Jr., 2002)⁴⁶.

A despeito da presença desses canais de nutrientes, os microrganismos no interior do biofilme, se encontram sob condições de intenso estresse ambiental, com elevada concorrência entre as diferentes espécies (Liljemark et al., 1997;⁸⁵ Carlsson, 1997;¹⁹ Socransky & Haffajee, 2002;¹³⁴ Donlan & Costerton., 2002)²⁷.

Embora, no presente estudo, apenas três microrganismos tenham sido utilizados para a formação do biofilme de composição conhecida, sendo que os três apresentam características fenotípicas e genéticas bastante diversas, de forma a minimizar a concorrência, deve-se levar em conta que os mesmos não deviam se encontrar em condições de crescimento logarítmico, até pela limitação de nutrientes e pelo tempo de formação do biofilme testado, o que os tornaria mais resistentes à ação de fatores ambientais exógenos, como por exemplo, ao laser (Nandakumar et al., 2002)¹⁰².

A partir da premissa de que os microrganismos presentes no biofilme de composição definida apresentam notável heterogeneidade,

antagonismo entre as três espécies empregadas não foi observado em testes “in vitro”. Entretanto, é possível que compostos químicos do metabolismo de uma das espécies tenha colaborado para a redução no crescimento de outras espécies, diminuindo sua atividade metabólica e, portanto, a susceptibilidade às alterações ambientais, como a radiação do laser.

Além desse aspecto, o sinergismo entre as diferentes espécies no interior do biofilme também pode colaborar para aumentar a resistência a esses compostos exógenos, como por exemplo, a produção de β -lactamases e outras enzimas que degradam antimicrobianos, peroxidases e superóxidos desmutases que neutralizam os efeitos dos radicais e compostos oxidativos, além de elastases, collagenases e celulasas que, em conjunto, danificariam os tecidos do hospedeiro e criariam uma barreira quase impenetrável de defesa, além de trocas de mensageiros intracelulares, podendo afetar o comportamento de toda a estrutura do biofilme, como a resistência a antibióticos (Gilbert et al., 1990;⁵⁰ Socransky & Haffajee, 2002)¹³⁴.

Nesse sentido, o mesmo poderia ocorrer em relação à radiação do laser sobre a estrutura do biofilme microbiano, pois, tendo em vista que a ação do laser pode ser decorrente de várias interações teciduais,

como a atividade fotoquímica, levando a produção de radicais livres, a atividade fototérmica, que pode causar desnaturações protéicas, ação de fotoablação, e a atividade fotomecânica, a qual promove a expansão do material para todas as direções a partir do ponto irradiado (Wilson, 1994;¹⁵⁷ Mello & Mello, 2001)⁹¹, a estrutura do biofilme poderia interferir de alguma forma nesses fenômenos, necessitando, talvez, de um tempo maior de aplicação para produzir os efeitos deletérios sobre a microbiota. Porém, essa maior resistência é relativa, pois dependendo da densidade de energia do laser empregado, ela pode ser contornada (Sadoudi et al., 1997)¹²¹.

Quanto à estrutura do biofilme formado por microrganismos salivares, tem sido relatado que a característica da microbiota salivar depende de exigências nutricionais e físico-químicas, as quais podem ser fornecidas pela dieta e tecidos do hospedeiro ou por outros microrganismos, determinando as espécies e cepas bacterianas que predominarão. Quanto às exigências respiratórias, a cavidade bucal apresenta diferentes tensões de oxigênio, sendo encontrados microrganismos capnofílicos anaeróbios facultativos, anaeróbios obrigatórios e microaerófilos (Haffajee & Socransky, 1994)⁵⁸.

Desse modo, o cultivo em anaerobiose do biofilme de microrganismos salivares no presente estudo se sustenta, em função da presença de diferentes grupos microbianos na saliva, os quais pertencem a diferentes morfotipos (figura 6), sendo que a maioria dos microrganismos bucais é anoxibionte ou se desenvolve melhor em anaerobiose.

A tabela 2 evidencia que o biofilme de microrganismos salivares possui maior sensibilidade ao laser, quando avaliado nos tempos iniciais de irradiação. Esse resultado poderia estar associado com o fato de que biofilmes formados por microrganismos bucais possuem ampla variação de espécies, sendo que a eliminação de uma delas pode levar a desorganização da estrutura do biofilme, em função das inter-relações ecológicas que se estabelecem (Gharbia & Shah, 1988)⁴⁹.

A significativa redução do conteúdo séptico encontrado no biofilme salivar após 5 segundos de irradiação do laser pode estar associada, portanto, a desorganização microbiana do biofilme, após a possível eliminação de algumas espécies microbianas. Apesar da diferença na sensibilidade entre os microrganismos, o mesmo pode também ocorrer, como já discutido, com o biofilme de composição conhecida, desenvolvido no presente estudo.

Assim, associando os resultados do presente estudo “in vitro” com pesquisas clínicas, sobre a aplicação de lasers de alta intensidade sobre microrganismos periodontopatogênicos, verifica-se que os tempos de irradiação utilizados da literatura, para se obter uma redução significativa dos indicadores microbiológicos, bem como dos parâmetros clínicos, são, de forma geral, maiores (variam de 3 segundos a 10 minutos). Entretanto, em estudos clínicos, esta efetividade somente é relatada quando se faz a associação do laser à raspagem e alisamento dental com instrumentos manuais (Ben Hatit et al., 1996;¹⁴ Radvar et al., 1996;¹¹³ Schwarz et al., 2001)¹²⁷, indicando a utilização de lasers de alta potência como coadjuvantes a esses procedimentos.

A comparação da presente pesquisa com os estudos “in vivo”, torna-se, portanto, limitada, pois no presente estudo o sistema de entrega do feixe do laser foi realizado com o uso da caneta, proporcionando assim uma energia maior em função da convergência do feixe de luz (Mello & Mello, 2001)⁹¹ acarretando em uma atuação direta sobre os biofilmes microbianos testados. Por outro lado, nos trabalhos clínicos consultados (Cobb et al., 1992;²¹ Radvar et al., 1996;¹¹³ Paraskevas, 2000;¹⁰⁷ Schwars et al., 2001)¹²⁷, a maioria faz uso de sistemas de fibra óptica, cujo feixe de luz é

divergente, proporcionando, por conseguinte, uma menor energia de irradiação (Mello & Mello, 2001)⁹¹, além de fatores locais que podem limitar a atuação (Aoki et al., 1994)⁷, uma vez que os testes são realizados em acesso fechado.

Desta forma, o acesso ao local de aplicação, bem como a inclinação da fibra do laser no interior das bolsas periodontais pode interferir na completa irradiação em toda a superfície radicular (Radvar et al., 1996;¹¹³ Folwaczny et al., 2001)³⁹. Além desse aspecto, a presença de microrganismos resistentes presentes no biofilme das superfícies radiculares (Haffajee & Socransky, 1994;⁵⁸ Socransky & Haffajee, 2002)¹³⁴, o qual “in vivo”, apresentam um tempo de evolução muito superior ao utilizado no presente estudo (Socransky & Haffajee, 2002)¹³⁴ e se encontram presentes no interior de canalículos dentinários, também pode impedir, muitas vezes a sua completa eliminação pela irradiação do laser (Mello & Mello, 2001)⁹¹.

Assim, a partir das condições mencionadas, verifica-se que há a necessidade, muitas vezes, de um tempo maior de irradiação, quando aplicado clinicamente, e como são aplicados em movimentos no interior das bolsas periodontais (Bem Hatit et al., 1996;¹⁴ Radvar et al., 1996;¹¹³ Moritz et al., 1997)⁹⁴, fica impossível determinar a densidade de energia específica para

cada área da superfície radicular, pois possuem características anatômicas peculiares. Portanto, esses fatores devem ser considerados na avaliação da efetividade dos lasers de alta potência nas condições clínicas.

Assim, observa-se que o tempo de irradiação para a eliminação total dos microrganismos presentes nos biofilmes testados na presente pesquisa e até mesmo nos trabalhos “in vivo”, são muito maiores do que o tempo utilizado para a eliminação total de células de *Fusobacterium nucleatum*, em suspensão, sobre corpos-de-prova de superfícies radiculares que foram testados no presente estudo.

Esses resultados podem estar associados à estabilidade ambiental, uma vez que no biofilme microbiano essa característica é presente, e em suspensões microbianas, ou seja, em ambientes aquosos, essa estabilidade é pouco freqüente (Costerton et al., 1987)²⁴ e além desse aspecto, as células bacterianas, em estado planctônico, ficam diretamente expostas à radiação do laser, facilitando a sua atuação (Jelínková et al., 1999)⁷⁰. Para tanto, a rápida eliminação das células de *F. nucleatum* sobre os corpos-de-prova, a qual foi verificada após 15 segundos de irradiação, demonstra a grande sensibilidade das cepas desse anaeróbio,

particularmente quando os microrganismos não estavam protegidos por uma comunidade microbiana ou por abundante matriz extracelular.

Tendo em vista que o parâmetro mais adequado para verificar a atividade antibacteriana do laser de érbio:YAG sobre os corpos-de-prova de superfícies dentárias poderia ser através da formação de biofilme microbiano no interior dos canalículos dentinários, uma vez que a literatura demonstra diversidade de atividade antibacteriana dos lasers de alta potência nessas condições (Klinke et al., 1997;⁷⁶ Gutknecht et al., 2000)⁵⁷, a presente pesquisa desenvolveu o cultivo das células bacterianas em estado planctônico, devido às dificuldades laboratoriais encontradas quanto ao cultivo das mesmas nesses parâmetros. Para tanto, optou-se pela metodologia já apresentada, mesmo sabendo das limitações de possíveis comparações.

Nesse sentido, o fato de ter ocorrido a irradiação do laser logo após a inoculação 10^5 células bacterianas da suspensão desse microrganismo sobre a superfície dos corpos-de-prova, sem ter dado condições de cultivo para formação de biofilme, deve ter colaborado para a rápida eliminação do conteúdo séptico. Observa-se, portanto, que esse tempo é compatível com os observados por outros tipos de laser de alta

potência, como o de neodímio:YAG e de CO₂ (Gutknecht et al., 1996;⁵⁵ Kato et al.; 1998)⁷³.

Além desse aspecto, a sensibilidade demonstrada pelas células de *F. nucleatum*, aplicadas sobre os corpos-de-prova, reflete a incapacidade das mesmas de penetrar no interior dos canalículos dentinários, o que diminuiria a sua sensibilidade à radiação do laser; além das condições atmosféricas a qual realizou-se o teste, como discutido anteriormente.

No entanto, apesar de *F. nucleatum* estar associado às várias modalidades de doença periodontal (Haffajee & Socransky, 1994;⁵⁸ Andersen et al., 1998)⁵, existem outros membros da microbiota subgingival que possuem capacidade de invasão dos túbulos dentinários (Akpata & Blechman, 1982;³ Gutierrez et al., 1990)⁵⁴, o que torna ainda mais limitado a ação do laser de érbio:YAG “in vivo”, principalmente pelo fato de pequena capacidade de penetração da sua radiação nos túbulos dentinários (Mello & Mello, 2001)⁹¹.

Também, como já discutido, o estado fisiológico da bactéria pode interferir na atuação do laser, como demonstrado por Wilson et al (1994)¹⁵⁷ e Nandakumar (2002)¹⁰², pois além dos resultados do presente

estudo, outros também observaram significativa redução bacteriana, quando feito a irradiação de lasers de alta intensidade sobre microrganismos em estado planctônico (Schultz et al., 1986;¹²⁶ Stabholz et al., 1993;¹³⁸ Moshonov et al., 1995;⁹⁸ Gutknecht et al., 1996;⁵⁵ Ramsköld et al., 1997;¹¹⁵ Mehl et al., 1999;⁹⁰ Ward et al., 2000;¹⁵³ Nandakumar et al., 2002)¹⁰², já que bactérias que se multiplicam nessas condições podem ser até 1000 vezes mais sensíveis a antimicrobianos, quando comparado com as bactérias presentes na estrutura do biofilme (Socransky & Haffajee, 2002)¹³⁴.

As doenças periodontais ocorrem como uma consequência da colonização de um hospedeiro susceptível por um microrganismo anfíbio (Slots & Genco, 1984)¹³³, cujo potencial patogênico pode ser devido a vários fatores de virulência, como a capacidade de adesão aos tecidos do hospedeiro, na presença de adesinas (Xie et al., 1991)¹⁵⁸, a coagregação com outras espécies (Kolembander & London, 1993)⁷⁸, fatores associados à capacidade do microrganismo em induzir danos teciduais, bem como fatores que estariam relacionados à evasão das defesas do hospedeiro (Slots & Genco, 1984)¹³³.

Fusobacterium nucleatum, em particular, constitui o segundo grupo microbiano anaeróbio mais frequentemente isolado da microbiota

humana e animal (Rowland et al., 1987)¹²⁰ e possui vários mecanismos de virulência como componentes celulares de superfície, capacidade hemaglutinante (Gaetti-Jardim Jr. & Avila-Campos, 1999)⁴⁴, atividade hemolítica (Falkler Jr. et al., 1983)³⁰, a capacidade de elaborar produtos que podem contribuir para a destruição periodontal como compostos tóxicos, como butirato, propionato, sulfeto de hidrogênio e metil-mercaptanas (Bolstad et al., 1996;¹⁸ Gaetti-Jardim Jr., 2001)⁴⁵, que podem inibir a proliferação celular do hospedeiro e levar à morte celular, quando em concentrações elevadas (Bartold et al., 1991;¹³ Carlsson et al., 1997)¹⁹.

A produção de hemolisinas, por patógenos bacterianos, está relacionada ao potencial patogênico dos microrganismos, como de *F. nucleatum*, uma vez que a lise de eritrócitos contribui para a liberação de compostos contendo ferro e outros metabólitos relevantes para o metabolismo bacteriano (Falkler Jr. et al., 1983)³⁰.

Essa capacidade também está associada a maior invasividade do microrganismo no interior dos tecidos do hospedeiro, uma vez que a produção dessas substâncias parece estar relacionada à lise das membranas de lisossomos e multiplicação intracelular (Kuhn et al., 1988)⁸⁰, e evasão do sistema imunológico através da inibição na produção de imunoglobulinas e

proliferação de linfócitos em concentrações sublíticas (Paton et al., 1986)¹⁰⁹. Nesse sentido, Hillman et al. (1993)⁶³ evidenciaram que a produção de hemolisinas é freqüente em microrganismos presentes em biofilme subgengival de pacientes com doença periodontal, associando a intensa destruição periodontal a esse quadro.

Embora a utilização de laser de alta intensidade objetive reduzir ou até mesmo eliminar a microbiota e os fatores de virulência das bolsas periodontais a níveis compatíveis com as condições de saúde periodontal (Klein et al., 1965;⁷⁵ Folwaczny et al., 2002)³⁴, nem sempre a irradiação do laser atinge os tecidos profundos e os microrganismos com uma densidade de energia suficiente (Jelínková et al., 1999)⁷⁰.

Nesse sentido, tendo em vista que o laser de érbio:YAG não é capaz de penetrar profundamente em túbulos dentinários (Mello & Mello, 2001)⁹¹ e muitas vezes não consegue atingir os microrganismos em densidade de energia suficiente para eliminá-los, o laser atuaria em densidades de energia subinibitórias, podendo ocorrer apenas uma modificação transitória da fisiologia bacteriana.

Assim, desde que a expressão dos fatores de virulência é intimamente dependente das características fisiológicas do microrganismo,

pode ser que o laser, ao afetar a fisiologia bacteriana, afetaria também a expressão dos fatores de virulência, embora, na literatura consultada, não se observou nenhum estudo a esse respeito.

Para tanto, os resultados do presente estudo evidenciaram que a atividade do laser de érbio:YAG em densidades de energia subinibitórias (de 257,14 J/cm² a 771,43 J/cm²) sobre as cepas de *Fusobacterium nucleatum* em suspensão, não foi capaz de alterar significativamente a atividade hemolítica dessa fusobactéria, sendo que todos os isolados demonstraram-se α -hemolíticos, o que sugere a importância desse fator de virulência para esse microrganismo, no que concerne ao seu metabolismo e patogênese das infecções em que esse bastonete Gram-negativo participa.

A atividade hemolítica para *F. nucleatum* seria relevante como fonte de nutrientes para o microrganismo, pois o rompimento das células eucarióticas liberaria ao meio externo, não só componente como ferro (Falkler Jr. et al., 1983)³⁰, mas também peptídeos, os quais poderiam sofrer ação de exopeptidases, envolvidos na fermentação de aminoácidos e acarretar conseqüentemente, a produção de energia para essa fusobactéria (Rogers et al., 1991)¹¹⁷.

Tendo em vista que a atividade hemolítica é de importância relevante para grande parte dos microrganismos periodontopatogênicos, muitos dos seus compostos acabam por possuir atividade hemolítica, sendo que, na sua maioria, as hemolisinas são de natureza protéica. Entretanto, as hemolisinas de natureza não protéica tem sido identificadas (Fujita et al., 1988)⁴³, e de acordo com Falkler Jr. et al. (1983)³⁰, para *F. nucleatum*, uma hemolisina de natureza não protéica parece ser o próprio LPS, o qual estaria associado à adesão da bactéria, bem como ao rompimento do eritrócito após a adesão.

Nesse sentido, o bloqueio desse fator de virulência poderia afetar a capacidade desse microrganismo em lisar as células do hospedeiro, como também, interferir nas inter-relações que se estabelecem entre os diferentes grupos microbianos durante a patogênese das doenças periodontais (Gaetti-Jardim Jr., 2001)⁴⁵.

Desta forma, desde que a atividade hemolítica de *F. nucleatum* pode estar relacionada com a presença de vários tipos de hemolisinas e outras substâncias pré-formadas, esses compostos talvez não tenham sido atingidos pela atividade de fotoablação do laser de érbio:YAG, nos períodos subinibitórios de irradiação.

Além desse aspecto, caso o LPS de *F. nucleatum* seja um dos principais responsáveis pela sua atividade hemolítica, isso poderia também explicar o pequeno efeito que as densidades de energia subinibitórias tiveram sobre esse fator de virulência, uma vez que essa característica microbiana apresenta grande estabilidade química; ou seja, esse composto é pouco afetado pelas condições ambientais em suas atividades biológicas (Falkler Jr. et al., 1983)³⁰, mostrando certa resistência até mesmo em temperaturas variando de 170°C a 250°C (Ludwig & Avis, 1990)⁸⁸.

Dessa forma, a quantidade de energia necessária para afetar o LPS de *F. nucleatum* poderia ser muito maior do que a necessária para eliminar a bactéria e, portanto, o efeito da densidade de energia subinibitória utilizada no presente estudo não teria, talvez, efeitos significativos sobre o LPS.

Entretanto, no estudo de Yamaguchi et al. (1997)¹⁵⁹, o laser de érbio:YAG foi capaz de eliminar 83,1% do LPS de *Escherichia coli*, mesmo utilizando uma densidade de energia de 300 mJ/cm², o qual corresponde a um valor próximo do presente estudo. Entretanto, pode-se considerar que mesmo que parte do LPS de *F. nucleatum* tenha sido alterada pela radiação do laser, a sua quantidade provavelmente ainda permanece elevada, o que se

torna relevante quando se verifica que esse componente é capaz de iniciar e exacerbar um processo inflamatório, mesmo quando o microrganismo já perdeu a sua viabilidade (Nair et al., 1997)¹⁰¹.

Quando compostos químicos são testados em concentrações subinibitórias, ocorre um efeito residual do mesmo no meio de cultura sobre o microrganismo. No entanto, é impossível manter a atividade de densidades de energias subinibitórias do laser no meio de cultura, após o tempo de aplicação, em função da própria propagação dos fótons. Portanto, a atividade residual do laser se mostra um pouco limitada, no que diz respeito à sua atuação sobre os fatores de virulência microbianos testados.

No entanto, efeitos transitórios sobre a fisiologia de *F. nucleatum*, durante a irradiação, podem ter ocorrido e quando o microrganismo foi cultivado em ágar sangue, o mesmo, na ausência de qualquer agente inibitório residual, pode ter recuperado as suas condições fisiológicas originais, uma vez que, de acordo com Moore et al. (1984)⁹², essa fusobactéria é capaz de se multiplicar a cada três horas quando cultivada em condições ideais, de forma que múltiplas gerações teriam se sucedido nos testes de hemólise “in vitro”.

Quanto à resistência a drogas antimicrobianas demonstrada por *F. nucleatum*, particularmente a macrolídeos (Kuriyama et al., 2001)⁷⁹ e β -lactâmicos (Roberts, 2002)¹¹⁶ esse item constitui um dos principais fatores de virulência, não só dessa espécie bacteriana como de várias outras, pois permite a sobrevivência do microrganismo a modalidades terapêuticas utilizadas pelo profissional, perpetuando a infecção.

Desta forma, o presente estudo avaliou a resistência de diferentes cepas de *F. nucleatum* em suspensão, irradiadas com tempos subinibitórios do laser de érbio:YAG, sendo cultivadas em seguida em meios contendo diferentes concentrações de amoxicilina, tetraciclina, metronidazol e eritromicina.

Quanto às drogas utilizadas, a amoxicilina é uma dos antimicrobianos mais empregados e tradicionalmente recomendado como antibiótico de primeira escolha em odontologia (Barclay, 1990;¹² Gill & Scully, 1990)⁵¹. A tetraciclina possui ampla utilização em periodontia, principalmente pela sua elevada atividade tópica (Radvar et al., 1996;¹¹⁴ Sterrett et al., 1997)¹⁴⁰. Os metroidimidazóis e o metronidazol, em particular, são considerados como as drogas de escolha para tratamento de infecções anaeróbias (Freeman et al., 1997)⁴¹.

Quanto a eritromicina, a mesma foi utilizada durante muitos anos como droga de segunda escolha, a despeito da sua ineficácia frente a microrganismos anaeróbios, em particular, *F. nucleatum* (Gaetti-Jardim Jr. et al., 1996;⁴⁷ Gaetti-Jardim Jr., 2001)⁴⁵, sendo, portanto, um bom modelo para estudar a influência de exposições subinibitórias do laser sobre esse microrganismo, que possui como um dos fatores de virulência a resistência a drogas antimicrobianas.

Pôde-se observar, no presente estudo, uma grande homogeneidade entre as diferentes cepas de *F. nucleatum* quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos estudados (tabela 4), o que contrasta com os resultados de Gaetti-Jardim Jr. et al (1996)⁴⁷. Nota-se talvez, que essa diferença estaria associada ao número de isolados testados, o qual, no presente estudo, foi consideravelmente menor do que o empregado por esses autores. Assim, verificou-se que as densidades de energias subinibitórias do laser de érbio:YAG não afetaram significativamente a susceptibilidade de *F. nucleatum* às drogas utilizadas.

Para tanto, nos testes que avaliaram as atividades subinibitórias do laser sobre a susceptibilidade a antimicrobianos, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) para cada droga, a

qual foi conceituada como a menor concentração da droga que inibiu totalmente o crescimento microbiano, desprezando-se o crescimento de uma a cinco colônias isoladas no ágar.

Dessa forma, para amoxicilina, a concentração inibitória mínima foi menor ou igual a 0,125 µg/ml, sendo que, embora Appeubaum et al. (1990)⁹ e Gaetti-Jardim Jr. et al. (1996)⁴⁷ tenham encontrado elevada resistência a esse antimicrobiano, essa concentração demonstra que as cepas de *F. nucleatum* testadas se mostraram bastantes sensíveis à droga, concordando, no entanto, com Le Goff et al. (1997)⁸² e Landucci (2002)⁸¹.

O mecanismo de resistência de *F. nucleatum* a esse β-lactâmico pode estar associado à produção de β-lactamases (Appeulbaum et al., 1990;⁹ Appeulbaum et al., 1991;¹⁰ Gaetti-Jardim Jr. et al., 1996;⁴⁷) as quais ficam ligadas à superfície dessa bactéria, permanecendo restritas ao espaço periplásmico. Assim, pode-se sugerir que o laser de érbio:YAG, nos tempos subinibitórios estudados não foi capaz de interferir na produção dessas enzimas.

Para o metronidazol, também se observou elevada sensibilidade das fusobactérias, estando de acordo com a literatura que evidenciou elevada eficácia desse quimioterápico sobre anaeróbios

obrigatórios Gram-negativos (Rolfe et al., 1981;¹¹⁸ Pankuch et al., 1993)¹⁰⁶, particularmente sobre *F. nucleatum* (Panichi et al., 1990;¹⁰⁵ Appelbaum et al., 1990;⁹ Gaetti-Jardim Jr. et al., 1996)⁴⁷.

O mecanismo de ação do metronidazol ocorre em função da presença das enzimas nitrato redutase e piruvato-ferredoxina oxidorreductase, que constituem parte do metabolismo primário de *F. nucleatum*. A primeira é responsável pelo acúmulo dessa droga no interior da célula bacteriana, e a segunda, reduz o grupo nitro da droga, convertendo-a na forma quimicamente ativa, capaz de atuar no DNA bacteriano (Narikawa, 1986)¹⁰³.

A resistência ao metronidazol é extremamente incomum para bactérias anaeróbias Gram negativas (Listgarten et al., 1993;⁸⁶ Sbordone et al., 1995;¹²⁴ Van Winkelhoff et al., 2000)¹⁴⁹, sendo que alguns desses microrganismos o são pela modificação naquelas enzimas que transferem elétrons para o metronidazol e também pela impermeabilidade a drogas (Samuelson, 1999)¹²².

Nesse particular, a partir da observação de que o laser de érbio:YAG não proporcionou uma sensibilidade ainda maior das cepas de *F. nucleatum* ao metronidazol, pode-se sugerir que a irradiação não foi capaz

de atuar de maneira significativa sobre as reações enzimáticas dessa bactéria, ou a atividade fisiológica do microrganismo foi revertida durante o seu crescimento no meio de cultura utilizado no teste de susceptibilidade, de forma semelhante como anteriormente sugerido para atividade hemolítica.

Para eritromicina, as cepas se mostraram menos sensíveis, sendo que foi necessária uma CIM de 4 µg/ml para a eliminação de *F. nucleatum*. Essa menor sensibilidade demonstrada está de acordo com a literatura (Gaetti-Jardim Jr. et al., 1996;⁴⁷ Kuriyama et al., 2001)⁷⁹, e é decorrente da produção de RNA-metilase, por esse microrganismo, que altera ribonucleoproteínas junto ao sítio de ligação dessa droga, impedindo a ligação desse macrolídeo (Halula & Macrina, 1990)⁵⁹.

Dessa forma, verifica-se que caso o laser não tenha afetado a atividade enzimática, pode-se sugerir que a atividade das enzimas microbianas pré-formadas não foi afetada, bem como a produção de novas enzimas capazes de interferir na resistência a essa droga.

Em relação à tetraciclina, a CIM foi menor ou igual a 0,25 µg/ml, mostrando-se, mais uma vez uma sensibilidade dessa fusobactéria, apesar de ser demonstrada uma certa resistência de *F. nucleatum* a essa droga

(Gaetti-Jardim Jr., 2001)⁴⁵, a qual pode estar associado a mutações cromossômicas ou a aquisição de genes de resistência (Roberts, 2002)¹¹⁶.

Verifica-se, portanto, que a irradiação do laser de érbio:YAG nos tempos subinibitórios estudados, não afetou a susceptibilidade de *F. nucleatum* aos antimicrobianos testados. Provavelmente não houve uma somatória da atividade inibitória do laser com a droga, pois talvez a radiação do laser não tenha sido capaz de interferir com as reações enzimáticas e características genéticas dessa bactéria, ou que o microrganismo, de alguma forma, recuperou da ação do laser, mesmo na presença do antimicrobiano.

Os testes com densidades de energias subinibitórias sobre cada cepa de *F. nucleatum*, demonstraram que não houve nenhuma alteração irreversível sobre as bactérias. Esses resultados sugerem que, ao verificar que o laser não deixa qualquer atividade residual e o mesmo não eliminou a viabilidade microbiana, esse microrganismo pode se recuperar e recobrar a sua virulência voltando a agredir o hospedeiro.

Tendo em vista a atividade antimicrobiana demonstrada no presente estudo e ausência de qualquer atividade residual do laser de érbio:YAG, o uso do mesmo, para controle de doenças associadas a

biofilmes microbianos somente se justifica quando a eliminação de parte significativa dessa microbiota já se mostra adequada para o controle dessas patologias.

7. Conclusão

7. CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados pelo presente estudo, pode-se concluir que:

- a atividade antibacteriana do laser de érbio:YAG sobre os microrganismos na forma de biofilme pode ser eficaz, em função do tempo de irradiação, bem como dos parâmetros físicos utilizados;
- o tempo de irradiação de 20 a 60 segundos, com o laser de érbio:YAG, demonstrou uma redução significativa sobre os microrganismos presentes no biofilme de composição definida;
- microrganismos presentes no biofilme salivar foram mais sensíveis à radiação do laser de érbio:YAG em menores períodos de tempo, quando comparado com o biofilme de composição definida;
- microrganismos em estado planctônico sobre os corpos-de-prova, são, consideravelmente, mais sensíveis ao laser do que quando em forma de biofilme;

- o laser não deixa qualquer tipo de atividade residual sobre os microrganismos irradiados, de forma que a aplicação do laser em tempos subinibitórios não afetou a atividade hemolítica, tampouco a resistência a drogas dessas fusobactérias.

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABU-FANAS, S. H., DRUCKER, D. B., HULL, P. S.
Amoxycillin with clavulanic acid and tetracycline in
periodontal therapy. *J. Dent.*, v.19, n.2, p.97-9, 1991.
2. ADRIAN, J. C., GROSS, A. A new method of sterilization: the
carbon dioxide laser. *J. Oral Pathol.*; v.8, n.1, p. 60-1, 1979.
3. AKPATA, E. S., BLECHMAN, H. Bacterial invasion of pulpal
dentin wall in vitro. *J. Dent. Res.*, v.61, n.2, p.435-8, 1982.
4. ANASTASAKIS, S. The use of a pulsed Nd:YAG laser in
periodontal therapy - a comparative clinical study. *J. Clin.
Periodontol.*, v.27, p.48, 2000. (abstr. 122)
5. ANDERSEN, R. N., GANESHKUMAR, N.,
KOLEMBRANDER, P. E. *Helicobacter pylori* adheres
selectively to *Fusobacterium* spp. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.13,
n.1, p.51-4, 1998.
6. ANDO, Y., AOKI, A., WATANABE, H., ISHIKAWA, I.
Bactericidal effect of erbium:YAG laser on periodontopathic
bacteria. *Lasers Surg. Med.*, v.19, n.2, p.190-200, 1996.

7. AOKI, A., ANDO, Y., WATANABE, H., ISHIKAWA, I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an erbium:YAG laser. *J. Periodontol.* v.65, n.12, p.1097-106, 1994.
8. AOKI, A., MIURA, M., AKIYAMA, F., NAKAGAWA, N., TANAKA, J., ODA, S., WATANABE, H., ISHIKAWA, I. In vitro evaluation of Er:YAG laser scaling of subgingival calculus in comparison with ultrasonic scaling. *J. Periodontal Res.*, v.35, n.5, p.266-77, 2000.
9. APPELBAUM, P. C., SPANGLER, S. K., JACOBS, M. R. β -lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole of 320 non-Bacteroides fragilis Bacteroides isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S.centers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.34, n.8, p.1546-50, 1990.
10. APPELBAUM, P. C., SPANGLER, S. K., SHIMAN, R., JACOBS, M. R. Susceptibilities of 394 Bacteroides fragilis, non-B. fragilis group Bacteroides species, and Fusobacterium species to newer antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.35, n.6, p.1214-18, 1991.

11. BACH, G., NECKEL, C., MALL, C., KREKELER, G.
Conventional versus laser-assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study. *Implant Dent.*, v.9, n.3, p.247-51, 2000.
12. BARCLAY, J. K. Antibiotics revisited. *N. Z. Dent. J.*, v.86, n.384, p.44-7, 1990.
13. BARTOLD, P. M., GULLY, N. J., ZILM, P. S., ROGERS, A. H.
Identification of components in *Fusobacterium nucleatum* chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. *J. Periodontal Res.*, v.26, n.4, p.314-22, 1991.
14. BEN HATTI, Y., BLUM, R., SEVERIN, C., MAQUIN, M., JABRO, M. H. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: an in vivo study. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.14, n.3, p.137-43, 1996.
15. BENNETT, K. W., DUERDEN, B. I. Identification of fusobacteria in a routine diagnostic laboratory. *J. Appl. Bacteriol.*, v.59, n.2, p.171-81, 1985.
16. BEUCHAT, M., BUSSLINGER, A., SCHMIDLIN, P. R., MICHEL, B., LEHMANN, B., LUTZ, F. Clinical comparison

- of the effectiveness of novel sonic instruments and curettes for periodontal debridement after 2 months. *J. Clin. Periodontol.*, v.28, n.12, p.1145-50, 2001.
17. BHATTI, M., MacROBERT, A., MEGHJI, S., HENDERSON, B., WILSON, M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem. Photobiol.*, v.68, n.3, p.370-6, 1998.
18. BOLSTAD, A. I., JENSEN, H. B., BAKKEN, V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.9, n.1, p.55-71, 1996.
19. CARLSSON, J. Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv. Dent. Res.*, v.11, n.1, p.75-80, 1997.
20. CLAEISSON, R., EDLUND, M., PERSSON, S., CARLSSON, J. Production of volatile sulfur compounds by various *Fusobacterium* species. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.5, n.3, p.137-42, 1990.
21. COBB, C. M., McCRAWLEY, T. K., KILLOY, W. J. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root

- surfaces and subgingival microflora in vivo. *J. Periodontol.*, v.63, n.8, p.701-7, 1992.
22. COFFELT, D. W., COBB, C. M., NACNEILL, S., RAPLEY, J. W., KILLOY, W. J. Determination of energy density threshold for laser ablation of bacteria: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.*, v.24, n.1, p.1-7, 1997.
23. COOK, G. S., COSTERTON, J. W., LAMONT, R. J. Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *J. Periodontal Res.*, v.33, n.33, p.323-7, 1998.
24. COSTERTON, J. W., CHENG, K. J., GEESEY, G. G., LADD, T. I.; NICKEL, J. C., DASGUPTA, M., MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev. Microbiol.*, v.41, p.435-64, 1987.
25. DE BEER, D., SRINIVASAN, R., STEWART, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, n.12, p.4339-44, 1994.
26. DEDERICH, D. N., PICKARD, M. A., VAUGHN, A. S., TULIP, J., ZAKARIASEN, K. L. Comparative bactericidal

- exposures for selected oral bacteria using carbon dioxide laser radiation. *Lasers Surg. Med.*, v.10, n.6, p.591-4, 1990.
27. DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.15, n.2, p.167-93, 2002.
28. DOSTÁLOVÁ, T., JELÍNKOVÁ, H., KREJSA, O., HAMAL, K., KUBELKA, J., PROCHÁZKA, S., HIMMLOVÁ, L. Dentin and pulp response to Erbium:YAG laser ablation: a preliminary evaluation of human teeth. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.15, n.3, p.117-21, 1997.
29. FALK, W., DIETZEL, K., KÖNIG, J., RÜHLING, A., KELLER, U., ALBERS, H-K., JEPSEN, S. Antimicrobial and antiinflammatory effects of a novel Er:YAG laser systems for subgingival debridement. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.51, 2000. (abstr. 131)
30. FALKLER, W. A. Jr., CLAYMAN, E. B., SHAEFER, D. F. Haemolysis of human erythrocytes by *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease. *Arch. Oral Biol.*, v.28, n.8, p.735-9, 1983.

31. FINKBEINER, R. L. The results of 1328 periodontal pockets treated with the argon laser: selective pocket thermolysis. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.13, n.4, p.273-81, 1995.
32. FIVES-TAYLOR, P. M., MEYER, D. H., MINTZ, K. P., BRISSETTE, C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol.* 2000, v.20, p.136-67, 1999.
33. FOLWACZNY, M., LIESENHOFF, T., LEHN, N., HORCH, H. H. Bactericidal action of 308 nm excimer-laser radiation: an in vitro investigation. *J. Endod.*, v.24, n.12, p.781-5, 1998.
34. FOLWACZNY, M., MEHL, A., AGGSTALLER, H., HICKEL, R. Antimicrobial effects of 2.94 μm Er:YAG laser radiation on root surfaces: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.*, v.29, n.1, p.73-8, 2002.
35. FOLWACZNY, M., MEHL, A., AGGSTALLER, H., HICKEL, R. Reduction of periodontopathogenic bacteria on root surfaces using 2,94 μm Er:YAG laser radiation. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.49, 2000. (abstr. 132)
36. FOLWACZNY, M., MEHL, A., HAFFNER, C., HICKEL, R. Substance removal on teeth with and without calculus using

- 308 nm XeCl excimer laser radiation: an in vitro investigation. *J. Clin. Periodontol.*, v.26, n.5, p.306-12, 1999.
37. FOLWACZNY, M., MEHL, A., JORDAN, C., HICKEL, R. Antibacterial effects of pulsed Nd:YAG laser radiation at different energy settings in root canals. *J. Endod.*, v.28, n.1, p.24-9, 2002.
38. FOLWACZNY, M., MEHL, A., HAFFNER, C., BENZ, C., HICKEL, R. Root substance removal with Er:YAG laser radiation at different parameters using a new delivery system. *J. Periodontol.*, v.71, n.2, p.147-55, 2000.
39. FOLWACZNY, M., THIELE, L., MEHL, A., HICKEL, R. The effect of working tip angulation on root substance removal using Er:YAG laser radiation: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.*, v.28, n.3, p.220-226, 2001.
40. FORNG, R. Y., CHAMPAGNE, C., SIMPSON, W., GENCO, C. A. Environmental cues and gene expression in *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Dis.*, v.6, n.6, p. 351-65, 2000.

41. FREEMAN, C. D., KLUTMAN, N. E., LAMP, K. C.
Metronidazole: a therapeutic review and update. *Drugs*, v.54, n.5, p.679-708, 1997.
42. FUJII, T., BAEHNI, P. C., KAWAI, O., KAWAKAMI, T., MATSUDA, K., KOWASHI, Y. Scanning electron microscopic study of the effects of Er:YAG laser on root cementum. *J. Periodontol.*, v.69, n.11, p.1283-90, 1998.
43. FUJITA, K., AKINO, T., YOSHIOKA, H. Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, v.56, n.5, p.1385-7, 1988.
44. GAETTI-JARDIM JÔNIO, E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Haemagglutination and haemolysis by oral *Fusobacterium nucleatum*. *Microbiologica*, v.22, n.1, p.63-7, 1999.
45. GAETTI-JARDIM JÔNIO, E. *Estudo da microbiota anfibiótica presente no interior de canais radiculares de dentes com polpa necrótica: susceptibilidade ao hidróxido de cálcio e fatores de virulência*. Araçatuba, 2001. 416p. Tese (Livre-Docência). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

46. GAETTI-JARDIM JÔNIO, E., MARTINS, A. L., ÂMBARLINS, S. *Antimicrobianos em Periodontia*. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. (Apostila), 2002. 104p.
47. GAETTI-JARDIM JÔNIO, E., ZELANTEN F., ÁVILA-CAMPOS, M. J. Oral species of *Fusobacterium* from human and environmental samples. *J. Dent.*, v.24, n.5, p. 345-8, 1996.
48. GASPIRC, B., SKALERIC, U. Morphology, chemical structure and diffusion processes of root surface after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation. *J. Clin. Periodontol.*, v.28, n.6, p.508-16, 2001.
49. GHARBIA, S. E., SHAH, H. N. Characteristics of glutamate dehydrogenase, a new diagnostic marker for the genus *Fusobacterium*. *J. Gen. Microbiol.*, v.134, n.2, p.327-332, 1988.
50. GILBERT, P., COLLIER, P. J., BROWN, M. R. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.34, n.10, p.1865-8, 1990.
51. GILL, Y., SCULLY, C. Orofacial odontogenic infections: review of microbiology and current treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*, v.70, n.2, p.155-8, 1990.

52. GÓMEZ, M., ROMANELLI, H., SZNAJDER, N., CHIAPPE, V., BERNAT, M. I., LAVANDEIRA, H., MACCHI, R. Acción de la espiramicina en la periodontitis del adulto. *Rev. Asoc. Odontol. Argent.*, v.86, n.6, p.574-82, 1998.
53. GRONQVIST, A., WISTROM, J., AXNER, O., MONSEN, T. J. Bactericidal effect of pulsed 1,064 nm Nd:YAG laser light on *Staphylococcus epidermidis* is of photothermal origin: an in vitro study. *Lasers Surg. Med.*, v.27, n.4, p.336-40, 2000.
54. GUTIERREZ, J. H., JOFRE, A., VILLENA, F. Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. *Oral Surg. Oral med. Oral Pathol.*, v.69, n.4, p.491-501, 1990.
55. GUTKNECHT, N., MORITZ, A., CONRADS, G., SIEVERT, T., LAMPERT, F. Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in *in vitro* root canals. *J. Clin. Laser Med Surg.*, v.14, n.2, p.77-80, 1996.
56. GUTKNECHT, N., NUEBLER-MORITZ, M., BURGHARDT, S. F., LAMPERT, F. The efficiency of root canal disinfection using a holmium: yttrium-aluminum-garnet laser *in vitro*. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.15, n.2, p.75-8, 1997.

67. GUTKNECHT, N., VAN GOGSWAARDT, D., CONRADS, G., APEL, C., SCHUBERT, C., LAMPERT, F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J. Clin. Laser Med Surg.*, v.18, n.2, p.57-60, 2000.
58. HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* 2000, v.5, p.78-111, 1994.
59. HALULA, M., MACRINA, F. L. Tn5030: a conjugative transposon conferring clindamycin resistance in *Bacteroides* species. *Rev. Infect. Dis.*, v.12 (suppl. 2) p.S235-42, 1990.
60. HARDEE, M. W., MISERENDINO, L. J., KOS, W., WALIA, H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. *J. Endod.*, v.20, n.8, p.377-80, 1994.
61. HENRY, C. A., JUDY, M., DYER, B., WAGNER, M., MATTHEWS, J. L. Sensitivity of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in liquid media to argon laser. *Photochem. Photobiol.*, v.61, n.4, p.410-3, 1995.
62. HIBST, R., KELLER, U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg. Med.*, v.9, n.4, p.338-44, 1989.

63. HILLMAN, J. D., MAIDEN, M. F., PFALLER, S. P., MARTIN, L., DUCAN, M. J., SOCRANSKY, S. S. Characterization of hemolytic bacteria in subgingival plaque. *J. Periodontal. Res.*, v.28, n.3, p.173-9, 1993.
64. HOLDEMAN, L. V., CATO, E., MOORE, W. E. C. *Anaerobic laboratory manual*. 4th ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977. 154p.
65. HOLMES, B., GROSS, R. J. *Escherichia coli*. In: Wilson G. S., Miles, A. A., Parker, M. T. Topley and Wilson's *Principles of bacteriology, virology and immunity*. 7th ed. Baltimore: Williams & Williams, 1983, v.2, p.286-90. apud SCHULTZ, R. J., HARVEY, G. P., FERNANDEZ-BEROS, M. E., KRISHNAMURTHY, S., RODRIGUEZ, J. E., CABELLO, F. Bactericidal effects of the neodymium:YAG laser: in vitro study. *Laser Surg Med*, v.6, n.5, p.445-8, 1986.
66. HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., TALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.
67. HOOKS, T. W., ADRIAN, J. C., GROSS, A., BERNIER, W. E. Use of the carbon dioxide laser in sterilization of endodontic

- reamers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.49, n.3, p.263-5, 1980.
68. ISRAEL, M., COBB, C. M., ROSSMANN, J. A., SPENCER, P. The effects of CO₂, Nd:YAG and Er:YAG laser with and without surface coolant on tooth root surfaces an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.*, v.24, n.9, pt.1, p.595-602, 1997.
69. JAYAWARDENA, J. A., KATO, J., MORIYA, K., TAKAGI, Y. Pulpal response to exposure with Er:YAG laser. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.91, n.2, p.222-9, 2001.
70. JELÍNKOVÁ, H., DOSTÁLOVÁ, T., DUSKOVÁ, J., KRÁTKĚ, M., MIYAGI, M., SHOJI, S., SULC, J., NEMEC, M. Er:YAG and alexandrite laser radiation propagation in root canal and its effect on bacteria. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.17, n.6, p.267-72, 1999.
71. JENG, J. H., CHEN, K. W., LIN, C. P., CHOU, H. G., LAN, W. H. Ultrastructural changes of the tooth root surface by Nd:YAG laser irradiation followed by citric acid and tetracycline. *J. Formos Med. Assoc.*, v.98, n.4, p.242-7, 1999.
72. JENKINSON, H. F., DYMOCK, D. The microbiology of periodontal disease. *Dent. Update*, v.26, n.5, p.191-7, 1999.

73. 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*, v.23, n.5, p.299-309, 1998.
74. KELLER, U., HIBST, R. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances (II). Light microscopic and SEM investigation. *Lasers Surg. Med.*, v.9, n.4, p.345-51, 1989.
75. KLEIN, E., FINE, S., AMBRUS, J., COHEN, E., NETER, E., AMBRUS, C., BARDOS, T., LYMAN, R. Interaction of laser radiation with biologic systems. III. Studies on biologic systems in vitro. *Fed. Proc.*, v.24, p.S104-S110, 1965.
76. KLINKE, T., KLIMM, W., GUTKNECHT, N. Antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation within root canal dentin. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.15, n.1, p.29-31, 1997.
77. KOLEMBRANDER, P. E., ANDERSEN, R. N., MOORE, L. V. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect. Immun.*, v.57, n.10, p.3194-203, 1989.

78. KOLENBRANDER, P. E., LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.*, v.175, n.11, p.3247-52, 1993.
79. KURIYAMA, T., KARASAWA, T., NAKAGAWA, K., YAMAMOTO, E., NAKAMURA, S. Incidence of beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of anaerobic gram-negative rods isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.16, n.1, p.10-5, 2001.
80. KUHN, M., KATHARIOU, S., GOEBEL, W. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, v.56, n.1, p.79-82, 1988.
81. LANDUCCI, L. F. *Influência de concentrações subinibitórias de antimicrobianos sobre fatores de virulência de isolados de Fusobacterium nucleatum obtidos de dentes com polpa necrótica*. São José dos Campos, 2002. 80p. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal). Universidade Estadual Paulista.
82. LE GOFF, A., DAUTEL-MORAZIN, A., GUIGAND, M., VULCAIN, J. M., BONNAURE-MALLET, M. An evaluation

- of the CO₂ for endodontic disinfection. *J. Endod.*, v.25, n.2, p.105-8, 1999.
83. LIOUBAVIANA, N., JENSEN, J., KARRING, T. Comparison of Nd:YAG laser surgery with conventional flap surgery in the treatment of deep periodontal pockets controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.34, 2000. (abstract 67)
84. LI, Z. Z., CODE, J. E., VAN DE MERWE, W. Er:YAG laser ablation of enamel and dentin of human teeth: determination of ablation rates at various fluences and pulse repetition rates. *Lasers Surg. Med.*, v.12, n.6, p.625-30, 1992.
85. LILJEMARK, W. F., BLOOMQUIST, C. G., REILLY, B. E., BERNARDS, C. J., TOWNSEND, D. W., PENNOCK, A. T., LeMOINE, J. L. Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. *Adv. Dent. Res.*, v.11, n.1, p.14-23, 1997.
86. LISTGARTEN, M. A., LAI, C. H., YOUNG, V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J. Periodontol.*, v.64, n.3, p.155-61, 1993.

87. LIU, C. M., HOU, L. T., WONG, M. Y., LAN, W. H.
Comparison of Nd:YAG laser versus scaling and root planing
in periodontal therapy. *J. Periodontol.*, v. 70, n.11, p. 1276-82,
1999.
88. LUDWIG, J. D., AVIS, K. E. Dry heat inactivation of endotoxin
on the surface of glass. *J. Parenter. Sci. Technol.*, v.44, n.1, p.4-12,
1990.
89. MCGUFF, P. E., BELL, E. J. The effect of laser energy radiation
on bacteria. *Med. Biol. Illus.*, v.16, n.3, p.191-3, 1966.
90. MEHL, A., FOLWACZNY, M., HAFFNER, C., HICKEL, R.
Bactericidal effects of 2.94µm Er:YAG laser radiation in dental
roots canals. *J. Endod.*, v.25, n.7, p.490-3, 1999.
91. MELLO, J. B., MELLO, G. P. S. *Laser em Odontologia*. São Paulo:
Ed. Santos, 2001. 174p.
92. MOORE, W. E. C., HOLDEMAN, L. V., KELLEY, R. W.
Genus II *Fusobacterium*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.631-7.
93. MOORE, W. E., MOORE, L.V. The bacteria of periodontal
diseases. *Periodontol. 2000*, v.5, p.66-77, 1994.

94. MORITZ, A., GUTKNECHT, N., DOERTBUDAK, O., GOHARKHAY, K., SCHOOP, U., SCHAUER, P., SPERR, W. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.15, n.1, p.33-7, 1997.
95. MORITZ, A., SCHOOP, U., GOHARKHAY, K., JAKOLITSCH, S., KLUGER, W., WERNISCH, J., SPERR, W. The bactericidal effect of Nd:YAG, Ho:YAG and Er:YAG laser irradiation in the root canal: an in vitro comparison. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.17, n.4, p.161-4, 1999.
96. MORITZ, A., SCHOOP, U., GOHARKHAY, K., SCHAUER, P., DOERTBUDAK, O., WERNISCH, J., SPERR, W. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers Surg. Med.*, v.22, n.5, p.302-11, 1998.
97. MORLOCK, B. J., PIPPIN, D. J., COBB, C. M., KILLOY, W. J., RAPLEY, J. W. The effect of Nd:YAG laser exposure on root surface when used as an adjunct to root planing: an in vitro study. *J. Periodontol.*, v.63, n.7, p.637-41, 1992.
98. MOSHONOV, J., ORSTAVIK, D., YAMAUCHI, S., PETTINETTE, M., TROPE, M. Nd:YAG laser irradiation in

- root canal disinfection. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.11, n.5, p.220-4, 1995.
99. MOUHYI, J., LOIR, B., SENNERBY, L., DOUAT, N. Evaluation of CO₂ laser and H₂O₂ as an adjunctive method to sterilize contaminated titanium foils and cover-screws. An in-vitro study. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.49, 2000. (abstr. 126)
100. MULLARKY, M. B., NORRIS, C. W., GOLDBERG, I. D. The efficacy of the CO₂ laser in the sterilization of skin seeded with bacteria: survival at the skin surface and in the plume emissions. *Laryngoscope*, v.95, p.186-187, 1985.
101. NAIR, P. N. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol. 2000*, v.13, p.121-48, 1997.
102. NANDAKUMAR, K., SHINOZAKI, T., OBIKA, H., OOIE, T., UTSUMI, A., YANO, T. Impact of pulsed Nd:YAG laser on the marine biofilm-forming bacteria *Pseudoalteromonas carrageenovora*: significance of physiological status. *Can. J. Microbiol.*, v.48, n.4, p.326-32, 2002.

103. NARIKAWA, S. Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *J. Antimicrob. Chemother*, v.18, n.5, p.565-74, 1986.
104. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference agar dilution procedure for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria approved stand, M. H. A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villa Nova, PA, 1985.
105. PANICHI, G., DI ROSA, R., ENRICO, P., BABUDIERI, S. Anaerobic bacteria and bacterial infections: perspectives on treatment and resistance in Italy. *Rev. Infect. Dis.*, v.12, suppl. 2, p.S152-S6, 1990.
106. PANKUCH, G. A., JACOBS, M. R., APPELBAUM, P. C. Susceptibilities of 428 gram-positive and negative anaerobic bacteria to Bay Y3118 compared with their susceptibilities to ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole, piperacillin, piperacillin-tazobactan, and ceftiofur. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.37, n.8, p.1649-54, 1993.

107. PARASKEVAS, S. The use a pulsed Nd:YAG laser in periodontal therapy - a comparative microbiological study. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.34, 2000. (abstract. 68)
108. PARKER, M. T. *Staphylococcus aureus*. In: WILSON G. S., MILES, A. A., PARKER, M. T. *Principles of Bacteriology, virology and immunity*. Baltimore: Williams & Williams, 1983, v.2, p.219-221. apud: SCHULTZ, R. J., HARVEY, G. P., FERNANDEZ-BEROS, M. E., KRISHNAMURTHY, S., RODRIGUEZ, J. E., CABELLO, F. Bactericidal effects of the neodymium:YAG laser: in vitro study. *Laser Surg Med*, v.6, n.5, p.445-8, 1986.
109. PATON, J. C., BERRY, A. M., LOCK, R. A., HANSMAN, D., MANNING, P. A. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding pneumolysin. *Infect. Immun.*, v.54, n.1, p.50-5, 1986.
110. POWELL, G. L., WHISENANT, B. K. Comparison of three lasers for dental instrument sterilization. *Lasers Surg. Med.*, v.11, n.1, p.69-71, 1991.
111. QUIRYNEN, M., TEUGHEL, W., DE SOETE, M., VAN STEENBERGHE, D. Topical antiseptics and antibiotics in the

- initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol. 2000*, v.28, p.72-90, 2002.
112. RADVAR, M., CREANOR, S. L., GILMOUR, W. H., PAYNE, A. P., MCGADEY, J., FOYE, R. H., WHITTERS, C. J., KINANE, D. F. An evaluation of the effects of an Nd:YAG laser on subgingival calculus, dentine and cementum. An in vitro study. *J. Clin. Periodontol.*, v.22, n.1, p.71-7, 1995.
113. RADVAR, M., MC FARLANE, T. W., MACKENZIE, D., WHITTERS, C. J., PAYNE, A. P., KINANE, D. F. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Br. Dent. J.*, v.180, n.2, p.57-62, 1996.
114. RADVAR, M., POURTAGHI, N., KINANE, D. F. Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets. *J. Periodontol.*, v.67, n.9, p.860-5, 1996b.
115. RAMSKÖLD, L. O., FONG, C. D., STRÖMBERG, T. Thermal effects and antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root canals with na Nd:YAG laser. *J. Endod.*, v.23, n.2, p.96-100, 1997.
116. ROBERTS, M. C. Antibiotic: toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol. 2000*, v.28, p.280-97, 2002.

117. ROGERS, A. H., ZILM, P. S., GULLY, N. J., PFENNIG, A. L., MARSH, P. D. Aspects of the growth and metabolism of *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 in continuous culture. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.6, n.4, p.250-5, 1991.
118. ROLFE, R. D., FINEGOLD, S. M. Comparative in vitro activity of new beta-lactam antibiotics against anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.20, n.5, p.600-9, 1981.
119. ROONEY, J., MIDDA, M., LEEMING, J. A laboratory investigation of the bactericidal effect of a Nd:YAG laser. *Br. Dent. J.*; v.176, n.2, p.61-4, 1994.
120. ROWLAND, M. D., DEL BENE, V. E., LEWIS, J. W. Factors affecting antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.*, v.25, n.3, p.476-9, 1987.
121. SADOUDI, A. K., HERRY, J. M., CERF, O. Elimination of adhering bacteria from surfaces by pulsed laser beams. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.24, n.3, p.177-9, 1997.
122. SAMUELSON, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, n.7, p.1533-41, 1999.

123. SARKAR, S., WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J. Periodont. Res.*, v.28, n.3, p.204-10, 1993.
124. SBORDONE, L., BARONE, A., RAMAGLIA, L., CIAGLIA, R. N., IACONO, V. J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathic bacteria associated with failing implants. *J. Periodontol.*, v.66, n.1, p.69-74, 1995.
125. SCHENK, G., FOLWACZNY, M., MEHL, A., AGGSTALLER, H., HICKEL, R. Effect of 2,94 μm Er:YAG laser radiation on root surfaces contaminated with bacterial endotoxin. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.49, 2000. (abstr. 128)
126. SCHULTZ, R. J., HARVEY, G. P., FERNANDEZ-BEROS, M. E., KRISHNAMURTHY, S., RODRIGUEZ, J. E., CABELLO, F. Bactericidal effects of the neodymium:YAG laser: in vitro study. *Laser Surg Med*, v.6, n.5, p.445-8, 1986.
127. SCHWARZ, F., SCULEN, A., GEORG, T., REICH, E. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to scaling and root planing. A controlled clinical study. *J. Periodontol.*, v.72, n.3, p.361-7, 2001.

128. SCHWARZ, F., SCULEAN, A., REICH, E. Periodontal treatment with an erbium:YAG laser compared to scaling and root planing. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.49, 2000. (abstr. 123)
129. SEAL, G. J., 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. Endod. J.*, v.35, p.268-74, 2002.
130. SLOTS, J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Microbiol.*, v.15, p.606-9, 1982.
131. SLOTS, J., TING, M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol. 2000*, v.28, p.106 – 76, 2002.
132. SLOTS, J. The search for effective, safe and affordable periodontal therapy. *Periodontol. 2000*, v. 28, p.9 – 11, 2002.
133. SLOTS, J., GENCO, R. J. Black pigmented *Bacteroides* species and *Capnocytophaga* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. *J. Dent. Res.* v.63, n.3, p.412-21, 1984.

-
134. SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D. Dental biofilmes: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000, v.28, p.12 – 55, 2002.
135. SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J. Periodontol.*, v.63, n.4, suppl., p.322-31, 1992.
136. SPENCER, P., COBB, C. M., WIELICZKA, D. M., GLAROS, A. G., MORRIS, P. J. Change in temperature of subjacent bone during soft tissue laser ablation. *J. Periodontol.* v.69, n.11, p.1278-82, 1998.
137. SPENCER, P., TRYLOVICH, D. J., COBB, C. M. Chemical characterization of lased root surfaces using fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *J. Periodontol.*, v.63, n.7, p.633-6, 1992.
138. STABHOLZ, A., KETTERING, J., NEEV, J., TORABINEJAD, M. Effects of the XeCl excimer laser on *Streptococcus mutans*. *J. Endod.*, v.19, n.5, p.232-5, 1993.
139. STELZEL, M., FLORES-DE-JACOBY, L. Topical metronidazole applications as na adjunct to scaling and root planing. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, n.6, p.447-52, 2000.

140. STERRETT, J. D., SIMMONS, J., WHITFORD, G., RUSSELL, C. M. Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. *J. Clin. Periodontol.*, v.24, n.7, p.457-63, 1997.
141. SUTTER, V. L., BARRY, A. L., WILKINS, T. D., ZABRANSKY, R. J. Collaborative evaluation of a proposed reference dilution method of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.16, n.4, p.495-502, 1979.
142. TEWFIK, H. M., GARNICK, J. J., SCHUSTER, G. S., SHARAWY, M. M. Structural and functional changes of cementum surface following exposure to a modified Nd:YAG laser. *J. Periodontol.*, v.65, n.4, p.297-302, 1994.
143. THEODORO, L. H., MILANEZI, F. M., GARCIA, V. G., MILANEZI, L. A. Lasers em superfície radicular. *Robrac*, v.10, n.30, p.9-13, 2001.
144. TONETTI, M. S., MOMBELLI, A. Early – onset periodontitis. *Ann Periodontol.*, v.4, n.1, p.39-52, 1999.
145. TRAVIS, J., PIKE, R., IMAMURA, T., POTEMPA, J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the

- development of periodontitis. *J. Periodontol. Res.*, v.32, 1 pt 2, p.120-5, 1997.
146. TRYLOVICH, D. J., COBB, C. M., PIPPIN, D. J., SPENCER, P., KILLOY, W. J. The effects of the Nd:YAG laser on in vitro fibroblast attachment to endotoxin-treated root surfaces. *J. Periodontol.*, v.63, n.7, p.626-32, 1992.
147. TSENG, P., GILKESON, C. F., PALMER, J., LIEW, V. The bactericidal effect of a Nd:YAG laser in vitro. *J. Dent. Res.*, v.70, n.4, p.650, 1991. (abstr. 62)
148. USACHEVA, M. N., TEICHERT, M. C., BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg. Med.*, v.29, n.2, p.165-73, 2001.
149. VAN WINKELHOFF, A. J., HERRERA GONZALES, D., WINKEL, E. G., DELLEMIJN-KIPPUW, N., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E., SANZ, M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between the Netherlands and Spain. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.79-86, 2000.

150. VISURI, S. R., WALSH, J. T., WIDGOR, H. A. Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of water cooling. *Lasers Surg. Med.*, v.18, n.3, p.294-300, 1996.
151. WALKER, C. B., RATLIFF, D., MULLER, D., MANDELL, R., SOCRANSKY, S. S. Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets. *J. Clin. Microbiol.*, v.10, n.6, p.844-9, 1979.
152. WARD, G. D., WATSON, I. A., STEWART-TULL, D. E., WARDLAW, A. C., CHATWIN, C. R. Inactivation of bacteria and yeasts on agar surfaces with high power Nd:YAG laser light. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.23, n.3, p.136-40, 1996.
153. WARD, G. D., WATSON, I. A., STEWART-TULL, D. E. S., WARDLAW, A. C., WANG, R. K., NUTLEY, M. A., COOPER, A. Bactericidal action of high-power Nd:YAG light on *Escherichia coli* in saline suspension. *J. Appl. Microbiol.*, v.89, n.3, p.517-25, 2000.
154. WHITE, J. M., GOODIS, H. E., COHEN, J. N. Bacterial reduction of effect of a Nd:YAG laser in vitro. *J. Dent. Res.*, v.70, p.412, 1991.

155. WHITE, J. M., GOODIS, H. E., ROSE, C. M. Nd:YAG pulsed infrared laser for treatment of root surface. *J. Calif. Dent. Assoc.*, v.19, n.11, p.55-8, 1991.
156. WILDER-SMITH, P., ARRASTIA, A. M., SCHELL, M. J., LIAW, L. H., GRILL, G., BERNIS, M. W. Effect of Nd:YAG laser irradiation and root planing on the root surface: structural and thermal effects. *J. Periodontol.*, v.66, n.12, p.1032-9, 1995.
157. 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.181-9, 1994.
158. XIE, H., GIBBONS, R. J., HAY, D. I. Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.6, n.5, p.257-63, 1991.
159. YAMAGUCHI, H., KOBAYASHI, K., OSADA, R., SAKURABA, E. I., NOMURA, T., ARAI, T., NAKAMURA, J. Effects of irradiation of an erbium:YAG laser on root surfaces. *J. Periodontol.*, v.68, n.12, p.1151-5, 1997.
160. YILMAZ, S., KURU, B., KURU, L., NOYAN, U., ARGUN, D., KADIR, T. Effect of gallium arsenide diode laser on human

periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers*

Surg. Med., v.30, n.1, p.60-6, 2002.

161. ZAKARIASEN, K. L., DEDERICH, D. N., TULIP, J., DE
COSTE, S., JENSEN, S. E., PICKARD, M. A. Bactericidal
action of carbon dioxide laser radiation in experimental dental
root canals. *Can. J. Microbiol.*; v.32, n.12, p.942-6, 1986.

Anexos

Anexo 1 — Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



OF. 67/02
CEP
MRM/tms.

Araçatuba, 06 de maio de 2002.

Referência Processo FOA 2002/00703

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade analisou o projeto “Influência de aplicações do laser érbio:YAG sobre a viabilidade de microorganismos presentes na superfície radicular e efeitos de aplicação sub-inibitórias desse laser sobre a virulência microbiana *in vitro*” e expediu o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado Relatório até o dia 06.05.2003.



Marcos Rogério de Mendonça
Vice-Coordenador do CEP

Ilustríssimo Senhor
José Ricardo Kina
Câmpus de Araçatuba
UNESP

Aprovação da alteração de título (continuação)

Anexo 1 – (continuação) - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa pela alteração do título da Dissertação

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"Júlio de Mesquita Filho"
CÂMPUS DE ARAÇATUBA-FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

FLS.	78
PHOC	903/02
RUB.	gm

Araçatuba, 04 de outubro de 2002.

Referência processo FOA 2002/00703

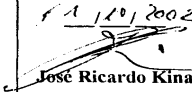
Prezado Senhor

Em reunião realizada em 02.10.02 pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP, o processo 2002/00703 de Vossa Senhoria tramitou para que a informação contida às folhas 77 fosse discutida pelos membros.

Decidiu-se pela **aprovação** da mudança de título e pela continuação da pesquisa.

Atenciosamente


Alberto Carlos Botazzo Delbem
Coordenador do CEP

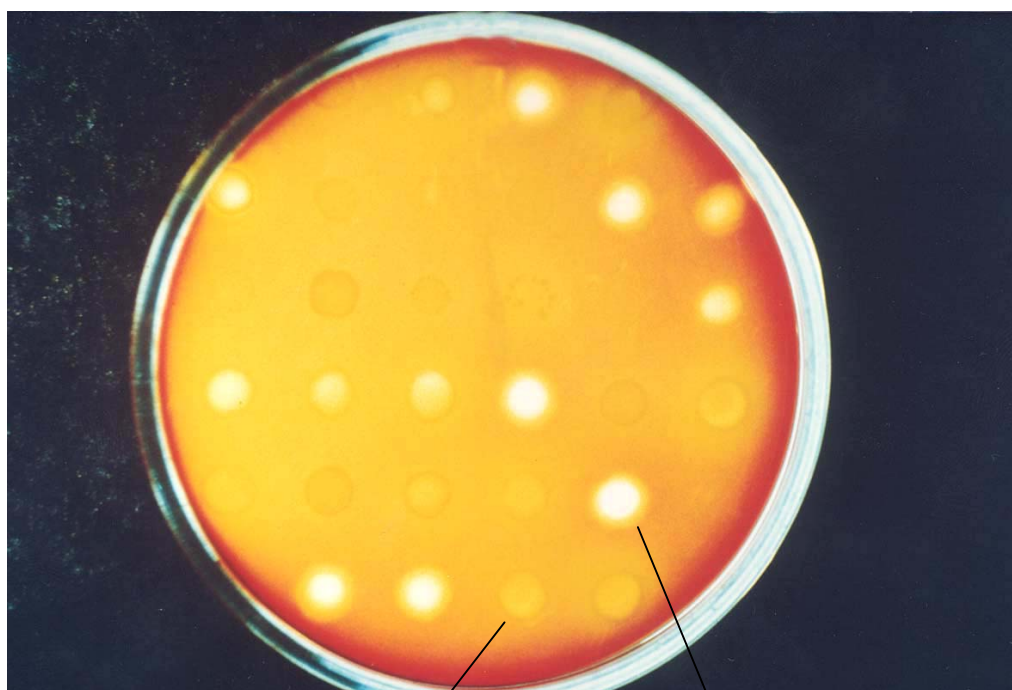
CIENTE
11/10/2002

José Ricardo Kina

Ilustríssimo Senhor
Prof. **José Ricardo Kina**
Câmpus de Araçatuba
UNESP

SEÇÃO DE COMUNICAÇÕES
Entrada às 15:30 hs.
Dia 11.10.02

Anexo 2 – FIGURA 9

FIGURA 9 - Aspectos característicos da atividade hemolítica de diferentes cepas de *Fusobacterium nucleatum* (β -hemólise e α -hemólise)



Fusobacterium nucleatum β -hemolítico

Fusobacterium nucleatum α -hemolítico

Anexo 3 – Análise Estatística - “Hipótese de Teste para Proporção de duas Amostras”

Para o teste, a fórmula foi a seguinte:

$$Z = \frac{p_x - p_y}{\sqrt{\frac{p_x(1 - p_x)}{n_1} + \frac{p_y(1 - p_y)}{n_2}}}$$

onde:

p_x e p_y foram os valores de CFU de cada tempo em relação ao valor de CFU do controle (x e y são os números referentes ao tempo de irradiação em segundos conforme as tabelas)

$n_1 = n_2 =$ valor de CFU da amostra controle

nível de significância, $\alpha = 0,05$

Assim, para que o teste entre os tempos fosse considerado não-significante, ou seja, iguais, deveria-se encontrar um valor crítico Z de $\pm 1,9600$, onde o valor de p deveria ser $> 0,05$.

Tabela 1-

$n_1 = n_2 = 1.569.600$

Tabela 2-

$n_1 = n_2 = 4.500.000$

Análise da Tabela 1

Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 10 segundos	
P5	633.600
P10	374400
Z	99,0837
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 15 segundos	
P5	633.600
P15	244.800
Z	154,5819
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 20 segundos	
P5	633.600
P20	100.800
Z	224,6301
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 30 segundos	
P5	633.600
P30	104.400
Z	222,7342
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

 Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 60 segundos

P5	633.600
P60	0.0
Z	281,7177
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com controle

P5	633.600
controle	1.569.600
Z	- 365,1662
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com 15 segundos

P10	374.400
P15	244.800
Z	58,1298
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com 20 segundos

P10	374.400
P20	100.800
Z	136,2449
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com 30 segundos

P10	374.400
P30	104.400
Z	134,0364
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com 60 segundos

P10	374.400
P60	0.0
Z	206,1401
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com controle

P10	374.400
controle	1.569.600
Z	- 439,2988
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

Teste de proporção entre tempos de 15 segundos com 20 segundos

P15	244.800
P20	100.800
Z	82,1113
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

Teste de proporção entre tempos de 15 segundos com 30 segundos

P15	244.800
P30	104.400
Z	79,6962
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 15 segundos com 60 segundos

P15	244.800
P60	0.0
Z	162,8946
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 15 segundos com controle

P15	244.800
controle	1.569.600
Z	- 478,7398
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 20 segundos com 30 segundos

P20	100.800
P30	104.400
Z	- 2,5995
p	0,0093

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 20 segundos com 60 segundos

P20	100.800
P60	0.0
Z	101,9759
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 20 segundos com controle

P20	100.800
controle	1.569.600
Z	- 525,3696
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

Teste de proporção entre tempos de 30 segundos com 60 segundos	
P30	104400
P60	0.0
Z	103,8452
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

Teste de proporção entre tempos de 30 segundos com controle	
P30	104400
controle	- 524,1607
Z	103,8452
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

Teste de proporção entre tempos de 60 segundos com controle	
P60	0.0
controle	1.569.600
Z	- 560,2499
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

Análise da Tabela 2

Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 10 segundos	
P5	450.000
P10	231.500
Z	87,0597
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

 Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 15 segundos

P5	450.000
P15	414.000
Z	12,8814
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 20 segundos

P5	450.000
P20	225.000
Z	90,0450
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 30 segundos

P5	450.000
P30	424
Z	214,6369
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com 60 segundos

P5	450.000
P60	0.0
Z	217,6072
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 5 segundos com controle

P5	450.000
controle	4.500.000
Z	- 858,1048
p	0,0000

 Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com 15 segundos

P10	231.500
P15	414.000
Z	- 74,5548
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com 20 segundos

P10	231.500
P20	225.000
Z	3,1225
p	0,0018

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com 30 segundos

P10	231.500
P30	424
Z	149,9927
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com 60 segundos

P10	231.500
P60	0.0
Z	154,0972
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 10 segundos com controle

P10	231.500
controle	4.500.000
Z	- 901,0609
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 15 segundos com 20 segundos

P15	414.000
P20	225.000
Z	77,5714
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 15 segundos com 30 segundos

P15	414.000
P30	424
Z	205,1870
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 15 segundos com 60 segundos

P15	414.000
P60	0.0
Z	208,2805
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 15 segundos com controle

P15	414.000
controle	4.500.000
Z	- 865,0617
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 20 segundos com 30 segundos

P20	225.000
P30	424
Z	147,6991
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 20 segundos com 60 segundos

P20	225.000
P60	0.0
Z	151,8607
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 20 segundos com controle

P20	225.000
controle	4.500.000
Z	- 902,3668
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 30 segundos com 60 segundos

P30	424
P60	0.0
Z	20,2343
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

 Teste de proporção entre tempos de 30 segundos com controle

P30	424
controle	4.500.000
Z	- 947,7793
p	0,0000

Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)

Teste de proporção entre tempos de 60 segundos com controle	
P60	0.0
controle	4.500.000
Z	- 948,6622
p	0,0000
Significante (diferentes, $\alpha < 0,05$)	

Resumo

LOPES, A. M. *Influência de aplicações do “laser”érbio:YAG sobre a viabilidade microbiana, sua resistência a drogas e atividade hemolítica*. Araçatuba, 2003. 176f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista

RESUMO: A atividade antimicrobiana do laser Er:YAG foi avaliada sobre biofilme bacteriano constituído por *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e 3 cepas de *Fusobacterium nucleatum* e sobre biofilme de microrganismos salivares. Os biofilmes foram submetidos à ação do laser a 1,2 W e 10 Hz por 5, 10, 15, 20, 30 e 60 s e fez-se a avaliação da microbiota residual em ágar sangue, em anaerobiose. O biofilme salivar se mostrou mais sensível nos primeiros tempos de irradiação. A redução microbiana em relação ao controle foi estatisticamente significativa entre todos os tempos testados. Avaliou-se também a ação do laser Er:YAG sobre 7 cepas de *Fusobacterium nucleatum* inoculadas sobre a superfície de corpos-de-prova (5mmX4mm) de dentes extraídos. Fez-se a aplicação do laser nos mesmos parâmetros físicos mencionados anteriormente, durante 15 s, levando à eliminação total do conteúdo séptico. O estudo avaliou também a irradiação do laser de Er:YAG durante tempos subinibitórios sobre a atividade hemolítica e susceptibilidade de 9 cepas de *Fusobacterium nucleatum* a amoxicilina, eritromicina, metronidazol e tetraciclina. Após a irradiação do laser, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) para as drogas através do método de diluição em ágar. A ação do laser sobre a atividade hemolítica foi determinada em

sangue humano. Verificou-se que o laser Er:YAG não afetou a atividade hemolítica de *Fusobacterium nucleatum*, que se mostrou α -hemolítica, tampouco a susceptibilidade a drogas dos isolados testados.

Palavras-chave: lasers em alta intensidade, bactérias, desinfecção.

Abstract

LOPES, A. M. Influence of irradiation of erbium:YAG laser on microbial viability, susceptibility to antimicrobial drugs and hemolysis. Araçatuba, 2003. 176f. Dissertação (Mestrado em Periodontia). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista

ABSTRACT: Antimicrobial activity of Er:YAG laser was evaluated on a bacterial biofilm constituted by *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and 3 strains of *Fusobacterium nucleatum* and on biofilm produced by salivary microorganisms. Biofilms were irradiated by Er:YAG laser, 1,2 W and 10 Hz, for 5, 10, 15, 20, 30, and 60 s and the evaluation of residual contamination was performed on blood agar, under anaerobiosis. It was verified that salivary biofilm showed to be more susceptibility to the Er:YAG laser in shorter periods of laser irradiation. Bacterial reduction was significative in all tested periods of irradiation. The activity of Er:YAG laser was also evaluated on 7 strains of *Fusobacterium nucleatum* inoculated on samples of human dentin (5mm X 4mm), obtained from extracted teeth. The laser was used following the same physical parameters, as previously described, for 15 s, leading to complete elimination of their septic content. The study also evaluated the effects of subinibitory irradiation of Er:YAG laser on bacterial susceptibility of 9 strains of *Fusobacterium nucleatum* to antimicrobial drugs (amoxicillin, erythromycin, metronidazole, tetracycline) and hemolysis. Thus, after laser irradiation, the minimal inhibitory concentration of antimicrobial drugs was determined by using an agar dilution method. The influence of laser on

hemolysis was carried out on human blood. It was verified that Er:YAG laser did not produce any measurable effect on hemolytic activity and the microbial susceptibility to tested antimicrobial drugs.

Keywords: high power lasers, bacteria, disinfection