

Influência de aplicações do laser érbio:yag sobre a viabilidade microbiana

Influence of irradiation of erbium:yag laser on microbial viability

Angélica Marquezim LOPES

Mestranda – Programa de Pós – Graduação em Odontologia – Área de Periodontia – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Elerson Gaetti JARDIM JÚNIOR

Livre-Docente em Microbiologia e Imunologia – Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

José Ricardo KINA

Livre-Docente em Periodontia – Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar, in vitro, a atividade antibacteriana do laser érbio:YAG sobre biofilme formado por cepas *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e cepas de *Fusobacterium nucleatum* isoladas de pacientes com doença periodontal, bem como sobre cepas de *Fusobacterium nucleatum* em suspensão, inoculadas sobre corpos-de-prova de dentina. Após o cultivo das bactérias em caldo infuso de cérebro e coração, alíquotas de 2.10^7 cels/ml de cada tubo foram transferidas para cavidades de microplacas, completando seu volume com caldo de tripticaseína de soja acrescido de 1% de glicose e 1% de sacarose, o qual foi trocado diariamente. O biofilme foi submetido à ação do laser a 120 mJ, 10 Hz, por 5, 10, 15, 20, 30 e 60s, mantendo distância de 2,5cm da microplaca. Fez-se também a inoculação de 10^5 cels/ml de *F. nucleatum* sobre corpos-de-prova (4mmX 5mm), sendo submetidas à irradiação do laser, nos mesmos parâmetros físicos, por 15s. A avaliação da contaminação residual foi realizada em ágar sangue. Observou-se redução de 93,58% dos microrganismos após 20s de irradiação e a eliminação total após 60 s. Quanto à ação do laser sobre *F. nucleatum* em suspensão, verificou-se eliminação total do conteúdo séptico. Conclui-se que a atividade antibacteriana do laser de érbio:YAG sobre os microrganismos em forma de biofilme pode ser eficaz, em função do tempo de irradiação e dos parâmetros físicos utilizados e que microrganismos em estado planctônico são mais sensíveis ao laser do que em forma de biofilme.

UNITERMOS

Lasers, alta intensidade; lasers, érbio: yag; teste de sensibilidade microbiana; bactérias, desinfecção

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é resultado da inter-relação entre uma microbiota potencialmente patogênica e um hospedeiro susceptível, tendo como microrganismos principais os bastonetes Gram-negativos anaeróbios obrigatórios e microaerófilos, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Fusobacterium nucleatum*¹⁸, o qual representa uma ponte entre os colonizadores iniciais e finais da placa bacteriana¹⁵.

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.

No entanto, considera-se que a maior parte das espécies microbianas está presente na estrutura do biofilme, que são verdadeiras membranas vivas²⁵. Desta forma, os efeitos dos antimicrobianos tópicos e sistêmicos tendem a serem minimizados pela própria natureza do biofilme, estimulando a avaliação de novas modalidades terapêuticas, como os aparelhos de laser de vários comprimentos de onda^{6,28}.

Estudos referentes à atuação de diferentes lasers em periodontia, como de CO₂, neodímio:YAG, hólmio:YAG, érbio:YAG, dentre outros, têm demonstrado resultados significativos no que diz respeito à remoção de cálculo, curetagem de tecido mole e descontaminação de bolsas periodontais^{3,7,11}.

No entanto, a despeito da comprovada ação antimicrobiana dos diferentes tipos de lasers sobre *S. aureus*¹⁶, *Escherichia coli*¹⁶ e *Streptococcus mutans*¹⁴, pouco se sabe sobre a ação do laser de érbio: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 microrganismo.

Desta forma, 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: avaliar a atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG sobre biofilme microbiano constituído 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 corpos-de-prova de superfícies radiculares contaminadas com cepas de *Fusobacterium nucleatum* em estado planctônico.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizou-se o laser de érbio:YAG (Kavo Key Laser) (Figura 1), com comprimento de onda de 2.940nm. A forma de entrega do feixe da luz laser foi realizada com o uso da caneta. Os parâmetros físicos utilizados foram os mesmos nos dois testes realizados e seguiram as recomendações do fabricante, para irradiação em superfície radicular, sen-

do: 1,2W de potência, 10Hz de frequência, com uma distância constante do alvo de 2,5 cm, obtendo 0,28cm² de área irradiada. Os valores de densidades de energia variaram de acordo com os diferentes tempos de irradiação que foram testados.

Os espécimes clínicos utilizados foram coletados de dez pacientes com doença periodontal crônica, utilizando-se metodologia empregada por Gaetti-Jardim Júnior⁸ (1996). A coleta dos espécimes clínicos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP.

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

Para o isolamento e identificação bacteriana, utilizou-se metodologia descrita por Slots²³ (1982). Os isolados foram mantidos por vários repiques, os quais eram feitos semanalmente.



FIGURA 1 – Laser de érbio:YAG (Kavo Key Laser).

Assim, 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 5ml 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. A metodologia desenvolvida para formação do biofilme bacteriano foi desenvolvida sob orientação do Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior (não publicada), tendo como referências estudos^{6,25} que sofreram modificações para a presente pesquisa.

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, 20µl de cada tubo contendo as cepas de fusobactérias (10^9 células/ml), bem como 20µl (2.10^7 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, completando o volume da cavidade da microplaca com 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 1% de sacarose foram realizadas com auxílio de micropipeta, de forma que eram colocados 150µl desse meio de cultura.

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 2), 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 21,43J/cm²; 42,86J/cm²; 64,28J/cm²; 85,71J/cm²; 128,57J/cm² e 257,14J/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.

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 três 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 re-

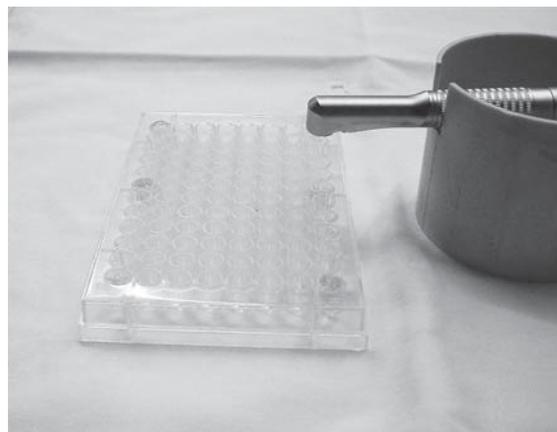


FIGURA 2 – Aplicação do laser de érbio:YAG sobre a microplaca.

dução do conteúdo microbiano nos grupos testes em relação ao controle.

Avaliou-se também a ação do laser érbio:YAG sobre cepas de *Fusobacterium nucleatum* em estado planctônico. Para tanto, utilizaram-se corpos-de-prova (5mmX 4mm) constituídos da superfície de trinta dentes extraídos.

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 sete cepas de *Fusobacterium nucleatum*. O seu preparo foi realizado de forma semelhante ao previamente descrito para as cepas de *Fusobacterium nucleatum* na formação do biofilme.

Posteriormente, esses fragmentos foram inoculados individualmente, com 1µl (10⁵ células bacterianas) de cada cepa de *Fusobacterium nucleatum* (Figura 3 e Figura 4). A seguir, os corpos-de-prova foram submetidos à aplicação do laser de érbio:YAG por 15 segundos, mantendo o feixe do laser a 2,5cm de distância do espécime, e com

64,28J/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 3ml 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 três 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.

Os dados dos testes foram submetidos ao teste de proporção entre duas variáveis para comparação de proporção entre os tempos utilizados em relação ao controle. O nível de significância adotado foi de $\alpha < 0,05$.

RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra a atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG sobre o biofilme bacteriano. 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

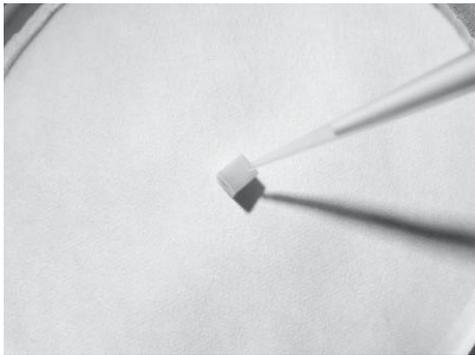


FIGURA 3 - Inoculação do corpo-de-prova com auxílio de micropipeta.



FIGURA 4 - corpo-de-prova inoculado.

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 ($p < 0,001$).

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.

DISCUSSÃO

A utilização de instrumentos manuais para o tratamento periodontal básico, associada ou não a regimes terapêuticos tem sido o procedimento mais utilizado no tratamento das diversas formas da do-

ença periodontal²⁴. Entretanto, a utilização dos lasers de alta potência também vem sendo amplamente estudado em periodontia podendo ser utilizado como um coadjuvante ou até mesmo um substituto na terapia periodontal convencional^{1,4}, uma vez que esse tipo de laser possui ação de debridamento e remoção do cálculo dental³, controle da microbiota das bolsas periodontais^{4,26} e condicionamento radicular¹³.

A partir desse ponto de vista, foi utilizado na presente pesquisa, um laser de alta potência, o de érbio:YAG. Assim, tendo em vista que a doença periodontal inflamatória é resultado da presença do biofilme bacteriano nas superfícies radiculares²⁷, o presente estudo avaliou a atividade antibacteriana desse laser sobre biofilme microbiano e suspensões bacterianas inoculadas sobre corpos-de-prova de raízes dentais.

Quanto à atuação do laser de érbio:YAG sobre o biofilme microbiano estudado, verificou-se que o biofilme mostrou alguma resistência, principalmente nos tempos iniciais de irradiação, como observado pela Tabela 1, evidenciando-se um efeito de somação temporal⁵. Para tanto, tendo em vista que, dentro dos aspectos microbiológicos, uma redução de 90% é considerada significativa¹⁰, 20 segundos de irradiação com o laser de érbio:YAG sobre o biofilme bacteriano testado pode ser considerado indicativo de uma considerável atividade antimicrobiana.

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

A maior resistência demonstrada nos tempos iniciais de irradiação pode estar associado a *S. aureus* e *E. coli*, que têm sido colocados como resistentes ao laser de alta potência^{6,25} e se mostram resistentes a compostos químicos e outros processos físicos²¹, sendo que sua eliminação requer uma exposição de uma hora a 55°C/60°C, para perderem a viabilidade celular²¹.

A resistência térmica desses microrganismos ao laser tem sido relatada que o simples aquecimento térmico da suspensão contendo *Escherichia coli* não é suficiente para a perda da viabilidade desse microrganismo²⁹, sendo que outros autores¹⁹ 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^{5,6}. 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 mesmo¹², 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 extracelular²⁷.

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:YAG². No entanto, a despeito de alguns autores responsabilizarem esse mecanismo de ação para a atividade antimicrobiana do laser de Er:YAG², 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 possí-

vel 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*⁷ 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, 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, sendo alterações térmicas, como aumento de temperatura no tecido pulpar e irregularidades na superfície radicular^{3,30}.

Assim, tendo em vista que estudos *in vitro*^{7,9,11} demonstram densidades de energia baixas (110J/cm², 120J/cm²) sem trazer efeitos deletérios sobre a superfície radicular não interferindo com a nova inserção, verifica-se que 20 segundos de irradiação (87,71J/cm²) utilizado no estudo é satisfatório, pois pode promover uma redução bacteriana sem interferir com características superficiais da raiz dental.

A comparação da presente pesquisa com os estudos *in vivo*, torna-se, no entanto, 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 luz¹⁷ acarretando em uma atuação direta sobre o biofilme microbiano testado. Por outro lado, nos trabalhos clínicos consultados^{4,22,26}, a maioria faz uso de sistemas de fibra óptica, cujo feixe de luz é divergente, proporcionando, por conseguinte, uma menor energia de irradiação¹⁷, além de fatores locais que podem limitar a atuação³, 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 radicular²². Além desse aspecto, a presença de microrganismos resistentes presentes no biofilme das superfícies radiculares²⁷, o qual *in vivo*, apresentam um tempo

de evolução muito superior ao utilizado no presente estudo²⁷ e se encontram presentes no interior de canalículos dentinários, também pode impedir, muitas vezes a sua completa eliminação pela irradiação do laser¹⁷.

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 periodontais²², 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.

A atuação limitada do laser sobre o biofilme microbiano também está associada à estabilidade ambiental em que se encontram as bactérias, uma vez que no biofilme microbiano essa característica é presente, e em suspensões microbianas essa estabilidade é pouco freqüente²⁷, pois como observado, o tempo de irradiação para a eliminação total dos microrganismos presentes no biofilme testado é muito maior do que o tempo utilizado para a completa eliminação total de células de *Fusobacterium nucleatum*, em suspensão, que foi de 15 segundos. Além desse aspecto, as células bacterianas, em estado planctônico, ficam diretamente expostas à radiação do laser, facilitando a sua atuação¹².

Para tanto, a rápida eliminação das células de *F. nucleatum* sobre os corpos-de-prova demonstra a grande sensibilidade das cepas desse anaeróbio, particularmente quando os microrganismos não estavam protegidos por uma comunidade microbiana ou por abundante matriz extracelular, como observado com o biofilme, onde há interações bacterianas²⁰ e canais semelhantes ao sistema circulatório que banham, com água e nutrientes, as microcolônias microbianas constituintes desses biofilmes, nutrindo e protegendo as bactérias presentes²⁷.

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 condições¹⁴, 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.

No entanto, apesar de *F. nucleatum* estar associado às várias modalidades de doença periodontal¹⁸, existem outros membros da microbiota subgingival que possuem capacidade de invasão dos túbulos dentinários, o que pode tornar 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 dentinários¹⁷.

Também, o estado fisiológico da bactéria pode interferir na atuação do laser²⁰, 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^{16,20,25,29}, 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 biofilme²⁷.

Tendo em vista a atividade antimicrobiana do laser de érbio:YAG demonstrada no presente estudo, 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.

CONCLUSÃO

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

- a atividade antibacteriana do laser de érbio:YAG, *in vitro*, sobre os microrganismos na forma de biofilme pode ser eficaz, em função do tempo de irradiação, bem como dos parâmetros físicos utilizados;
- microrganismos em estado planctônico sobre os corpos-de-prova, são, consideravelmente, mais sensíveis ao laser do que quando em forma de biofilme.

ABSTRACT

The objective of this work was evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of erbium:YAG laser on a bacterial biofilm constituted by *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and strains of *Fusobacterium nucleatum* isolated of patients with periodontal disease, further on strains of *Fusobacterium nucleatum* in suspension inoculated on samples of human dentin. After culture of bacterial strains in brain heart infuse broth, aliquots of 2.10^7 cells/ml of each tube were transferred to microplates and its volume was followed-through with soy tripticasein broth with glucose 1% and sucrose 1%. These broth was replaced daily. The biofilm were irradiated by erbium:YAG laser, 1,2mJ and 10 Hz, for 5, 10, 15, 20, 30 and 60s, with 2,5 cm away from microplate. Aliquots of 10^5 cells/ml of *F. nucleatum* was inoculated on samples of dentin human (4mm X 5mm) and the laser was used following the same physical parameters, for 15 s. The evaluation of residual contamination was performed on blood agar. It was verified a bacterial reduction of 93,58% after 20s of irradiation and a crossing-out of septic contents after 60s. With regard to irradiation of laser on *F. nucleatum* in suspension, was leaded to complete elimination of their septic content. The conclude of this study was the antimicrobial activity of erbium:YAG laser on a bacterial biofilm can be efficacious, if to depend of an irradiation time and physicals parameters of the laser; and the microorganisms in planctonic state were more sensitive under irradiation of laser as in biofilm form.

UNITERMS

Lasers, high power; bacteria; laser, yag; microbial sensitivity testes, high power lasers, bacteria, disinfection

REFERÊNCIAS

- Anastasakis S. The use of a pulsed Nd:YAG laser in periodontal therapy - a comparative clinical study [abstract n. 122]. J Clin Periodontol 2000; 27: 48
- Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium:YAG laser on periodontopathic bacteria. Lasers Surg Med 1996; 19 (2): 190-200.
- Aoki A, Ando Y, Watanabe H, Ishikawa I. In vitro studies on laser scaling of subgingival calculus with an erbium:YAG laser. J Periodontol 1994; 65 (12): 1097-106.
- Cobb CM, Mccawley TK, Killoy WJ. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root surfaces and subgingival microflora in vivo. J Periodontol 1992; 63 (8): 701-7.
- Folwaczny M, Liesenhoff T, Lehn N, Horch HH. Bactericidal action of 308 nm excimer-laser radiation: an in vitro investigation. J Endod 1998; 24 (12): 781-5.
- Folwaczny M, Mehl A, Aggstaller H, Hickel R. Antimicrobial effects of 2.94 mm Er:YAG laser radiation on root surfaces: an in vitro study. J Clin Periodontol 2002; 29 (1): 73-8.
- 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 2000; 71 (2): 147-55.
- Gaetti-Jardim Júnior E, Zelanten F, Ávila-Campos MJ. Oral species of *Fusobacterium* from human and environmental samples. J Dent 1996; 24 (5): 345-8.
- Gaspirc B, Skaleric U. Morphology, chemical structure and diffusion processes of root surface after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation. J Clin Periodontol 2001; 28 (6): 508-16.
- Gutknecht N, Nuebler-Moritz M, Burghardt SF, Lampert F. The efficiency of root canal disinfection using a holmium: yttrium-aluminum-garnet laser in vitro. J Clin Laser Med Surg 1997; 15 (2): 75-8.
- Israel M, Cobb CM, Rossmann JA, 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 1997; 24 (9): 595-602.
- Jelínková H, Dostálová T, Dusková J, Krátk_ M, Miyagi M, Shoji S, et al. Er:YAG and alexandrite laser radiation propagation in root canal and its effect on bacteria. J Clin Laser Med Surg 1999; 17 (6): 267-72.
- 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 1989; 9 (4): 345-51.
- Klinke T, Klimm W, Gutknecht N. Antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation within root canal dentin. J Clin Laser Med Surg 1997; 15 (1): 29-31.
- Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol 1993; 175 (1): 3247-52.
- Mehl A, Folwaczny M, Haffner C, Hickel R. Bactericidal effects of 2.94mm Er:YAG laser radiation in dental roots canals. J Endod 1999; 25 (7): 490-3.
- Mello JB, Mello GPS. Laser em Odontologia. São Paulo: Santos; 2001.
- Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5: 66-77.
- Mullarky MB, Norris CW, Goldberg ID. 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 1985; 95: 186-7.
- 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 2002; 48 (4): 326-32.
- Parker MT. *Staphylococcus aureus*. In: Wilson GS, Miles AA, Parker MT. Principles of Bacteriology, virology and immunity. Baltimore: Williams & Williams; 1983. p.219-21.
- Radvar M, MC Farlane T W, Mackenzie D, Whitters CJ, Payne AP., Kinane DF. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. Br Dent J 1996; 180 (2): 57-62.
- Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Microbiol 1982; 15: 606-9.

24. Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2002; 28: 106 – 76.
25. Schultz RJ, Harvey GP., Fernandez-Beros ME, Krishnamurthy S, Rodriguez JE, Cabello F. Bactericidal effects of the neodymium:YAG laser: in vitro study. *Laser Surg Med* 1986; 6 (5): 445-8.
26. 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* 2001; 72 (3): 361-7.
27. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; 28: 12 – 55.
28. Usacheva MN, Teichert MC, Biel M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001; 29 (2): 165-73.
29. Ward GD, Watson IA, Stewart-Tull DES, Wardlaw AC, Wang RK, Nutley MA, et al. Bactericidal action of high-power Nd:YAG light on *Escherichia coli* in saline suspension. *J Appl Microbiol* 2000; 89 (3): 517-25.
30. Wilder-Smith P, Arrastia AM, Schell MJ, Liaw LH, Grill G, Berns MW. Effect of Nd:YAG laser irradiation and root planing on the root surface: structural and thermal effects. *J Periodontol* 1995; 66 (12): 1032-9.

Recebido em: 29/10/03

Aprovado em: 12/02/04

Angélica Marquezim Lopes
Rua Otávio Pinto César, 401– apto. 22B
Cidade Nova
CEP:15085-360 – São José do Rio Preto – SP
marquezimlopes@bol.com.br