Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2014

O efeito da terapia laser de baixa intensidade nos espectros de luz visível e infravermelha em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* isoladas *in vitro*

PPGRDF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FUNCIONAL
FMRP-USP

Natanael Teixeira Alves de
Sousa

Dissertação

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOMECÂNICA, MEDICINA E REABILITAÇÃO DO
APARELHO LOCOMOTOR.**

NATANAEL TEIXEIRA ALVES DE SOUSA

**O EFEITO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE NOS ESPECTROS DE
LUZ VISÍVEL E INFRAVERMELHA EM CULTURAS DE *Staphylococcus aureus*,
Pseudomonas aeruginosa e *Escherichia coli* ISOLADAS *IN VITRO*.**

RIBEIRÃO PRETO

2014

NATANAEL TEIXEIRA ALVES DE SOUSA

VERSÃO CORRIGIDA

**O EFEITO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE NOS ESPECTROS DE
LUZ VISÍVEL E INFRAVERMELHA EM CULTURAS DE *Staphylococcus aureus*,
Pseudomonas aeruginosa e *Escherichia coli* ISOLADAS *IN VITRO*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo R. J. Guirro

RIBEIRÃO PRETO

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Sousa, Natanael Teixeira Alves de

O efeito da terapia laser de baixa intensidade nos espectros de luz visível e infravermelha em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* isoladas *in vitro*, 2014.

58 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada Programa de Pós Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Orientador: Guirro, Rinaldo Roberto de Jesus

1. Terapia laser de baixa intensidade
2. Úlcera cutânea
3. *Staphylococcus aureus*
4. *Pseudomonas aeruginosa*
5. *Escherichia coli*

NATANAEL TEIXEIRA ALVES DE SOUSA

**O EFEITO DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE NOS ESPECTROS DE
LUZ VISÍVEL E INFRAVERMELHA EM CULTURAS DE *Staphylococcus aureus*,
Pseudomonas aeruginosa e *Escherichia coli* ISOLADAS IN VITRO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Reabilitação e Desempenho
Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto – USP como requisito para obtenção do título
de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo R. J. Guirro

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, **Altino Alves**,
por me ensinar sobre as reais dificuldades da
vida e pelo incentivo para superar grandes
obstáculos com muito amor e dedicação.*

*A minha mãe, **Margarida**,
pelo apoio fundamental e amor
incondicional, presente em todos os
momentos de minha vida*

*A minha amada noiva, **Cristiane**,
pelo carinho, dedicação e amor
incondicional durante todos os momentos
dessa longa caminhada.*

*A minha irmã, cunhado e sobrinha,
Natanielli, Giovane e Clara,
pelo apoio fundamental em todos os
momentos de alegrias e tristezas.*

*Ao Prof. **Rinaldo Guirro**,
por depositar sua confiança em mim e
acreditar no meu potencial para trilhar o
caminho acadêmico e científico.*

AGRADECIMENTOS

Considero esse espaço demasiadamente insuficiente para expressar minha gratidão a todas as pessoas, que contribuíram para a realização deste trabalho, pois sem elas, tenho certeza de que o mesmo não estaria finalizado. Por isso, creio que seja pretensão de minha parte afirmar esta é “minha” dissertação, quando na realidade o correto deveria sê-la de “todos”.

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro, por ter incentivado e possibilitado a realização deste projeto, com dedicação, paciência e serenidade. Agradeço também os seus ensinamentos, o conhecimento adquirido ao longo destes anos e principalmente por sua postura profissional, ética e moral, ensinando-me com suas atitudes, como me portar em todas as situações da minha vida profissional e pessoal.

Agradeço também à minha noiva Cristiane, por todo amor, paciência e dedicação em todos os momentos da realização deste projeto, demonstrando sua total compreensão e apoio nos vários momentos em que fui ausente física e mentalmente.

Agradeço à minha família: pais, irmã, tios, primos que de forma direta e indireta contribuíram e apoiaram nesta jornada, compreendendo a minha ausência em muitos momentos fundamentais e importantes de suas vidas

Sou grato aos meus amigos de Viçosa, Muriaé, e Ribeirão Preto que sempre me apoiaram durante toda essa caminhada. Em especial aos meus amigos Bruno, Daniel, Francisco, Gustavo, Kleiton e Augusto que me acolheram em Ribeirão Preto com muito carinho e me deram força nos momentos mais difíceis dessa etapa de minha vida.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Recursos Fisioterapêuticos (LARF): Hugo Evangelista Brandino, Rosana Caetano Gomes, Christiane Macedo, Almir Dibai Filho e Ariane Pletsch, pelos ensinamentos, companheirismo e momentos de descontração e amizade. Em especial gostaria de agradecer ao Hugo por toda sua dedicação durante todos os momentos do projeto e a Christiane pelos vários momentos de “resenha”, orientações e amizade.

Agradeço aos meus alunos de Iniciação Científica: Marcos Ferracioli Santos, João Guilherme Calió, Sabrina Freitas de Souza, Mariane Queluz e Ana Julia Moreto Coan, pela dedicação e colaboração para a realização dos nossos projetos. Em especial gostaria de agradecer ao aluno Marcos (Pira) pela dedicação em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho, a qual não seria possível ser realizado sem a sua contribuição.

Agradeço ao professor Dr. Roberto Martinez, pelo incentivo e parceria na realização desta pesquisa e aos integrantes do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP/USP pela colaboração e o espaço concedido. Em especial gostaria de agradecer imensamente a Lúcia Vitali e João Paulo Lettieri, por toda sua ajuda e dedicação, sempre em prontidão para colaborar e tornar nossa vida muito mais fácil nos momentos mais complicados do estudo.

*“Conhecer e pensar não é chegar a uma verdade
absolutamente certa, mas dialogar com a incerteza”*

Edgar Morin

RESUMO

SOUSA, NTA. **O efeito da terapia laser de baixa intensidade nos espectros de luz visível e infravermelha em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* isoladas *in vitro*.** 2014 58f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A terapia laser de baixa intensidade (TLBI) vem sendo utilizada no tratamento de feridas devido aos seus efeitos cicatrizantes. No entanto, espécies bacterianas podem ser detectadas em úlceras cutâneas crônicas, não estando claro quais os melhores parâmetros a serem utilizados para se obter maior eficácia da inibição das bactérias que podem vir a colonizar essas feridas, já que são escassos os estudos que associam diferentes linhagens de bactérias, com diferentes comprimentos de onda e fluências da TLBI. O objetivo do estudo foi analisar a influência da TLBI no crescimento bacteriano *in vitro*. Para realização do estudo foram utilizadas linhagens da *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *E. coli* (ATCC 25922), as quais foram repicadas e incubadas por um período de 24 horas, à temperatura de 37° C. Após o crescimento bacteriano, as células foram suspensas em solução fisiológica com turvação de 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹). Em seguida foram realizadas cinco diluições seriadas até alcançar a concentração de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL⁻¹. Uma alíquota de 300 µL desta suspensão foi transferida para poços da placa de microtitulação e então expostas a irradiação. A seguir uma fração de 100 µL foi espalhada sobre a superfície do meio de cultura sólido Mueller-Hinton em placas de Petri (90 x 15 mm), incubada a 37° C e após 24, 48 e 72 horas foram realizadas às contagens de UFC (unidades formadoras de colônias). A irradiação laser (laserpulse - Ibramed® – Amparo, SP – Brasil) foi realizada nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 0 (controle), 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm², aplicado de forma direta e perpendicular a placa, a uma distância de 2 mm, sobre uma área de 1 cm². Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, sendo os dados referentes a contagem das UFC submetidos ao teste de Kruskal Wallis e post hoc de Dunn com nível de significância de 5%. A irradiação laser inibiu o crescimento da *S. aureus* em todos os comprimentos de ondas testados, nas fluências superiores a 12 J/cm², com maiores taxas de inibição em 24 J/cm² (79,6%). Ao analisar o comportamento da taxa de inibição bacteriana, pode-se observar uma tendência similar entre todos os comprimentos de onda. No entanto, para a *P. aeruginosa* a TLBI foi capaz de inibir o crescimento em todos os comprimentos de onda, somente na fluência de 24 J/cm², não sendo possível identificar um padrão de inibição. A *E. coli* apresentou um padrão de inibição nos comprimentos de onda de 450 e 830 nm. Para os comprimentos de onda de 660 e 904 nm pode-se identificar inibição somente em 12 e 18 J/cm², respectivamente. Assim, pode-se afirmar que a TLBI foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em todos os comprimentos de onda, não apresentando o mesmo padrão de inibição entre as espécies bacterianas, comprimento de onda e fluências testadas, se mantendo por até 72 horas após a irradiação.

Palavras-Chave: Terapia laser de baixa intensidade, Úlcera cutânea, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

ABSTRACT

SOUSA, NTA. **The effect of low level laser therapy spectra in the visible and infrared light in cultures of de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolated *in vitro*.** 2014 58f. Dissertation (Master) – School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014

Low level laser therapy (LLLT) has been used in treatment of wounds due your healing effects. Some bacteria's species can be detected in almost all chronic ulcers, being not clear which are the best parameters to more effective inhibition of bacteria that may colonize these wounds. There are just a few studies that relate different bacteria types with different wavelength and different fluence of LLLT. Thus, the study objective is analyze the LLLT effect of bacterial growth *in vitro*. In this study were used *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) and *E. coli* (ATCC 25922), which were transplanted and incubated for 24 hours at a temperature of 37° C. After bacterial growth, the cells were suspended in saline with a turbidity of 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL⁻¹). Next, five serial dilutions were performed to achieve a concentration of 1.5×10^3 CFU/mL⁻¹. An aliquot 300 µL of this suspension was transferred to wells of a microtiter plate and then exposed to irradiation. Then 100 µL of a fraction was spread on the surface of solid culture medium Mueller-Hinton in Petri dishes (90 x 15 mm) plates, incubated at 37° C and after 24, 48 and 72 hours to CFU counts were made (colony forming units). The laser irradiation (Laserpulse - Ibramed® - Amparo, SP - Brazil) was performed at wavelengths of 450, 660, 830 and 904 nm, the fluence of 0 (control), 3, 6, 12, 18 and 24 J/cm² and applied directly perpendicular to the plate at a distance of 2 mm over an area of 1 cm². All data were subjected to test normality the Shapiro-Wilk test, and the data for CFU counts submitted to test the Kruskal Wallis test and post hoc Dunn's test with a significance level of 5%. The laser irradiation inhibited the growth of *S. aureus* in all wavelengths tested in the higher fluences to 12 J/cm², with higher rates of 24 J/cm² inhibition (79.6%). In analyzing the behavior of the rate of bacterial inhibition, one can observe a similar trend among all wavelengths. However, for the LLLT *P. aeruginosa* was able to inhibit the growth of all wavelengths, the only fluence 24 J/cm², it is not possible to identify a standard of inhibition. *E. coli* showed a standard of inhibition at a wavelength of 450 and 830 nm. For the wavelengths of 660 and 904 nm can be identified only inhibition at 12 and 18 J/cm², respectively. Thus, it can be stated that LLLT was able to inhibit bacterial growth in all wavelengths, not presenting the same standard inhibition among bacterial species, the wavelength and fluence tested by keeping for up to 72 hours after irradiation.

Keywords: Low level laser therapy, Skin ulcers, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espectrofotômetro de densidade óptica, alocado no Laboratório de Microbiologia do Hospital das clínicas da FMRP/USP.	26
Figura 2 – Diluição seriada das suspensões bacterianas.	27
Figura 3 – Pontos irradiados na placa de microtitulação de 96 poços.....	28
Figura 4 – Print Screen da tela do microcomputador, apresentando o processamento do software ImageJ®, para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).....	28
Figura 5 – Capela de fluxo laminar	29
Figura 6 – Fluxograma do delineamento experimental.....	29
Figura 7 – Suporte de fixação e procedimento de irradiação	31
Figura 8 – Taxa de inibição do crescimento, linha de tendência e R^2 das unidades formadoras de colônia (UFC) da <i>S. aureus</i> nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm ²	35
Figura 9 – Taxa de inibição do crescimento, linha de tendência e R^2 das unidades formadoras de colônia (UFC) da <i>P. aeruginosa</i> nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm ²	37
Figura 10 – Taxa de inibição do crescimento, linha de tendência e R^2 das unidades formadoras de colônia (UFC) da <i>E. coli</i> nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm ²	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físicos dos emissores de laser	30
Tabela 2 – Média (Desvio Padrão) da potência de irradiação (mW) nos comprimentos de onda 450, 660, 830 e 904 nm durante a aferição dos diodos e atenuação da placa de microtitulação, placa + solução fisiológica e da placa + solução fisiológica contendo as linhagens bacterianas.	32
Tabela 3 – Mediana (Primeiro; Terceiro Quartil) da <i>S. aureus</i> nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm ²	35
Tabela 4 – Mediana (Primeiro; Terceiro Quartil) da <i>P. aeruginosa</i> nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm ²	37
Tabela 5 – Mediana (Primeiro; Terceiro Quartil) da <i>E. coli</i> nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm ²	38

LISTA DE SIGLAS

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
TLBI	Terapia Laser de Baixa Intensidade
LLLT	Low Level Laser Therapy
IC	Intervalo de Confiança
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
NO	Óxido Nítrico
ATCC	Coleção Americana de Tipo de Cultura
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
TSB	Caldo Triptcase de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
NaCl	Cloreto de Sódio

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
U\$	Dólar
Nm	Nanômetro
J/cm ²	Joule por Centímetro Quadrado
µm	Micrômetro
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
~	Aproximadamente
mm	Milímetro
° C	Grau Célsius
®	Marcar Registrada
™	Marca Comercial
mL	Mililitro
µL	Microlitro
Hz	Hertz
Sec.	Segundo
mW	Miliwatts
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro Quadrado
W	Watts
R ²	Coeficiente de Determinação
h	Hora

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Úlceras cutâneas crônicas	16
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.4. <i>Escherichia coli</i>	19
2.5. Terapia Laser de Baixa Intensidade	19
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Linhagens utilizadas no estudo.....	25
4.2. Obtenção das amostras	25
4.3. Diluição e irradiação das células bacterianas	25
4.4. Delineamento experimental.....	29
4.5. Aferição do equipamento	32
4.6. Análise estatística	32
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	40
6.1. Irradiação laser em <i>Staphylococcus aureus</i>	40
6.2. Irradiação laser em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
6.3. Irradiação laser em <i>Escherichia coli</i>	44
6.4. Mecanismos de interação entre laser e bactéria	45
7. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Espécies bacterianas podem ser detectadas em feridas cutâneas crônicas. A presença de tais microrganismos não é necessariamente associada com o atraso no processo de cicatrização, mas a partir desta colonização inicial, pode-se causar problemas mais graves como infecções, ou até mesmo septicemia (KORBER et al., 2010). As infecções de úlceras cutâneas crônicas são responsáveis por considerável morbidade e contribuem significativamente para o aumento do custo dos cuidados em saúde (SIDDIQUI e BERNSTEIN, 2010). Por isso, é de essencial importância o desenvolvimento de uma terapia capaz de reduzir o número de bactérias presentes em úlceras cutâneas crônicas.

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são as principais espécies bacterianas que comumente colonizam úlceras cutâneas crônicas, as quais podem funcionar como reservatório de microrganismos multirresistentes (WIDATALLA et al., 2012; DEMETRIOU et al., 2013; JOCKENHOFER et al., 2013). As úlceras cutâneas crônicas possuem uma flora de colonização complexa e dinâmica, mas é fato que o *S. aureus* é o agente isolado mais comum e possui maior grau de virulência (WANG et al., 2010; TASCINI et al., 2011). Em um estudo realizado com 58 pacientes com úlcera venosa, foram encontrados *S. aureus* em 88% dos casos (SIDDIQUI e BERNSTEIN, 2010). Gjodsbol et al. (2006) encontraram o mesmo padrão quando acompanharam o perfil bacteriano de úlceras venosas por 8 semanas, detectando mais de uma bactéria em todas as úlceras, com predominância da *S. aureus* (93,5%) e *P. aeruginosa* (52,2%) dos casos. Já Ramakant et al. (2011), analisaram 447 pacientes com úlceras diabéticas entre 1991 e 2008 e a *P. aeruginosa* predominou com 20,1%, seguida por *S. aureus* (17,2%) e *E. coli* (16,3%). Embora os

indivíduos geralmente permaneçam sem desenvolver sinais clínicos pela presença da *E. coli*, esta bactéria é oportunista e pode causar sérias infecções (GONTCHAROVA et al., 2010).

Recentemente, um estudo multicêntrico conduzido por Jockenhöfer et al. (2013), buscou analisar o perfil bacteriano de úlceras cutâneas crônicas em 970 pacientes. A *S. aureus* foi detectada em 47,6% das feridas, sendo que 8,6% destas eram resistentes à meticilina (MRSA) e a *P. aeruginosa* foi encontrada em 31,1% dos pacientes. Nesta mesma linha, estudo realizado com 429 pacientes diabéticos com úlcera, identificaram a presença 559 agentes patogênicos. Dentre estes, as bactérias Gram-positivas foram comumente encontradas em 59,0% das úlceras infectadas, totalizando 330 espécies bacterianas, entre as quais o *S. aureus* foi predominante em 59,7% delas, sendo que 28,9% eram MRSA. Já as bactérias Gram-negativas foram encontradas em 29,9% das feridas, sendo *P. aeruginosa* a de maior incidência (FENG et al., 2013).

Em países em desenvolvimento é estimado que 1 a 2% da população desenvolverá úlceras cutâneas crônicas durante sua vida. Uma estimativa norte americana relata que o custo do tratamento de apenas uma úlcera cutânea crônica é de aproximadamente U\$8.000 por ano, podendo aumentar para U\$17.000 quando esta é infectada. No entanto, globalmente as despesas geradas pelos cuidados as úlceras cutâneas crônicas estão em torno de U\$13 a U\$15 bilhões por ano (SIDDIQUI e BERNSTEIN, 2010). Não foram encontradas estimativas semelhantes a nível nacional.

O uso de agentes físicos como ultrassom terapêutico, estimulação elétrica e terapia laser de baixa intensidade (TLBI) tem sido descritos como métodos terapêuticos adjuvantes para acelerar o processo de cicatrização, inibir o crescimento de microrganismos e reduzir os custos do tratamento, entretanto não se tem um consenso da melhor terapêutica a ser utilizada (CULLUM et al., 2001).

A TLBI é um recurso físico que tem sido utilizado pelos fisioterapeutas no tratamento de úlceras cutâneas crônicas, para acelerar o processo de cicatrização local (TARADAJ et al., 2013). No entanto, ainda existem poucos estudos que mostram o efeito da TLBI na inibição de bactérias que comumente colonizam úlceras cutâneas crônicas (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2002a; 2002b; 2003; DADRAS et al., 2006; GUFFEY E WILBORN, 2006a; 2006b; ENWEMEKA et al., 2008; ENWEMEKA et al., 2009; BUMAH et al., 2013; GUFFEY et al., 2013). Nussbaum, Lilge e Mazzulli (2002a) demonstraram efeitos biomoduladores variados utilizando diferentes comprimentos de onda, fluências e espécie bacterianas, afirmando que os resultados dependiam do comprimento de onda, da espécie bacteriana, do tempo de exposição à irradiação e da fluência da irradiação.

Embora existam poucos estudos que analisem e comparem o efeito do laser em *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, nenhum foi conduzido na metodologia proposta nesse estudo. Além disso, tais estudos não analisaram o efeito da terapia laser no espectro de luz azul, vermelho e infravermelho, em diferentes fluências e tempos de análise do crescimento bacteriano, limitando-se a analisar as respostas até 24 horas após a irradiação, não gerando dados fidedignos do real crescimento bacteriano, haja visto que essas espécies possuem capacidade de crescimento em até 48 horas (STEFAN et al., 2011).

Diante destes fatos, o objetivo do estudo é analisar o efeito da terapia laser de baixa intensidade no espectro de luz visível e infravermelho nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 0 (controle), 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm², em linhagens da *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* isolados *in vitro*, nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a irradiação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Úlceras cutâneas crônicas

Não existe uma única definição consensual para úlceras cutâneas crônicas. Singh et al. (2004) consideram ser uma úlcera crônica, quando não houver cicatrização completa entre 4 a 6 semanas. Entretanto, úlceras crônicas também foram definidas como feridas que não tenham mostrado uma redução de 20% a 40% na área após 2 a 4 semanas de tratamento (SIDDIQUI e BERNSTEIN, 2010). As úlceras cutâneas crônicas ainda podem ser definidas como aquelas não precedidas de um processo de cicatrização organizado e suficiente para garantir a integridade anatômica e funcional do sistema tegumentar dentro do período fisiológico esperado (SITUM e KOLIC, 2012). Além disso, úlceras cutâneas crônicas estão normalmente relacionadas com a diabetes mellitus, a estase venosa, doenças vasculares periféricas e úlceras de pressão (OIEN e AKESSON, 2012).

Nesse sentido, a infecção se torna um problema comum em úlceras cutâneas crônicas, muitas vezes resultando em um aumento da morbidade e mortalidade do paciente (SIDDIQUI e BERNSTEIN, 2010). A presença de bactérias em úlceras cutâneas crônicas pode representar simplesmente uma contaminação, bem como uma colonização, que por fim pode evoluir para a infecção (FRANK, BAYOUMI e WESTENDORP, 2005). Cargas bacterianas que excedam 10^5 organismos por grama de tecido, são consideradas capazes de impedir a cicatrização de feridas, embora este limite possa ser alterado pelo estado do sistema imune do hospedeiro e o número e tipo de espécie de bactérias presente (KINGSLEY, 2003).

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* estão entre as principais espécies bacterianas que comumente colonizam úlceras cutâneas crônicas (SHARKEY et al., 2011; TASCINI et al., 2011). Em estudo realizado com 300 pacientes com

úlceras crônicas em membros inferiores, foi observado que 70,7% destas apresentaram crescimento bacteriano. A bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* foi mais encontrada (25,5%), enquanto que dentre as Gram-positivas, a *S. aureus* foi a mais frequente (13,7%) (MBUNDA et al., 2012). Do mesmo modo, em estudo similar com 49 pacientes com úlceras infectadas, a *S. aureus* representou a espécie mais presente, sendo encontrado em 68,8% de todas as culturas (OIEN e AKESSON, 2012).

Na mesma linha, Korber et al. (2010) investigaram 107 úlceras cutâneas e identificaram 191 bactérias patogênicas, sendo que 55,1% dessas foram colonizadas por *S. aureus*, seguido da *P. aeruginosa* (33,6%) e *E. coli* (7,5%). Em estudo recente detectou-se colonizações da *E. coli* em 116 pacientes com úlceras diabéticas, sendo que de 35,7% destas, 75% eram resistentes a ampicilina (SHAHI, SINGH e KUMAR, 2013).

Tascini et al. (2011), analisaram amostras de 1295 pacientes com infecção de pé diabético. As bactérias Gram-positivas foram mais isoladas (52,6%), sendo *S. aureus* o único agente com maior frequência (29,9%). Espécies Gram-negativas foram encontradas em 40,6% das amostras, no entanto *P. aeruginosa* representou somente 10,3% de todas as linhagens. Um dado destacado pelos autores, é que cerca de 40% das amostras positivas eram polimicrobianas. Nesse sentido, os autores compararam os perfis microbiológicos entre pacientes tratados com antibiótico e pacientes não tratados e sugeriram que o tratamento com antibióticos não afeta os resultados microbiológicos. A razão desses achados se dá provavelmente pelo fato de que muitas amostras sejam polimicrobianas e também pelo fato de que muitas espécies bacterianas demonstraram uma sensibilidade reduzida a esta classe de antibióticos, provavelmente devido à ampla utilização destes medicamentos na prática clínica geral.

2.2. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* abrange aproximadamente 42 espécies, sendo que dessas, 20 são de interesse médico, uma vez que estão associadas a uma variedade de infecções oportunistas em seres humanos e animais (SILVA et al., 2007). Dentre essas espécies causadoras de enfermidades, o *Staphylococcus aureus* requer especial atenção devido a seu alto potencial patogênico e também a sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na prática clínica (DUKIC et al., 2013; MCKINNELL et al., 2013).

As bactérias da espécie *S. aureus* apresentam-se como cocos esféricos Gram-positivos, com aproximadamente 0,5 e 1,5 μm de diâmetro e que, por se dividirem em muitos planos durante o processo de replicação, formam estruturas semelhantes a cachos de uva. As culturas jovens de certas cepas podem ser capsuladas, porém de um modo geral, considera-se os estafilococos como microrganismos não capsulados. Geralmente, esse gênero faz parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos (CASSETTARI, STRABELLI e MEDEIROS, 2005).

Algumas linhagens da *S. aureus* produzem uma série de fatores de virulência que contribuem para patogenicidade do microrganismo, garantindo assim êxito em sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro. Isso ocorre devido a sua capacidade de adesão celular, na captação de nutrientes e evasão na resposta imunológica, produzindo uma série de enzimas e toxinas extracelulares (MORK et al., 2005). Dentre as enzimas produzidas, a coagulase é a mais conhecida por transformar a protrombina em trombina que, por sua vez, ativa a formação da fibrina, a partir do fibrinogênio, coagulando o plasma, com consequente acúmulo de fibrina ao redor da célula bacteriana, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesa (SILVA et al., 2007). Fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, são referentes a toxina da síndrome do choque tóxico, a proteína A,

lipases e polissacarídeos capsulares. Bem como, fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão nas superfícies de cateteres e próteses, são relacionados com proteínas toxinas (hemolisinas – α , β , γ e δ) (LUTZ et al., 2003; VELAZQUEZ-MEZA, 2005).

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa apresenta-se na forma de bastonetes de 0,5 a 0,8 μm de largura por 1,5 a 3,0 μm de comprimento. É um bacilo Gram-negativo, aeróbio, não-esporulado e móvel devido à presença de um flagelo (FERREIRA e LALA, 2010; HATTEMER et al., 2013). A *P. aeruginosa* é um importante agente patogênico oportunista associada com infecções nosocomiais graves, apresentando altas taxas de mortalidade que podem variar entre 20% a 38%, quando estas atingem a corrente sanguínea (SUAREZ et al., 2010). Além disso, são intrinsecamente resistentes a muitos agentes antimicrobianos e capazes de adquirir vários mecanismos de resistência a diversos grupos de antimicrobianos (FAEZI et al., 2011). Estes fatos reduzem as opções de antimicrobianos disponíveis para o seu tratamento adequado (STRATEVA e YORDANOV, 2009).

Frequentemente é observado em ambientes clínicos que as linhagens da *P. aeruginosa* apresentam um fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Esse fato pode ser atribuído a diversos mecanismos de resistência em uma única linhagem, como redução da permeabilidade da membrana externa e a presença de enzimas beta-lactamase (LISTER, WOLTER e HANSON, 2009). As taxas de resistência bacteriana são decorrentes de muitos fatores, tais como a doença relacionada ao paciente, o consumo de antibióticos ou a implementação e adesão às políticas de controle de infecções (FEHLBERG et al., 2012).

2.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria oxidase-negativa, em forma de bastonete Gram-negativo a partir da família Enterobacteriaceae. Ela é capaz de crescer tanto em ambientes aeróbios, quanto anaeróbios e pode ter motilidade variável, com flagelos peritricosos (CROXEN et al., 2013).

A *E. coli* é o microrganismo encontrado com maior frequência no meio hospitalar, conhecida como um comensal inofensivo do trato gastrointestinal em animais de sangue quente (O'NEILL et al., 2014). É apontada como uma das bactérias mais presentes nas infecções cirúrgicas (NAPP et al., 2014).

No entanto, podem existir alterações na *E. coli*, proporcionadas pelo conjunto de genes flexíveis, por meio do ganho e perda de material genético para uma série de pontos críticos ao longo do genoma, que permitem que ela se torne um microrganismo altamente diversificado e patógeno (TOUCHON et al., 2009). Nesse sentido, essa espécie bacteriana pode causar uma grande variedade de doenças humanas que se estendem a partir do trato gastrointestinal para sítios extra intestinais, tais como o trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central (KAPER, 2005; CROXEN et al., 2013).

2.5. Terapia Laser de Baixa Intensidade

A terapia laser de baixa intensidade (TLBI) vem sendo utilizada como um método fotobioestimulador, por meio da interação entre a luz e as células. Esta interação ocorre pela excitação de cromóforos intracelulares como porfirinas endógenas, citocromos da membrana mitocondrial, flavoproteínas e hemoglobina. Os cromóforos tem a capacidade de excitar o oxigênio por meio da cadeia transportadora de elétrons, gerando baixos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LAVI et al., 2003; KUSHIBIKI et al., 2013; LUO et al., 2013). As ERO desempenham um papel importante na ativação e controle de muitos processos

celulares, tais como a liberação de fatores de transcrição, expressão gênica e crescimento celular (PEPLOW, CHUNG e BAXTER, 2010; PEPLOW et al., 2011; HUANG et al., 2013; LUO et al., 2013).

Fulop et al. (2009) realizaram uma meta-análise com trabalhos publicados entre 2000 e 2007 e observaram um efeito global médio de 0,34 (IC de 95% = -0,25 a 0,94), indicando que a fototerapia tem um pequeno a moderado efeito positivo em casos clínicos de reparação de tecidos e um forte efeito positivo 2,60 (IC 95% = 1,34 – 3,31) na reparação tecidual em estudos experimentais *in vivo*. Os resultados da revisão de Peplow, Chung e Baxter (2010), que analisaram o efeito fotobiomodulador da TLBI no período de 2002 a 2009, apresentaram resultados benéficos na proliferação celular de humanos, animal e *in vitro*.

Nesse sentido, um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, fornece evidências de que a TLBI (685 nm – 10 J/cm²) pode acelerar o processo de cicatrização de úlceras cutâneas crônicas, em estudo realizado com vinte e três pacientes com feridas do pé diabético por pelo menos 3 meses (KAVIANI et al. 2011). Entretanto, não encontramos nenhuma revisão sistemática que evidencie a efetividade da TLBI na reparação tecidual de úlceras cutâneas crônicas, uma vez que ainda há um número insuficiente de estudos de boa qualidade que apresentem algumas similaridades metodológicas. Dentre estas, a potência do laser, comprimento de onda, frequência, duração e período de acompanhamento do tratamento são variáveis que apresentam grande variabilidade entre os estudos já publicados (FLEMMING e CULLUM, 2001; NELSON, 2011).

Taradaj et al. (2013) realizaram um ensaio clínico randomizado com 75 pacientes divididos em, 940, 808, 658 nm e placebo, com intervenção diária durante 4 semanas com a fluências de 4 J/cm². Os resultados demonstram que o comprimento de onda de 658 nm parece ser eficaz para a cura de úlceras por pressão, com redução de 47% no tamanho da ferida, sendo que os comprimentos de onda de 808 e 940 nm não tiveram qualquer efeito.

O estudo realizado por Ankri, Lubart e Taitelbaum (2010) foi desenvolvido para caracterizar a camada exposta no tecido lesado (derme), negligenciando a camada da epiderme superior, referindo-se ao coeficiente de absorção dos seus cromóforos. Os autores observaram que os coeficientes de absorção são dependentes do comprimento de onda do laser e da derme; e usaram as expressões relevantes no modelo de migração de fótons para calcular a profundidade de penetração da luz visível e infravermelha em tecido de pele homogênea. A profundidade da penetração consiste em dois pontos máximos, um em torno de 480 nm (penetração ~ 0,5 mm) e o outro em torno de 730 nm (penetração ~ 1,6 mm). Tendo em vista que a maioria dos estudos que utilizaram a TLBI na proliferação celular obtiveram sucesso no espectro de luz vermelho (HAWKINS, D. e ABRAHAMSE, H., 2007; HAWKINS, D. H. e ABRAHAMSE, H., 2007; EVANS e ABRAHAMSE, 2008), sugere-se que 730 nm seja o comprimento de onda ideal, uma vez que penetra melhor na ferida (ANKRI, LUBART e TAITELBAUM, 2010). A luz azul tem demonstrado ser mais eficaz do que a luz vermelha na formação de ERO (EICHLER et al., 2005), portanto seria mais indicada para a inibição bacteriana (LIPOVSKY, NITZAN e LUBART, 2008), apesar de não ter sido ainda utilizado clinicamente, devido à sua baixa profundidade de penetração no tecido.

Contudo, o laser azul vem sendo descrito como método terapêutico adjuvante na regulação da proliferação celular (LIEBMANN, BORN e KOLB-BACHOFEN, 2010) e no processo inflamatório em células humanas (WHEELAND e KORECK, 2012). Além disso, estudos tem demonstrado que a luz azul é a principal responsável pela formação de óxido nítrico (NO) e células endoteliais, promovendo a vasodilatação e consequente aumento do fluxo sanguíneo da microcirculação, podendo ser de grande importância para a cicatrização de úlceras diabéticas e venosas (ANKRI et al., 2010). É importante ressaltar que a colonização bacteriana nas úlceras cutâneas crônicas pode interferir no seu processo cicatrização

(KINGSLEY, 2003). Nesse sentido ainda existem poucos estudos que mostram o efeito da TLBI no controle bacteriano, e dentre os estudos existentes, poucos foram os que utilizaram diferentes espectros de luz e espécies bacterianas (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2002a; b; 2003; GUFFEY e WILBORN, 2006a; 2006b; ENWEMEKA et al., 2008; ENWEMEKA et al., 2009; SOUSA et al., 2012; BUMAH et al., 2013; GUFFEY et al., 2013).

Um dos poucos estudos encontrados com a aplicação do laser azul em culturas bacterianas *in vitro* foi o de Guffey e Wilborn (2006a) que ao combinar os comprimentos de onda de 405 e 880 nm (1, 3, 5 10 e 20 J/cm²), promoveram um efeito dose dependente na inibição da *P. aeruginosa* e *S. aureus* em todas as fluências testadas. Concomitantemente, os mesmos autores (GUFFEY e WILBORN, 2006b) realizaram um estudo similar com os lasers azuis de 405 e 470 nm (1, 3, 5 10 e 15 J/cm²) em *S. aureus* e *P. aeruginosa*, demonstrando efeitos inibitórios nos dois comprimentos de onda. Outro estudo Enwemeka et al. (2008) avaliaram o efeito do laser de 405 nm (1 – 60 J/cm²) no crescimento bacteriano *in vitro* de duas linhagens de *S. aureus* resistentes a metilicina, obtendo uma inibição quase completa em ambas. Em estudo posterior esses autores realizaram o mesmo experimento com o laser de 470 nm (1 – 60 J/cm²), nas mesmas fluências, alcançando resultados similares (ENWEMEKA et al., 2009).

Dadras et al. (2006) avaliaram o efeito do laser verde de 514 e 532 nm e do laser vermelho 633 nm em baixas fluências (0,015; 0,048; 0,119; 0,297; 0,451; 0,713; 0,892 e 1,13 J/cm²) no crescimento da *S. aureus* e *P. aeruginosa*, obtendo diferentes resultados entre as espécies. Observaram que a irradiação da *P. aeruginosa* em todos os comprimentos de onda e fluências testadas apresentou crescimento, atingindo o máximo de 167,7% (514 nm, 0,297 J/cm²). Por outro lado, todos os comprimento de onda e fluências inibiram o crescimento da *S. aureus* em até 69,4% (514 nm, 1,13 J/cm²).

Por fim, Nussbaum, Lilge e Mazzulli (2002a) demonstraram que os efeitos biomoduladores do laser de 630, 660, 810 e 905 nm em *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, dependiam do comprimento de onda, da espécie bacteriana, do tempo de exposição à irradiação e da fluência da irradiação. Os autores observaram que 20 horas após a irradiação, a inibição ou crescimento são fluência dependentes em *S. aureus* e *P. aeruginosa* em todos os comprimentos de onda testados, além da inibição em 630 e 660 nm e crescimento em 810 e 905 nm da *E. coli*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- ✓ Analisar a influência da terapia laser de baixa intensidade no crescimento bacteriano *in vitro*

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Analisar o efeito da irradiação laser no crescimento bacteriano entre as linhagens da *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.
- ✓ Comparar os efeitos da irradiação laser nos diferentes comprimentos de onda e fluências aplicadas nas linhagens da *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.
- ✓ Estimar a taxa de inibição bacteriana após à irradiação laser entre as linhagens da *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens utilizadas no estudo

Para realização da pesquisa foram utilizadas linhagens da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positivas), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-negativas) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativas), gentilmente cedidas pelo Departamento de Clínica Médica – Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, onde foram realizados todos os procedimentos de preparação, experimentação e contagem das colônias bacterianas, sob a colaboração do Prof. Dr. Roberto Martinez.

4.2. Obtenção das amostras

As culturas bacterianas foram repicadas e mantidas em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura ágar-sangue (BD[®], New Jersey, PA, EUA), incubadas por um período de 24 horas, à temperatura de 37° C. Após esse período, cada linhagem foi transferida para um tubo de ensaio estéril e armazenadas em um freezer a 4° C, em meio de cultura TSB (Tryptcase Soy Broth) (BD[®], New Jersey, PA, EUA) com glicerol 20%. Essas culturas foram renovadas e armazenadas mensalmente, com o objetivo de não haver alterações do crescimento bacteriano, decorrente do seu envelhecimento.

4.3. Diluição e irradiação das células bacterianas

Para a realização de cada série de experimentos, as linhagens foram repicadas e mantidas em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura Ágar Mueller-Hinton

(BD[®], New Jersey, PA, EUA), incubadas por um período de 24 horas, à temperatura de 37°C. Após o crescimento bacteriano, as células foram suspensas em solução fisiológica (0,9% de NaCl em água destilada), e em seguida foram realizadas diluições sucessivas monitoradas pela espectrofotometria óptica, utilizando-se do equipamento Densichek[™] Plus (BioMérieux[®], Durham, NC, EUA) para aferição da densidade óptica das suspensões bacterianas (Figura 1). Os valores foram dados em unidades na escala de McFarland, onde a concentração ideal deveria estar dentro de 0,5 - 0,63 correspondendo a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL na escala de McFarland. Após a obtenção desta concentração, foi inserido 1 mL desta suspensão em tubo de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica (0,9% de NaCl em água destilada), sendo realizadas cinco diluições seriadas, com o objetivo de alcançar a concentra de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL (Figura 2).

Figura 1 – Espectrofotômetro de densidade óptica, alocado no Laboratório de Microbiologia do Hospital das clínicas da FMRP/USP. Arquivo pessoal

Figura 2 – Diluição seriada das suspensões bacterianas.

Uma alíquota de 300 μ L desta suspensão foi transferida para poços da placa de microtitulação para posterior irradiação. Os poços controle não foram irradiados, permanecendo nas mesmas condições experimentais de luz ambiente. Todos os poços irradiados foram separados entre si por dois poços vazios, com o objetivo de isola-los dos demais poços irradiados para impedir a absorção de energia de poços adjacentes por meio da transmissão e reflexão da irradiação (Figura 3). Nesse contexto, todas as amostras foram irradiadas em meio líquido translucido (solução fisiológica) com o objetivo de impedir qualquer interferência do mesmo. Após cada irradiação, 100 μ L desta suspensão foi transferida e espalhada sobre a superfície do meio de cultura sólido Mueller-Hinton em placas de Petri (90 x 15 mm), incubada a 37° C e após 24, 48 e 72 horas foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC) por meio do *software ImageJ*[®] (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) (Figura 4). Todos os procedimentos experimentais foram realizados dentro de uma capela de fluxo laminar estéril (Figura 5).

Figura 3 – Pontos irradiados na placa de microtitulação de 96 poços.

Figura 4 – Print Screen da tela do microcomputador, apresentando o processamento do software ImageJ®, para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Número da UFC na imagem ampliada.

Figura 5 – Capela de fluxo laminar. Arquivo pessoal

4.4. Delineamento experimental

Cada experimento foi conduzido em triplicata com três repetições, em delineamento por blocos casualizados totalizando 648 amostras (4 comprimentos de onda x 6 fluências x 3 blocos x 3 repetições x 3 espécies bacterianas) (Figura 6). Vale ressaltar que aproximadamente um quarto de todas as amostras foram refeitas para a padronização do estudo ou devido a contaminação.

Figura 6 – Fluxograma do delineamento experimental.

Para a irradiação foi utilizado o equipamento laserpulse (Ibramed®, Amparo, SP, Brasil) com diodos nos comprimentos de onda 660 nm – vermelho; 830 e 904 nm – infravermelho e 450 nm – azul, sendo esse último desenvolvido especialmente para esse estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros físicos dos emissores de laser

Comprimento de onda[nm]	450	660	830	904
Modo de operação	Contínuo	Contínuo	Contínuo	Pulsado
Frequência [Hz]	---	---	---	9500
Duração de Pulso [sec.]	---	---	---	60×10^{-9}
Ciclo de Trabalho [%]	---	---	---	0.1
Potência de pico de irradiação [mW]	70	30	30	70×10^3
Potência média de irradiação [mW]	70	30	30	40
Diâmetro de abertura [cm]	0.1	0.16	0.36	0.48
Área de abertura do feixe [cm ²]	0.00785	0.02	0.101	0.1808
Forma do feixe	Gaussiano	Gaussiano	Gaussiano	Gaussiano
Divergência do feixe [Graus]	7° x 21°	22°	22°	11° x 25°

A densidade de energia (fluência) de irradiação foi calculada com base na fórmula abaixo:

$DE = P \times T / A$	<p>Onde:</p> <p>DE = densidade de energia (J/cm²)</p> <p>P = potência média (W)</p> <p>T = tempo de irradiação (sec.)</p> <p>A = área de irradiação (cm²)</p>
-----------------------	---

Sabe-se que a densidade de energia apresentada no painel dos equipamentos de TLBI considera a área de irradiação do diodo como parâmetro para o cálculo. Em função da utilização de quatro diodos diferentes, com diferentes áreas e potências (Tabela 1), optou-se por considerar a área dos poços da placa de microtitulação (1 cm²) que continham as amostras

bacterianas em suspensão, o que possibilitou que a densidade de energia e a energia irradiada fossem iguais para todos os diodos. Assim, para a irradiação das placas inoculadas foram utilizadas as fluências de 0 (controle), 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm², para o comprimento de onda de 450 nm os tempos de irradiação foram de 0, 43, 86, 172, 257 e 343 segundos, respectivamente; nos comprimentos de onda 660 e 830 nm os tempos de irradiação foram de 0, 100, 200, 400, 600 e 800 segundos, respectivamente; e no comprimento de onda de 904 nm os tempos de irradiação foram de 0, 75, 150, 300, 450 e 600 segundos, respectivamente. Todas as irradiações ocorreram de forma direta, pontual e perpendicular a placa, sendo o emissor fixado com o auxílio de um suporte, a uma distância de 2 mm acima da placa, sobre uma área de irradiação de 1 cm², isolado dos demais poços irradiados conforme demarcado na Figura 7.

Figura 7 – Suporte de fixação e procedimento de irradiação para o laser vermelho de 660 nm. A demarcação sobre a placa delimita a área entre os poços irradiados.

4.5. Aferição do equipamento

O equipamento foi aferido previamente à irradiação de cada lote de placas pelo Laser Check modelo Field Max Top com sensor PM3 - 0.5 mW – 2 W broadband sensor (RoHS) (Coherent®, Staunton, VA, USA) segundo proposta de Guirro e Weis (2009). Visando garantir a uniformidade da irradiação laser sobre as bactérias em suspensão, foi realizado um experimento que analisou a transmissão do laser na solução fisiológica translúcida que continha as espécies bacterianas estudadas (na mesma concentração e volume utilizada durante todo o experimento). Para isso, a amostra que continha a bactéria foi posicionada entre o diodo e o Laser Check (Tabela 2).

Tabela 2 – Média (Desvio Padrão) da potência de irradiação (mW) nos comprimentos de onda 450, 660, 830 e 904 nm durante a aferição dos diodos e transmissividade da placa de microtitulação, placa + solução fisiológica e da placa + solução fisiológica contendo as linhagens bacterianas.

	Pré - experimento	Pós – experimento	Placa	Placa + Solução Fisiológica	Placa + Solução Fisiológica + <i>S. aureus</i>	Placa + Solução Fisiológica + <i>E. coli</i>	Placa + Solução Fisiológica + <i>P. aeruginosa</i>
450 nm	71,9 (0,15)	71,5 (0,35)	63,8 (0,17)	61,7 (0,26)	57,3 (0,96)	59,0 (0,35)	57,2 (0,11)
660 nm	33,5 (0,26)	33,2 (0,25)	25,8 (1,19)*	26 (0,15)*	24,3 (0,2)*#€	23,8 (0,17) * # €	23,7 (0,1) * # €
830 nm	31,8 (0,1)	31,5 (0,2)	25,2 (0,43)*	25,2 (0,3)*	23,4 (0,3)*#€	23,5 (0,36) *#€	24,2 (0,2) *#€
904 nm	41,4 (0,32)	41,4 (0,1)	32,7 (0,26)*	32,2 (1,05)*	30,8 (0,2)*	29,7 (1,41) *#€	30,7 (0,66) *

p<0.05 no mesmo comprimento de onda: * - Vs. pré e pós experimentos - ; # - Vs. Placa; € - Vs. Placa + Solução Fisiológica;

4.6. Análise estatística

Para a análise estatística, os dados foram submetidos a uma análise exploratória. Esta metodologia tem como objetivo básico sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo que se tenha uma visão global da variação desses valores, organizando e descrevendo os dados de duas maneiras: em tabelas com medidas descritivas e em gráficos.

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados referentes a contagem das UFC foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis e post hoc de Dunn. Já a análise da potência e a transmissividade dos diodos foram submetidos ao teste de ANOVA Oneway e post hoc Tukey, todos com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o software SPSS 20.0 (IBM[®], Chicago, IL - USA).

5. RESULTADOS

O crescimento da *S. aureus* foi inibido em fluências superiores a 12 J/cm², se comparadas ao controle em todos os comprimentos de onda testados ($p < 0,05$), atingindo uma taxa de inibição de 79,6% (450 nm – 12 J/cm²). Quando comparadas as fluências entre si, observou-se que fluência de 24 J/cm² apresentou maior inibição que 3 J/cm² em todos os espectros de luz, alcançando inibição próxima a 80% (660 nm – 24 J/cm²). É importante ressaltar que em 450 nm fluências superiores a 6 J/cm² não apresentaram diferenças entre si (Tabela 3, Figura 8). Entretanto, ao analisar o comportamento da taxa de inibição bacteriana, pode-se observar uma tendência similar entre todos os comprimentos de onda (Figura 8).

No que se refere às diferenças entre comprimento de onda em uma mesma fluência, observou-se uma maior inibição da *S. aureus* quando irradiado no espectro de luz azul (450 nm) em 6 J/cm². Do mesmo modo, o laser vermelho (660 nm) apresentou uma maior inibição em 24 J/cm² se comparado com o comprimento de onda 830 nm (infravermelho) (Tabela 3).

Tabela 3 – Mediana (Primeiro; Terceiro Quartil) das unidades formadoras de colônias (UFC) da *S. aureus* nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm².

		Controle	3 J/cm ²	6 J/cm ²	12 J/cm ²	18 J/cm ²	24 J/cm ²
450 nm	24h	250 (161; 254)	153 (115; 205)	74 (72; 87) *	71 (64; 82) *	90 (52; 101) *	77 (21; 102) *‡
	48h	252 (158; 254)	151 (115; 213)	76 (72; 93) *	74 (68; 80) *	92 (56; 102) *	77 (23; 105) *‡
	72h	250 (157; 258)	150 (116; 218)	79 (74; 95) *	75 (70; 82) *	92 (56; 101) *	77 (23; 75) *‡
660 nm	24h	232 (189; 256)	229 (122; 236)	148 (122; 199) £	102 (77; 141) *	86 (66; 97) *	47 (45; 55) *‡†
	48h	228 (192; 250)	225 (120; 230)	150 (125; 196) £	100 (76; 152) *	89 (67; 98) *	47 (46; 56) *‡†
	72h	232 (192; 248)	227 (124; 229)	151 (119; 197) £	104 (76; 150) *	88 (67; 98) *	47 (46; 54) *‡†
830 nm	24h	203 (194; 262)	152 (146; 159)	144 (138; 154) £	140 (107; 143) *	111 (95; 122) *	97 (94; 104) *‡¥
	48h	207 (195; 262)	155 (146; 158)	147 (135; 153) £	141 (107; 146) *	109 (96; 122) *	95 (94; 101) *‡¥
	72h	206 (197; 263)	153 (145; 158)	146 (135; 155) £	140 (107; 145) *	110 (96; 122) *	96 (94; 101) *‡¥
904 nm	24h	191 (163; 192)	171 (146; 179)	145 (122; 157) £	127 (112; 133) *	104 (84; 110) *‡	69 (52; 90) *‡†
	48h	186 (159; 191)	169 (146; 176)	142 (124; 160) £	131 (112; 136) *	105 (91; 114) *‡	69 (54; 89) *‡†
	72h	183 (161; 191)	169 (145; 175)	143 (124; 161) £	130 (113; 139) *	104 (91; 114) *‡	69 (54; 89) *‡†

p<0,05 no mesmo tempo e comprimento de onda em relação à fluência: * vs. controle; ‡ vs. 3 J/cm²; † vs. 6 J/cm².

p<0.05 no mesmo tempo e fluência em relação ao comprimento de onda: £ vs. 450 nm; ¥ Vs. 660 nm.

Figura 8 – Taxa de inibição do crescimento, linha de tendência e R² das unidades formadoras de colônia (UFC) da *S. aureus* nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm².

Ao analisarmos o efeito da irradiação laser em culturas da *P. aeruginosa*, é possível identificar um padrão de inibição em todos os comprimentos de onda testados (R^2 entre 0,87 a 0,93), sendo este apresentado de forma mais homogênea entre 660, 830 e 904 nm (Figura 9). Nesse sentido, o laser azul (450 nm) inibiu o crescimento bacterianos em fluências superiores a 6 J/cm², 24h após na irradiação, diferindo-se dos resultados obtidos após 72h. Em 660 nm obteve-se inibição nas fluências de 18 e 24 J/cm² em todos os tempos após a irradiação, atingindo uma taxa de inibição de 57% (24 J/cm²). Já em 830 nm pode-se observar inibição significativa em fluências superiores a 6 J/cm², com taxa de inibição de 46% (24 J/cm²) e, no comprimento de onda de 904 nm só foi possível observar inibição em 24 J/cm² (50%) (Tabela 4, Figura 9).

Ao comparar diferentes comprimentos de onda em uma mesma fluência, pode-se observar que em 12 J/cm², o comprimento de onda 904 nm apresentou maior inibição que 450 nm, assim como, nos comprimento de 660 e 904 nm na fluência de 24 J/cm² (Tabela 4).

Tabela 4 – Mediana (Primeiro; Terceiro Quartil) das unidades formadoras de colônias (UFC) da *P. aeruginosa* nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm².

		Controle	3 J/cm ²	6 J/cm ²	12 J/cm ²	18 J/cm ²	24 J/cm ²
450 nm	24h	172 (165; 230)	143 (129; 169)	131 (108; 140) *	122 (121; 142) *	127 (114; 128) *	138 (124; 152) *
	48h	158 (143; 212)	139 (109; 145)	118 (99; 132) *#	120 (118; 130)	117 (105; 123) *	123 (115; 137)
	72h	156 (142; 211)	138 (107; 144) #	117 (100; 132) #	119 (116; 128) #	115 (105; 121) *#	122 (114; 137) #
660 nm	24h	158 (144; 205)	116 (109; 126)	127 (106; 170)	114 (80; 128)	85 (60; 112) *	68 (60; 99) *†£
	48h	148 (140; 196)	103 (98; 112)	91 (79; 143)	101 (77; 118)	83 (58; 108) *	64 (58; 99) *£
	72h	148 (139; 192)	101 (95; 111) #	88 (77; 140) #	97 (76; 115) #	82 (58; 105) *#	63 (58; 99) *£
830 nm	24h	169 (152; 179)	125 (108; 134)	98 (84; 111) *	106 (90; 122) *	98 (94; 109) *	89 (76; 122) *
	48h	149 (143; 157)	114 (86; 116)	90 (78; 92) *	102 (86; 113) *	84 (82; 95) *#	80 (76; 114) *
	72h	143 (141; 156)	112 (84; 115) #	87 (77; 90) *#	100 (83; 113) *#	84 (80; 92) *#	79 (75; 114) *
904 nm	24h	162 (157; 183)	131 (44; 143)	106 (46; 138)	83 (47; 110) £	80 (54; 121)	84 (32; 110) *£
	48h	160 (152; 179)	129 (43; 136)	102 (47; 126)	82 (46; 106) £	76 (50; 108)	78 (31; 94) *£
	72h	156 (151; 176)	128 (42; 136) #	100 (47; 127) #	81 (46; 102) #£	75 (49; 105) #	77 (31; 91) *#£

p<0,05 no mesmo tempo e comprimento de onda em relação à fluência: * vs. controle; † vs. 6 J/cm².

p<0,05 no mesmo tempo e fluência em relação ao comprimento de onda: £ vs. 450 nm.

p<0,05 no mesmo comprimento de onda e fluência em relação ao tempo: # vs. 24h.

Figura 9 – Taxa de inibição do crescimento, linha de tendência e R^2 das unidades formadoras de colônia (UFC) da *P. aeruginosa* nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm².

Na figura 10, é possível identificar um padrão de inibição nas culturas bacterianas da *E. coli*, nos comprimentos de onda de 450 e 830 nm ($R^2 = 0,79$ e $0,854$; respectivamente). Nesse sentido, pode-se verificar uma inibição significativa em 450 nm, nas fluências entre 3 e 18 J/cm², com taxa de inibição de 46% (18 J/cm²). Entretanto, em 660 nm só foi possível observar inibição em 12 J/cm² (31%). No comprimento de onda de 830 nm pode-se identificar inibições em 3, 6, 12 e 24 J/cm², contudo não existe diferença entre essas fluências, onde a maior taxa de inibição foi de 44% (12 J/cm²). Em 904 nm podemos observar inibição bacteriana apenas na fluência de 18 J/cm² (27%), entretanto, essa se difere também de 3 J/cm² em 24 e 72h após a irradiação (Tabela 5).

Diferenças entre comprimentos de onda em uma mesma fluência, foram observadas em 830 nm quando apresentou maior inibição que 660 nm nas fluências de 3, 6 e 24 J/cm². Assim como, 904 nm nas fluências de 18 e 24 J/cm² (Tabela 5).

Tabela 5 – Mediana (Primeiro; Terceiro Quartil) das unidades formadoras de colônias (UFC) da *E. coli* nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm².

		Controle	3 J/cm ²	6 J/cm ²	12 J/cm ²	18 J/cm ²	24 J/cm ²
450 nm	24h	102 (90; 111)	64 (55; 71) *	64 (58; 65) *	63 (59; 71) *	56 (49; 62) *	70 (68; 71)
	48h	104 (92; 109)	64 (53; 73) *	63 (57; 64) *	65 (59; 70) *	55 (49; 66) *	70 (68; 71)
	72h	104 (92; 108)	64 (54; 72) *	63 (55; 65) *	64 (59; 70) *	56 (49; 65) *	70 (68; 71)
660 nm	24h	103 (85; 125)	90 (77; 95)	94 (72; 95)	68 (60; 73) *	75 (70; 87)	94 (71; 96)
	48h	100 (86; 120)	88 (74; 94)	91 (71; 94)	70 (58; 73) *	73 (70; 86)	94 (73; 98)
	72h	101 (88; 122)	90 (75; 94)	90 (72; 94)	71 (59; 74) *	73 (71; 86)	94 (74; 100)
830 nm	24h	83 (80; 86)	59 (32; 64) *¥	52 (43; 71) *¥	47 (36; 61) *	57 (49; 72)	49 (42; 72) *¥
	48h	84 (81; 87)	61 (30; 64) *¥	54 (42; 71) *¥	46 (35; 60) *	60 (49; 74)	47 (44; 72) *¥
	72h	82 (80; 87)	60 (31; 64) *¥	56 (42; 71) *¥	46 (34; 60) *	60 (50; 74)	47 (44; 72) *¥
904 nm	24h	74 (73; 82)	80 (59; 86)	59 (51; 67)	65 (52; 76)	54 (43; 56) *‡¥	62 (55; 71) ¥
	48h	74 (72; 78)	77 (58; 86)	62 (51; 68)	61 (57; 74)	53 (43; 60) *¥	61 (57; 71) ¥
	72h	75 (71; 78)	78 (59; 86)	63 (50; 68)	60 (52; 75)	54 (42; 60) *‡¥	64 (58; 71) ¥

p<0,05 no mesmo tempo e comprimento de onda em relação à fluência: * vs. controle; ‡ vs. 3 J/cm².

p<0.05 no mesmo tempo e fluência em relação ao comprimento de onda: ¥ Vs. 660 nm.

Figura 10 – Taxa de inibição do crescimento, linha de tendência e R^2 das unidades formadoras de colônia (UFC) da *E. coli* nos grupos controle e irradiados nos comprimentos de onda de 450, 660, 830 e 904 nm, nas fluências de 3, 6, 12, 18 e 24 J/cm².

6. DISCUSSÃO

Como já havíamos mencionado, ainda não há um consenso sobre o comprimento de onda e a fluência mais adequada para a inibição bacteriana. Uma explicação para esse problema pode ser devido à variedade de equipamentos que existem no mercado mundial, com parâmetros variados de área de emissão do feixe e potências. Essas variações determinam o tempo de irradiação, podendo interferir diretamente nos resultados do tratamento (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2003). Nesse sentido, no presente estudo pode-se observar que por mais que tenhamos tomado o cuidado de irradiar a mesma densidade de energia para uma mesma área, não foi observar uma resposta de inibição dependente da fluência. No entanto, quando analisamos a taxa de inibição com base no comprimento de onda podemos visualizar um efeito comprimento de onda dependente. Uma vez que quando se observa a taxa de inibição nos diferentes comprimentos de onda e espécies bacterianas, não é possível visualizar a mesma taxa de inibição bacteriana (Figura 8, 9 e 10).

6.1. Irradiação laser em *Staphylococcus aureus*

Ao analisar o efeito específico do laser azul (450 nm – 70 mW) pode-se observar a inibição do crescimento da *S. aureus* em fluências superiores a 6 J/cm², atingindo inibição 70,7%. No entanto, Guffey e Wilborn (2006b) não obtiveram resultados significativos de inibição ao utilizar o laser azul de maior potência, em baixas fluências (470 nm – 150 mW – 1, 3 e 5 J/cm²); pelo contrário, observou uma estimulação de 15,5% na fluência de 3 J/cm². Contraditoriamente, no mesmo estudo foi verificada inibições de 61,7% e 56,1% na mesma fluência de 3 e 5 J/cm², no comprimento de onda de 405 nm (160 mW). Todavia esse comprimento de onda se aproxima do espectro de luz ultravioleta, onde é sabido os seus

efeitos bactericidas, principalmente pela capacidade de atuar na cadeia transportadora de elétrons produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem ser tóxicas as células bacterianas (MACLEAN et al., 2008).

Corroborando com o presente estudo, Enwemeka et al. (2008) utilizaram o laser azul de 405 nm com uma potência bastante alta (500 mW) e observaram resultados similares aos nossos, inibindo o crescimento bacteriano em duas linhagens da *S. aureus* (MRSA) US-300 e IS-853, com decréscimo de aproximadamente 50%, na fluência de 13 J/cm². Em estudo posterior estes autores realizaram estudo similar, utilizando o laser azul 470 nm (150 mW), nas mesmas fluências (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 J/cm²), e observaram resultados semelhantes ao estudo anterior, atingindo uma inibição bacteriana de 91,7% (US-300) e 94,8% (IS-853) utilizando uma densidade de energia de 55 J/cm² (ENWEMEKA et al., 2009). Esses resultados demonstram que por mais que se utilize o mesmo espectro de luz, o comprimento de onda e as potências ainda são determinantes para o sucesso do tratamento.

Em estudo recente, Guffey et al. (2013) analisaram o efeito da terapia laser azul (405 nm – 160 mW) com irradiações diárias de 9 J/cm² em culturas da *S. aureus*, por sete dias consecutivos. As culturas crescidas 24 horas após a irradiação, foram inoculadas em placa e novamente irradiadas até o sétimo dia. Os resultados indicam maior inibição (59,49%) após o quarto dia de irradiação, com decréscimo do efeito inibitório, do quinto ao sétimo dia de tratamento. Os autores inferem que as bactérias podem se tornar resistentes à irradiação, em decorrência da repetição do tratamento, se proliferando mais com o decorrer do tempo. Acreditamos que essa hipótese deve ser considerada com ressalva, já que esses efeitos não devem ser associados a repetição do tratamento, mas sim a possibilidade do aumento da concentração bacteriana ao longo do processo de tratamento, já que o autor não relata claramente a manutenção da diluição inicial em todas as irradiações. Corroborando com essa

afirmativa, Bumah et al. (2013) avaliaram o efeito dos laser azul 405 nm (18 mW) e 470 nm (25 mW) nas fluências de 0, 1, 3, 45, 50, 55, 60 e 220 J/cm², em três concentrações distintas da *S. aureus* (3×10^6 ; 5×10^6 e 7×10^6 CFU/mL), os autores obtiveram menor inibição na maior concentração, demonstrando que a densidade bacteriana é relevante para o sucesso do tratamento. No presente estudo avaliamos o comportamento bacteriano durante 72 horas após uma única irradiação laser azul 450 nm (70 mW), com avaliações diárias do crescimento das UFC. No entanto, não observamos alterações do crescimento em relação ao tempo.

Dentre os comprimentos de onda e espécies bacterianas estudadas, o espectro de luz vermelho (660 nm – 30 mW), apresentou o melhor resultado na inibição bacteriana, com diminuição do crescimento da *S. aureus*, de 61,9% e 79,6% na fluências de 18 e 24 J/cm², respectivamente. Do mesmo modo, Libanore (2008) realizou estudo similar ao irradiar culturas de *S. aureus*, em meio translúcido, com luz vermelha (685 nm – 100 mW) nas fluências de 33, 66 e 133 J/cm². Os resultados do estudo demonstraram inibição bacteriana em todas as fluências testadas, com taxas de inibição inferior a 50%, com os melhores resultados na fluência de 133 J/cm². Ao contrário, Nussbaum, Lilge e Mazzulli (2002a) realizaram estudo com comprimento de onda (660 nm – 75 mW) e não encontram diferenças significativas no crescimento bacteriano. Esses resultados reforçam a hipótese de que por mais que se utilize o mesmo espectro de luz, a potências ainda é um fator determinantes para o sucesso do tratamento.

No que se refere à irradiação infravermelha, o presente estudo apresentou inibição significativa do crescimento da *S. aureus* em fluências superiores a 12 J/cm², com inibição máxima de 53,2% (830 nm) e 63,0% (904 nm) na fluência de 24 J/cm². Esses achados vão de encontro com nosso estudo anterior (SOUSA et al., 2012), onde obtivemos inibição do crescimento em todas as fluências testadas. Bem como, em estudo realizado por Guffey e Wilborn (2006a) ao combinar os comprimentos de onda de 405 e 880 nm (1, 3, 5 10 e

20 J/cm²), promoveram um efeito dose dependente na inibição da *S. aureus* em todas as fluências testadas, atingindo a maior inibição na fluência de 20 J/cm² (72,2%).

Utilizando de comprimentos de onda muito próximos dos estudos já apresentados, Nussbaum, Lilge e Mazzulli (2002a) obtiveram inibição da *S. aureus*, nos comprimentos de onda de 810 e 905 nm (15 mW) na fluência de 5 J/cm² e contrariamente, foi identificado um crescimento de 27%, na fluência de 50 J/cm² no comprimento de 905 nm. Em outro estudo estes mesmos autores avaliaram o efeito da terapia laser (810 nm – 15 mW) em diferentes frequências de pulso (contínuo, 26, 292, 1000 e 3800 Hz), observando aumento do crescimento da *S. aureus* nas duas maiores frequências (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2002b).

6.2. Irradiação laser em *Pseudomonas aeruginosa*

Ao analisarmos o efeito da irradiação laser em culturas da *P. aeruginosa*, é possível identificar um padrão de inibição em todos os comprimento de onda testados (Figura 9). No entanto, o laser azul (450 nm) inibiu o crescimento bacterianos em fluências superiores a 6 J/cm², se mantendo até a maior fluência testada, com um padrão moderado de inibição ($R^2 = 0,87$), alcançado inibição máxima na fluência de 18 J/cm² (26,1%) (Figura 9). Todavia, Guffey e Wilborn (2006b) obtiveram altos padrões de inibição da *P. aeruginosa*, nas fluências de 5, 10 e 15 J/cm² com os lasers azuis de 405 nm (160 mW) e 470 nm (150 mW), chegando a alcançar uma inibição de 96,5% (470 nm – 5 J/cm²). Em estudo paralelo os mesmos autores, avaliaram a associação dos lasers azul (405 nm – 200 mW) e infravermelho (880 nm – 250 mW) no crescimento da *P. aeruginosa*, obtendo 93,8% de inibição a uma fluência de 20 J/cm² (GUFFEY e WILBORN, 2006a). No presente estudo, o laser infravermelho 830 nm obteve inibição significativa em fluências superiores a 6 J/cm², com taxa de inibição de 46,0% (24 J/cm²), diferente do apresentado pelos comprimentos de onda de 660 e 904 nm, que

apresentou inibição somente na fluência de 24 J/cm². Entretanto, em estudo realizado por Libanore (2008) pode-se observar que a inibição máxima do crescimento de *P. aeruginosa* ocorreu no comprimento de onda 685 nm nas fluências de 66 e 133 J/cm², se comparado com 830 nm e a associação dos comprimentos de onda de 685 e 830 nm. Esses resultados reforçam a hipótese de que altas doses podem ser mais eficiente na inibição bacteriana.

Nussbaum, Lilge e Mazzulli (2002a) obtiveram inibição significativa com o laser 810 nm na fluência de 18 J/cm². Em estudo subsequente estes autores observaram inibição do crescimento da *P. aeruginosa*, com fluências entre 5 e 50 J/cm², no mesmo comprimento de onda e em duas potências distintas (15 e 75 mW) (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2003). Entretanto, esses autores identificaram crescimento da *P. aeruginosa*, no mesmo comprimento de onda e fluências, em diferentes frequências de pulso (26, 1000 e 3800 Hz) (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2002b).

Foram identificadas diferenças após 72 horas da irradiação em culturas da *P. aeruginosa* em todas as fluências. Contudo, esse comportamento também foi observado no grupo controle, o que pode demonstrar que essa inibição não seja decorrente da irradiação laser.

6.3. Irradiação laser em *Escherichia coli*

Após a irradiação, culturas bacterianas da *E. coli* apresentaram um padrão de inibição no comprimento de onda 830 nm ($R^2 = 0,854$), com inibições em 3, 6, 12 e 24 J/cm². Contudo, não houve diferença entre essas fluências, onde a maior taxa de inibição apresentada foi de 44,0% (12 J/cm²). Para o comprimento de 660 nm só foi possível observar inibição em 12 J/cm² (31%). Contraditoriamente, Nussbaum, Lilge e Mazzulli (2002b) ao avaliar o efeito da terapia laser (810 nm – 15 mW) em diferentes regimes e frequências de pulso (contínuo; pulsado a 26, 292, 1000 e 3800 Hz), observaram crescimento da *E. coli* no modo contínuo e

pulsado a 1000 Hz, nas fluências de 1, 2, 5 e 10 J/cm². Concomitante, em estudo paralelo, os mesmos autores encontraram resultados similares utilizando o laser no modo contínuo, no mesmo comprimento de onda e fluências (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2002a). Nussbaum, Lilge e Mazzulli (2003) avaliaram a influência da potência (15 e 30 mW) no crescimento da *E. coli*, com aplicação do laser 810 nm e em diferentes fluências (1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 J/cm²), obtendo um padrão de aumento na maioria das fluências testadas (1 – 20 J/cm²). Com resultados opostos, no presente estudo pode-se verificar uma inibição significativa em 450 nm, nas fluências entre 3 e 18 J/cm², com taxa de inibição de 46,0% (18 J/cm²). No entanto, até o presente momento, não foram encontrados estudos que analisaram o efeito do laser azul nesta espécie bacteriana, nos impossibilitando de conduzir uma discussão pautada neste espectro de luz.

6.4. Mecanismos de interação entre laser e bactéria

No presente estudo podemos observar que as culturas da *E. coli* e *P. aeruginosa* se comportaram de maneira similar em todas as fluências testadas, diferindo-se da *S. aureus*. Esse fato pode ser explicado pela diferença morfológica das células bacterianas Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). As bactérias Gram-positivas possuem paredes celulares espessas, enquanto que bactérias Gram-negativas possuem parede celular mais delgada (MORITA et al., 2013). Essas divergências estruturais podem ser fatores preponderantes na penetração da irradiação laser, bem como os seus efeitos biológicos.

Outra hipótese que pode ser levantada a respeito do efeito inibitório da irradiação laser, se refere a absorção de fótons, pelos possíveis cromóforos presentes na cadeia respiratória bacteriana, podendo produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), sem a adição de fotossensibilizadores exógenos. Uma vez que Kushibiki et al. (2013) observaram que cromóforos intracelulares são capazes de excitar o oxigênio por meio da cadeia

transportadora de elétrons em células eucariotas. Porfirinas intracelulares também podem ser responsáveis pela produção de ERO (PAPAGEORGIOU, KATSAMBAS e CHU, 2000), principalmente o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), consequentemente promovendo efeitos tóxicos relacionados com o estresse oxidativo, culminando na morte celular por desnaturação enzimática e ruptura da parede celular (VATANSEVER et al., 2013).

Deste modo sugerimos que esses aspectos sejam investigados, no que diz respeito à análises morfológicas e fisiológicas de cada espécie bacteriana, com irradiação laser em diferentes comprimentos de onda e fluências. Desta maneira espera-se que cheguemos a um consenso nos resultados e com isso possa haver uma padronização dos melhores parâmetros a serem utilizados em cada espécie.

Um fator importante que pode ser preponderante na comparação dos resultados do presente estudo, com os resultados encontrados nos demais estudos refere-se à potência dos diodos, tempo de irradiação e o delineamento experimental utilizado em cada um deles. Neste estudo, realizou-se a irradiação em bactérias suspensas em meio líquido translúcido (solução fisiológica) com uma pequena diminuição na transmissividade da irradiação, o que garantiu que todo conteúdo do poço da placa de microtitulação foi irradiado. No entanto, em todos os estudos citados, a irradiação das bactérias foi realizada sobre meio de cultura de densidade e coloração variada, não sendo mencionado o nível de absorção, refração ou transmissividade do feixe de luz laser (NUSSBAUM, LILGE e MAZZULLI, 2002a; 2002b; 2003; DADRAS et al., 2006; GUFFEY e WILBORN, 2006a; 2006b; ENWEMEKA et al., 2008; ENWEMEKA et al., 2009; BUMAH et al., 2013; GUFFEY et al., 2013), sendo esse um ponto importante a ser considerado em estudos futuros, já que a absorção da energia laser pelo meio de cultura pode repercutir no crescimento e/ou inibição bacteriana.

7. CONCLUSÃO

A terapia laser de baixa intensidade foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em todos os comprimentos de onda, não apresentando o mesmo padrão de inibição entre as espécies bacterianas, comprimento de onda e fluências testadas, se mantendo por até 72 horas após a irradiação, não apresentando uma relação tempo dependente.

Deste modo, para a inibição bacteriana recomendamos a utilização da fototerapia nas fluências de 12, 18 e 24 J/cm² para a inibição da *S. aureus* e 24 J/cm² para *P. aeruginosa*, independente do comprimento de onda. Já para a *E. coli* a fluência de 12 J/cm² demonstrou efeitos positivos nos comprimentos de onda de 450, 660 e 830 nm, assim como a fluência de 18 J/cm² em 904 nm. Nesse sentido, podemos inferir que nos comprimentos de onda testados, fluências superiores a 18 J/cm² são indicadas para o controle bacteriano. Do mesmo modo, podemos afirmar que de uma maneira geral os lasers nos comprimentos de onda 450 nm e 660 nm foram mais efetivos na taxa de inibição bacteriana.

REFERÊNCIAS

ANKRI, R.; FRIEDMAN, H.; SAVION, N. et al. Visible light induces nitric oxide (NO) formation in sperm and endothelial cells. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 4, p. 348-52, Apr 2010.

ANKRI, R.; LUBART, R.; TAITELBAUM, H. Estimation of the optimal wavelengths for laser-induced wound healing. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 8, p. 760-4, Oct 2010.

BUMAH, V. V.; MASSON-MEYERS, D. S.; CASHIN, S. E. et al. Wavelength and bacterial density influence the bactericidal effect of blue light on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 11, p. 547-53, Nov 2013.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 70-6, Feb 2005.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 822-80, Oct 2013.

CULLUM, N.; NELSON, E. A.; FLEMMING, K. et al. Systematic reviews of wound care management: (5) beds; (6) compression; (7) laser therapy, therapeutic ultrasound, electrotherapy and electromagnetic therapy. **Health Technol Assess**, v. 5, n. 9, p. 1-221, 2001.

DADRAS, S.; MOHAJERANI, E.; EFTEKHAR, F. et al. Different photoresponses of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to 514, 532, and 633 nm low level lasers in vitro. **Curr Microbiol**, v. 53, n. 4, p. 282-6, 2006.

DEMETRIOU, M.; PAPANAS, N.; PANOPOULOU, M. et al. Determinants of microbial load in infected diabetic foot ulcers: a pilot study. **Int J Endocrinol**, v. 2013, p. 858206, 2013.

DUKIC, V. M.; LAUDERDALE, D. S.; WILDER, J. et al. Epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e52722, 2013.

EICHLER, M.; LAVI, R.; SHAINBERG, A. et al. Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells. **Lasers Surg Med**, v. 37, n. 4, p. 314-9, Oct 2005.

ENWEMEKA, C. S.; WILLIAMS, D.; ENWEMEKA, S. K. et al. Blue 470-nm light kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 2, p. 221-6, Apr 2009.

ENWEMEKA, C. S.; WILLIAMS, D.; HOLLOSI, S. et al. Visible 405 nm SLD light photo-destroys methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 10, p. 734-7, Dec 2008.

EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 24, n. 4, p. 199-210, Aug 2008.

FAEZI, S.; SATTARI, M.; MAHDAVI, M. et al. Passive immunisation against *Pseudomonas aeruginosa* recombinant flagellin in an experimental model of burn wound sepsis. **Burns**, v. 37, n. 5, p. 865-72, Aug 2011.

FEHLBERG, L. C.; XAVIER, D. E.; PERARO, P. P. et al. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microb Drug Resist**, v. 18, n. 4, p. 402-7, Aug 2012.

FENG, S. H.; CHU, Y. J.; WANG, P. H. et al. Risk factors and gene type for infections of MRSA in diabetic foot patients in Tianjin, China. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 12, n. 2, p. 106-12, Jun 2013.

FERREIRA, H.; LALA, E. *Pseudomonas aeruginosa*: um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 12, n. 2, p. 44-50, 2010.

FLEMMING, K.; CULLUM, N. Electromagnetic therapy for the treatment of venous leg ulcers. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD002933, 2001.

FRANK, C.; BAYOUMI, I.; WESTENDORP, C. Approach to infected skin ulcers. **Can Fam Physician**, v. 51, p. 1352-9, Oct 2005.

FULOP, A. M.; DHIMMER, S.; DELUCA, J. R. et al. A meta-analysis of the efficacy of phototherapy in tissue repair. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 5, p. 695-702, Oct 2009.

GJODSBOL, K.; CHRISTENSEN, J. J.; KARLSMARK, T. et al. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. **Int Wound J**, v. 3, n. 3, p. 225-31, Sep 2006.

GONTCHAROVA, V.; YOUN, E.; SUN, Y. et al. A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. **Open Microbiol J**, v. 4, p. 8-19, 2010.

GUFFEY, J. S.; PAYNE, W.; JONES, T. et al. Evidence of resistance development by *Staphylococcus aureus* to an in vitro, multiple stage application of 405 nm light from a supraluminous diode array. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 4, p. 179-82, Apr 2013.

GUFFEY, J. S.; WILBORN, J. Effects of combined 405-nm and 880-nm light on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 6, p. 680-3, Dec 2006a.

_____. In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 6, p. 684-8, Dec 2006b.

GUIRRO, R. R.; WEIS, L. C. Radiant power determination of low-level laser therapy equipment and characterization of its clinical use procedures. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 4, p. 633-9, Aug 2009.

HATTEMER, A.; HAUSER, A.; DIAZ, M. et al. Bacterial and clinical characteristics of health care- and community-acquired bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 8, p. 3969-75, Aug 2013.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Influence of broad-spectrum and infrared light in combination with laser irradiation on the proliferation of wounded skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n. 3, p. 159-69, Jun 2007.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. **J Photochem Photobiol B**, v. 88, n. 2-3, p. 147-55, Sep 25 2007.

HUANG, Y. Y.; NAGATA, K.; TEDFORD, C. E. et al. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **J Biophotonics**, v. 6, n. 10, p. 829-38, Oct 2013.

JOCKENHOFER, F.; GOLLNICK, H.; HERBERGER, K. et al. Bacteriological pathogen spectrum of chronic leg ulcers: Results of a multicenter trial in dermatologic wound care centers differentiated by regions. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 11, n. 11, p. 1057-63, Nov 2013.

KAPER, J. B. Pathogenic *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol**, v. 295, n. 6-7, p. 355-6, Oct 2005.

KAVIANI, A.; DJAVID, G. E.; ATAIE-FASHTAMI, L. et al. A randomized clinical trial on the effect of low-level laser therapy on chronic diabetic foot wound healing: a preliminary report. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 2, p. 109-14, Feb 2011.

KINGSLEY, A. The wound infection continuum and its application to clinical practice. **Ostomy Wound Manage**, v. 49, n. 7A Suppl, p. 1-7, Jul 2003.

KORBER, A.; SCHMID, E. N.; BUER, J. et al. Bacterial colonization of chronic leg ulcers: current results compared with data 5 years ago in a specialized dermatology department. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 24, n. 9, p. 1017-25, Sep 2010.

KUSHIBIKI, T.; HIRASAWA, T.; OKAWA, S. et al. Blue laser irradiation generates intracellular reactive oxygen species in various types of cells. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 3, p. 95-104, Mar 2013.

LAVI, R.; SHAINBERG, A.; FRIEDMANN, H. et al. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 42, p. 40917-22, Oct 17 2003.

LIBANORE, D. Z. **Efeitos da terapia a laser de baixa intensidade (685 e 830 nm) na taxa de proliferação bacteriana e na cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal**. 2008, 98f Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

LIEBMANN, J.; BORN, M.; KOLB-BACHOFEN, V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 1, p. 259-69, Jan 2010.

LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; LUBART, R. A possible mechanism for visible light-induced wound healing. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 7, p. 509-14, Sep 2008.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 4, p. 582-610, Oct 2009.

LUO, L.; SUN, Z.; ZHANG, L. et al. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF-beta1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 3, p. 725-34, May 2013.

LUTZ, L.; MACHADO, A.; KUPLICH, N. et al. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 224-8, Jun 2003.

MACLEAN, M.; MACGREGOR, S. J.; ANDERSON, J. G. et al. The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus*. **J Photochem Photobiol B**, v. 92, n. 3, p. 180-4, Sep 18 2008.

MBUNDA, F.; MCHEMBE, M.; CHALYA, P. et al. Experiences with Surgical treatment of chronic lower limb ulcers at a Tertiary hospital in northwestern Tanzania: A prospective review of 300 cases. **BMC Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 17, 2012.

MCKINNELL, J. A.; MILLER, L. G.; EELLS, S. J. et al. A systematic literature review and meta-analysis of factors associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at time of hospital or intensive care unit admission. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 34, n. 10, p. 1077-86, Oct 2013.

MORITA, S.; TAGAI, C.; SHIRAISHI, T. et al. Differential mode of antimicrobial actions of arginine-rich and lysine-rich histones against Gram-positive *Staphylococcus aureus*. **Peptides**, v. 48, p. 75-82, Oct 2013.

MORK, T.; TOLLERSRUD, T.; KVITILE, B. et al. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. **Vet Microbiol**, v. 106, n. 3-4, p. 265-73, Apr 10 2005.

NAPP, M.; GUMBEL, D.; LANGE, J. et al. Significance and prevention of post-operative wound complications. **Hautarzt**, v. 65, n. 1, p. 26-31, Jan 2014.

NELSON, E. A. Venous leg ulcers. **Clin Evid** (Online), v. 2011, 2011.

NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. **J Clin Laser Med Surg**, v. 20, n. 6, p. 325-33, Dec 2002a.

_____. Effects of 810 nm laser irradiation on in vitro growth of bacteria: comparison of continuous wave and frequency modulated light. **Lasers Surg Med**, v. 31, n. 5, p. 343-51, 2002b.

_____. Effects of low-level laser therapy (LLL) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. **J Clin Laser Med Surg**, v. 21, n. 5, p. 283-90, Oct 2003.

O'NEILL, S. C.; BAKER, J. F.; ELLANTI, P. et al. Cervical epidural abscess following an Escherichia coli urinary tract infection. **BMJ Case Rep**, v. 2014, 2014.

OIEN, R. F.; AKESSON, N. Bacterial cultures, rapid strep test, and antibiotic treatment in infected hard-to-heal ulcers in primary care. **Scand J Prim Health Care**, v. 30, n. 4, p. 254-8, Dec 2012.

PAPAGEORGIOU, P.; KATSAMBAS, A.; CHU, A. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. **Br J Dermatol**, v. 142, n. 5, p. 973-8, May 2000.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXTER, G. D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**, v. 28 Suppl 1, p. S3-40, Aug 2010.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; RYAN, B. et al. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 5, p. 285-304, May 2011.

RAMAKANT, P.; VERMA, A. K.; MISRA, R. et al. Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? **Diabetologia**, v. 54, n. 1, p. 58-64, Jan 2011.

SHAHI, S. K.; SINGH, V. K.; KUMAR, A. Detection of Escherichia coli and associated beta-lactamases genes from diabetic foot ulcers by multiplex PCR and molecular modeling and docking of SHV-1, TEM-1, and OXA-1 beta-lactamases with clindamycin and piperacillin-tazobactam. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68234, 2013.

SHARKEY, S.; HUDAK, S.; HORN, S. D. et al. Leveraging certified nursing assistant documentation and knowledge to improve clinical decision making: the on-time quality improvement program to prevent pressure ulcers. **Adv Skin Wound Care**, v. 24, n. 4, p. 182-8; quiz 188-90, Apr 2011.

SIDDIQUI, A. R.; BERNSTEIN, J. M. Chronic wound infection: facts and controversies. **Clin Dermatol**, v. 28, n. 5, p. 519-26, Sep-Oct 2010.

SINGH, A.; HALDER, S.; MENON, G. R. et al. Meta-analysis of randomized controlled trials on hydrocolloid occlusive dressing versus conventional gauze dressing in the healing of chronic wounds. **Asian J Surg**, v. 27, n. 4, p. 326-32, Oct 2004.

SITUM, M.; KOLIC, M. [Atypical wounds: definition and classification]. **Acta Med Croatica**, v. 66 Suppl 1, p. 5-11, Oct 2012.

SILVA, E. C. B. F.; MACIEL, M. A. V.; DE MELO, F. L. et al. Staphylococcus aureus: aspectos biológicos e patogênicos **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb**, v. 52 n. 2, p. 169-172, 2007.

SOUSA, N. T.; GUIRRO, R. R.; SANTANA, H. F. et al. In vitro analysis of bacterial morphology by atomic force microscopy of low level laser therapy 660, 830 and 904 nm. **Photomed Laser Surg**, v. 30, n. 5, p. 281-5, May 2012.

STEFAN, M.; HRITCU, L.; MIHASAN, M. et al. Enhanced antibacterial effect of silver nanoparticles obtained by electrochemical synthesis in poly(amide-hydroxyurethane) media. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 4, p. 789-96, 2011.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 9, p. 1133-48, Sep 2009.

SUAREZ, C.; PENA, C.; GAVALDA, L. et al. Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection. **Int J Infect Dis**, v. 14 Suppl 3, p. e73-8, Sep 2010.

TARADAJ, J.; HALSKI, T.; KUCHARZEWSKI, M. et al. Effect of Laser Irradiation at Different Wavelengths (940, 808, and 658 nm) on Pressure Ulcer Healing: Results from a Clinical Study. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 960240, 2013.

TASCINI, C.; PIAGGESI, A.; TAGLIAFERRI, E. et al. Microbiology at first visit of moderate-to-severe diabetic foot infection with antimicrobial activity and a survey of quinolone monotherapy. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 94, n. 1, p. 133-9, Oct 2011.

TOUCHON, M.; HOEDE, C.; TENAILLON, O. et al. Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genet**, v. 5, n. 1, p. 344, Jan 2009.

VATANSEVER, F.; DE MELO, W. C.; AVCI, P. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS Microbiol Rev**, v. 37, n. 6, p. 955-89, Nov 2013.

VELAZQUEZ-MEZA, M. E. Staphylococcus aureus methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Publica Mex**, v. 47, n. 5, p. 381-7, Sep-Oct 2005.

WANG, S. H.; SUN, Z. L.; GUO, Y. J. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from foot ulcers in diabetic patients in a Chinese care hospital: risk factors for infection and prevalence. **J Med Microbiol**, v. 59, n. Pt 10, p. 1219-24, Oct 2010.

WHEELAND, R. G.; KORECK, A. Safety and Effectiveness of a New Blue Light Device for the Self-treatment of Mild-to-moderate Acne. **J Clin Aesthet Dermatol**, v. 5, n. 5, p. 25-31, May 2012.

WIDATALLA, A. H.; MAHADI, S. E.; SHAWER, M. A. et al. Diabetic foot infections with osteomyelitis: efficacy of combined surgical and medical treatment. **Diabet Foot Ankle**, v. 3, 2012.