

## AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA BILIRRUBINA MEDIANTE DIFERENTES FOTOEXPOSIÇÕES

Victória Martins Neves da Silva (IC) e Fernanda Barrinha Fernandes (Orientador)

**Apoio: PIBIC Mackpesquisa**

### RESUMO

A icterícia em decorrência da hiperbilirrubinemia é uma condição clínica muito prevalente em neonatos. O principal tratamento é a fototerapia, que consiste na exposição dos mesmos a uma fonte luminosa com intuito de gerar isômeros inativos da bilirrubina, a qual pode ser degradada por luzes de diferentes comprimentos de onda, como: *lasers* azul (405nm) e verde (532nm) e LEDs azul (405nm), infravermelha (940nm) e vermelha (640nm). O presente estudo teve como objetivo verificar o perfil de degradação da bilirrubina *in vitro* mediante a fotoexposição com diferentes luzes e tempos de exposição. A bilirrubina Direta e a Total foram quantificadas pelo analisador bioquímico semi-automático BS-120 nos tempos 0, 120, 150 e 180 minutos. Os resultados foram analisados no programa estatístico Prisma versão 5 de 2007, sendo consideradas diferenças estatisticamente significantes aquelas com  $p < 0,05$ . Através das fotoexposições, verificou-se que as maiores degradações ocorreram com o uso do *laser* azul e LED azul. Porém, dentre elas, a com maior degradação da bilirrubina indireta em menos tempo (quando comparada as demais luzes do presente estudo), comprovada *in vitro*, fora o *laser* azul, em 180min de fotoexposição, visto que, quando analisada e comparada com a do LED azul no T180min, houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se que a molécula de bilirrubina absorve melhor a luz visível entre 400 e 500nm do espectro eletromagnético, pois o *laser* e LED azul foram as únicas fontes luminosas utilizadas que se encontram exatamente nesta faixa de comprimento de onda e resultaram em melhor degradação da bilirrubina.

**Palavras-chave:** icterícia, fototerapia, bilirrubina.

### ABSTRACT

Jaundice due to hyperbilirubinemia is a very prevalent condition in neonates. The main treatment is phototherapy, which consists of exposing them to a light source in order to generate inactive isomer of bilirubin, which can be degraded by lights of different wavelengths, like: blue (405nm) and green (532nm) lasers and blue (405nm), infrared (945nm) and red (640 nm) LEDs. The present study was aimed to verify the degradation profile of bilirubin *in vitro* through the photoexposure with different lights and times of exposure. Direct and Total bilirubin were quantified by the BS-120 semi-automatic biochemical analyzer at 0, 120, 150 and 180 minutes. The results were analyzed in the statistical program Prisma version 5 of 2007, being considered statistically significant differences those with  $p < 0.05$ . Through the

photoexpositions, it was verified that the best degradations occurred with using blue laser and blue LED. However, among them, the one with the greatest degradation of indirect bilirubin, in less time, proven *in vitro* in the present study (comparing with the other lights used), was the blue laser, in 180min of photoexposure. That is because, when analyzed and bought with that of the blue LED in the T180min, there was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). It was concluded that the bilirubin molecule best absorbs visible light between 400 and 500nm of the electromagnetic spectrum, and the laser and blue LED were the only light sources used that are exactly in this wavelength range and resulted in better degradation of bilirubin.

**Keywords:** jaundice, phototherapy, bilirubin.

## 1. INTRODUÇÃO

A hiperbilirrubinemia se manifesta em cerca de 60 a 80% dos neonatos (CARVALHO, 2001; FERREIRA, 2013). Esta condição caracteriza-se pelo aumento dos níveis séricos de bilirrubina, especialmente a indireta. Este pigmento biliar é produto da degradação dos eritrócitos e em neonatos é considerada neurotóxica (FERREIRA, 2013; MREIHIL *et al.* 2015; RAMOS, 2002; SILVA; NASCIMENTO, 2006). O principal tratamento da icterícia neonatal é a fototerapia, na qual o neonato é exposto a um a fonte luminosa. Entretanto, a efetividade do tratamento depende de fatores como: irradiância da fonte luminosa, espectro da luz emitida, tempo de uso das lâmpadas, distância do neonato ao foco luminoso, área da superfície corporal exposta à luz e a concentração inicial de bilirrubina quantificada no sangue do neonato (FACCHINI, 2008; VIEIRA *et al.* 2004).

Dentre os tipos de aparelhos de fototerapias disponíveis em hospitais, encontram-se o convencional, *spot*, colchão de fibra ótica ou fototerapia com emissão de diodo. No Brasil, embora o aparelho mais utilizado seja o tipo *spot* halógeno (Bilispot®) (COLVERO; COLVERO; FIORI, 2005; SOUSA; OLIVEIRA; TREVISAN, 2012; VIEIRA *et al.* 2004) não existem recomendações quanto ao uso correto da fototerapia convencional para se obter a redução da bilirrubina indireta. Com isso, a qualidade da terapêutica pode ser comprometida, expondo os neonatos a riscos aumentados por meio de tratamentos ineficazes, como o uso da fototerapia do tipo *spot*, a qual pode causar hipertermia e queimaduras no neonato (MACHADO, 1999; SOUSA; OLIVEIRA; TREVISAN, 2012; VASCONCELOS; FERREIRA; BIANCHI, 2010; VIEIRA *et al.* 2004).

O emprego de fontes de luz de baixa potência, como luz emitida por diodo emissor de luz (LED - *Light Emitting Diode*) surgiu como uma inovação principalmente por não emitir calor, ter maior vida útil e menor custo em relação às outras modalidades de fototerapia, como o *laser* e o infravermelho (SIQUEIRA, 2009). Ademais, Maisels *et al.* (2007, apud MERITANO *et al.*, 2012) constataram que o uso de LED na fototerapia *in vitro* e *in vivo* é mais eficaz na fotodegradação da bilirrubina que a aplicação de luz com dispositivos convencionais. Para tanto, é imprescindível utilizar luzes que tenham o comprimento de onda ideal para que ocorra isomerização da bilirrubina de modo efetivo, o qual se encontra entre 400-500nm (MERITANO *et al.* 2012; SILVA; NASCIMENTO, 2006).

Deste modo, fora analisado no presente estudo o potencial de degradação da bilirrubina mediante a fotoexposições de luzes diferentes, sendo estas *laser* azul, *laser* verde, LED azul, LED infravermelho e LED vermelho, com o objetivo de verificar o perfil dedegradação da bilirrubina *in vitro*, comparando este conforme o comprimento de onda da luz e o tempo utilizados na fotoexposição.

## 1.1 Objetivo

### 1.2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial de degradação de bilirrubina utilizando luzes de diferentes comprimentos de onda. Os resultados foram comparados e analisados com o objetivo de definir a melhor terapia a ser empregada no tratamento da hiperbilirrubinemia neonatal.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- a) Verificar o potencial de degradação da bilirrubina utilizando *laser* azul;
- b) Verificar o potencial de degradação da bilirrubina utilizando LED azul;
- c) Verificar o potencial de degradação da bilirrubina utilizando LED infravermelho;
- d) Verificar o potencial de degradação da bilirrubina utilizando LED vermelho;
- e) Verificar o potencial de degradação da bilirrubina utilizando *laser* verde.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Dentre os tipos de fontes de luz elétrica encontram-se, principalmente, a luz fluorescente e a incandescente. As luzes fluorescentes brancas abrangem os comprimentos de onda de luz visível que condizem com a cor amarela até a vermelha do espectro (565-625nm). As lâmpadas incandescentes, por sua vez, concentram desde a cor laranja até a vermelha, bem como emitem infravermelho. Porém, nenhuma das duas fontes luminosas concentram a faixa do comprimento de onda equivalente a luz azul (LIBERMAN (1991 *apud* EDWARDS; TORCELLINI, 2002). Ademais, existe outro tipo de fonte elétrica luminosa conhecida como LED. Geralmente a luz é monocromática e sua cor varia conforme o material aditivo ao semicondutor utilizado. Sua vantagem, quando comparada a outros tipos fontes luminosas elétricas, é emitir luz de alta intensidade especificamente da faixa azul de luz visível (entre 450nm e 470nm) liberando menos calor. Portanto, pode ter uso terapêutico em humanos, especialmente no tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal, já que a luz que tem importante ação biológica situa-se entre os comprimentos de onda 290 até 770nm e a degradação da bilirrubina, por sua vez, ocorre entre os comprimentos de onda 400-500nm (luz visível azul) (HATHWAY, *et al.* 1992 *apud* EDWARDS; TORCELLINI, 2002; MERITANO *et al.* 2012; MREIHIL *e. al.* 2015; SILVA; NASCIMENTO, 2006; VASCONCELOS; FERREIRA; BIANCHI, 2010).

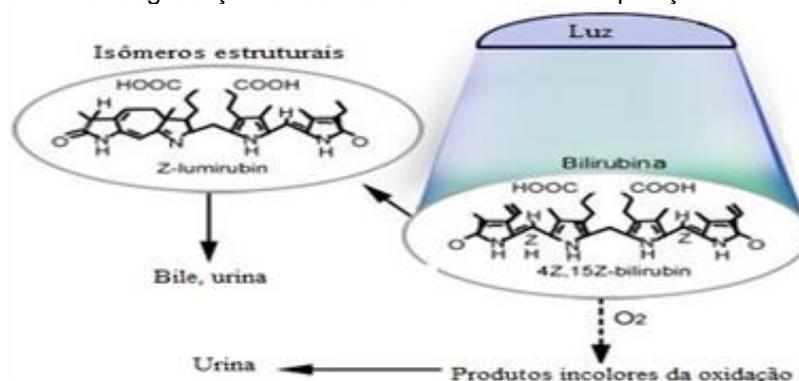
A Academia Americana de Pediatria define como fototerapia intensiva a qual irradia pelo menos  $30\text{uW}/(\text{cm}^2.\text{nm})$  de uma faixa de comprimento de onda entre 430-490nm (MERITANO *et al.* 2012). Existem alguns fatores primordiais que tem influência direta sobre a eficiência da fototerapia, são eles: o espectro da fonte de luz emitida, a intensidade luminosa (irradiância) da fonte luminosa, a interrupção (remoção ou bloqueio) do tratamento, área da superfície corporal do neonato exposta à luz, distância entre o neonato e a fonte de luz e

concentração inicial de bilirrubina (COLVERO; COLVERO; FIORI, 2005; FERREIRA, 2013; SILVA; NASCIMENTO, 2006; VASCONCELOS; FERREIRA; BIANCHI, 2010).

A molécula de bilirrubina absorve luz visível no comprimento de onda entre 400 e 500nm do espectro eletromagnético, com pico máximo em aproximadamente 460nm (CARVALHO, 2001; SILVA; NASCIMENTO, 2006). Portanto, todo e qualquer tipo de luz que seja capaz de emitir energia suficiente nesta faixa de comprimento de onda é, teoricamente, eficaz na fotodegradação da bilirrubina (MREIHIL *et. al.* 2015; RAMOS, 2002).

Conforme ilustrado na Figura 1, ao absorver luz (fóton), a bilirrubina IX-alfa (Z,Z), que é uma molécula lipossolúvel, sofre isomerização, ou seja, sua molécula se reestrutura através de uma rotação de 180°, alterando uma de suas ligações (isomerização conformacional tem como produtos: 4Z,15E; 4E,15Z; 4E,15E-bilirrubina) ou a molécula de bilirrubina forma novas ligações em sua estrutura original (isomerização estrutural produz: isômeros Z-lumirrubina; E-lumirrubina) (MREHIL *et. al.* 2015). Posteriormente, o produto formado na isomerização sofrerá oxidação, originando alguns fragmentos, os quais serão eliminados por via renal e, no caso do isômero estrutural, também poderá ser excretado através da bile (COLVERO; COLVERO; FIORI, 2005; RAMOS, 2002). Ou seja, a estrutura da bilirrubina é alterada pela exposição à luz permitindo assim que os foto-produtos sejam eliminados via renal ou hepática. Sendo assim, o mecanismo de ação básico da fototerapia neste caso é a utilização de energia luminosa na transformação da bilirrubina em produtos mais hidrossolúveis (CARVALHO, 2001). Baseando-se neste princípio, diferentes tipos de fontes de luz têm sido utilizados em fototerapias, tais como: lâmpadas fluorescentes brancas (*daylight*) e azuis, luz monocromática azul (*special blue*), lâmpadas halógenase e LEDs azuis (CARVALHO, 2001; FERREIRA, 2013). No caso do Brasil, o mais utilizado é o aparelho tipo *spot* halógeno (Bilispot®) (SOUSA; OLIVEIRA; TREVISAN, 2012; VIEIRA *et al.* 2004).

Figura 1 – Mecanismo de degradação da bilirrubina mediante fotoexposição



Fonte: Adaptado de SAWYER, 2015.

Conforme Silva; Nascimento (2006), mesmo sendo um procedimento tecnicamente simples, a fototerapia ainda assim possui riscos de efeitos colaterais, tais como erupção

cutânea, queimadura, instabilidade térmica, problemas na retina, efeito sobre a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral, síndrome do bebê bronze, alterações comportamentais, entre outros, como efeitos sobre a relação bebê-família (SILVA; NASCIMENTO, 2006). Isto porquê, o neonato passa a maior parte do tempo sob o banho de luz, o qual é interrompido apenas para se alimentar e ser limpo.

Ademais, o uso intermitente da fototerapia se mostrou mais efetivo do que o seu uso contínuo. Isto porquê observou-se que é nas primeiras horas após iniciar cada período de exposição que ocorre a maior degradação da bilirrubina. Por isso e pelos possíveis efeitos colaterais que este tratamento pode demonstrar, a fototerapia deveria ser utilizada pelo menor tempo necessário no controle dos níveis séricos de bilirrubina, uma vez que a sua retirada definitiva deverá ser feita quando, após suspensão desta, o neonato continuar a apresentar queda da bilirrubinemia (SILVA; NASCIMENTO, 2006).

### 3. METODOLOGIA

Para determinar o poder de degradação das luzes utilizadas no presente estudo, se fez necessária a utilização de uma amostra biológica (soro) comercial, Serodo Plus® (Human®) cuja concentração das bilirrubinas Direta e Total são conhecidas. Este possui concentração das mesmas acima do valor de referência, ou seja, mimetizam uma hiperbilirrubinemia. Esta matriz biológica com o analito em questão, fora submetida a fotoexposição aos diferentes tipos de luz, sendo *laser* azul, LED azul, LED infravermelho, LED vermelho e *laser* verde; variando-se os tempos em zero, 120, 150 e 180 minutos. Os dispositivos emissores de luz foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Carlos José de Lima, da Universidade Anhembi Morumbi.

#### 3.1 Quantificação da bilirrubina

Para a quantificação da bilirrubina nas amostras, foi utilizada a metodologia colorimétrica de ponto final, na qual a bilirrubina forma um composto azocolorimétrico. A bilirrubina foi, portanto, quantificada por diazotização e formação de um azocomposto de cor vermelha com absorção máxima em 546nm, dentre a faixa de 540-560nm. Este método, proposto pelos kits de Bilirrubina Auto Direta® e Bilirrubina Auto Total®, da DIALAB®, fora adaptado para a utilização do controle de qualidade Serodo Plus® (o qual fora utilizado como amostra *in vitro*). Por se tratar de kits com metodologias diferentes, para a determinação dos intervalos aceitáveis (range) e validação da metodologia e controle de qualidade, construiu-se o gráfico de *Levey-Jennings* através da quantificação de 30 corridas analíticas com cada frasco de Serodo Plus® reconstituído.

Após a análise destes resultados obtidos, calculou-se a média e desvio padrão (DP) e o critério de aceitação do controle de qualidade de interno estabelecido fora o intervalo de 2DP acima ou abaixo da média para cada experimento realizado (MOTTA, 2009).

Por ser um soro controle universal liofilizado preparado a partir de soro humano, o Serodo Plus® permite, portanto, a comparação *in vitro* da determinação de bilirrubina em sangue de recém-nascidos ictericos.

Toda a mistura de reagentes e amostra, bem como a análise dos resultados (incluindo cálculo da bilirrubina indireta), fora realizada pelo analisador bioquímico semi-automático BS-120, Mindray®.

### 3.2 Fotoexposições

Todas as fotoexposições ocorreram em um ambiente completamente isento de luz, a 19°C, com as amostras sobre uma estante de tubos de congelamento e a luz presa à uma garra e suporte universal, dentro de caixas de isopor.

As amostras foram colocadas a 1cm de distância da luz e os tempos de exposição foram: zero T0, T120, T150 e T180 minutos, sendo que, o último tempo fora realizado apenas para o *laser* azul e o LED azul. Ademais, para a lâmpada LED vermelha os tempos de fotoexposição foram apenas zero e 120 minutos.

As luzes utilizadas, então, para as fotoexposições foram o *laser* azul - o qual emite comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 405nm e de potência mensurada indicando 100mW; o LED azul ( $\lambda = 405\text{nm}$  e de  $P = 23\text{mW}$ , respectivamente); o LED infravermelho (IV), o qual emite comprimento de onda de 940nm e de potência mensurada igual a 126mW; dispositivo LED vermelho ( $\lambda = 640\text{nm}$  e  $P = 77\text{mW}$ ); e, por fim, o *laser* verde ( $\lambda = 532\text{nm}$  e  $P = 47\text{mW}$ ).

As pilhas dos *lasers* verde e azul foram trocadas a cada 1h, evitando, com isso, queda da potência luminosa incida sobre a amostra. Já os demais dispositivos foram eletricamente alimentados a uma fonte elétrica de tensão, a qual conectavam-se em tomada 110Volts.

A temperatura da amostra foi monitorada utilizando um termômetro com sonda térmica em miniatura durante as fotoexposições utilizando os LEDs vermelho e infravermelho. Isto ocorreu para confirmar a hipótese de aquecimento da amostra e, portanto, provável concentração da mesma, expressa nos resultados obtidos.

### 3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico Prisma versão 5 de 2007. Para comparação das variáveis numéricas entre os grupos, realizou-se o teste t para comparação

de duas variáveis, ANOVA para mais de duas variáveis e o teste Tukey com utilização de nível de significância alfa igual 0,05 (intervalo de confiança de 95%). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes aquelas com  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

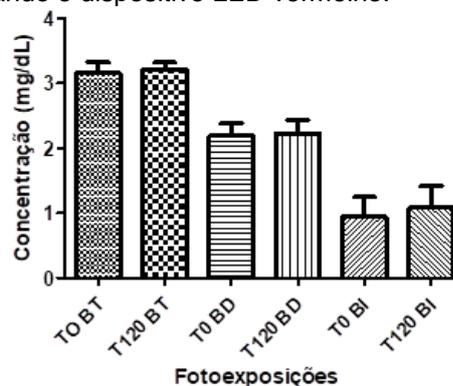
Dentre os resultados obtidos, analisou-se tanto a bilirrubina total (BT), como a direta (BD) e a indireta (BI). Porém, para o presente estudo, os valores de maior significância são referentes a bilirrubina indireta, já que o aumento desta é a principal causa da hiperbilirrubinemia neonatal.

Para todas as fotoexposições, a análise estatística fora realizada entre cada um dos diferentes tempos e comparando os valores obtidos separadamente para cada analito (por exemplo, apenas para BT: T0 x T120 ; T0 x T150; T120 x T150).

##### 4.1 LED vermelho

Os resultados obtidos após a foto-exposição utilizando o dispositivo LED vermelho demonstraram que não há degradação estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) das bilirrubinas total, direta e indireta após a exposição com esta luz. Numericamente, os valores de concentração após a foto-exposição de 120 minutos (LED vermelho 120) foram maiores que no tempo zero (LED vermelho 0) apesar de não estatisticamente significativa. Isto poderia ser explicado pelo fato da emissão se tratar de radiação vermelha, o que justifica fisicamente o aumento de temperatura do meio submetido, resultando na evaporação de solvente e, com isso, a amostra poderia ter sido concentrada. Estes resultados persistiram mesmo com a fotoexposição sendo realizada em gelo (Figura 2).

Figura 2 – Fotoexposição utilizando o dispositivo LED vermelho.



Fonte: Autoria própria.

Portanto, esta análise limitou-se à 120min, já que os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento da hiperbilirrubinemia. O aquecimento pode ser comprovado através da utilização de um termômetro com sonda térmica em miniatura. Utilizando este, mensurou-se a temperatura da amostra no início,

durante e ao final do experimento. Esta amostra estava armazenada em tubos de congelamento devidamente cortados, apoiados em estante plástica, dentro de caixa de isopor, a 19°C. Esta condição fora exatamente a mesma de todas as outras fotoexposições, independente da fonte luminosa utilizada. Porém, ao verificar a probabilidade de aquecimento da amostra, a fotoexposição utilizando o LED vermelho fora realizada também com o tubo imerso em gelo, com o objetivo de evitar a evaporação do solvente e concentração da amostra. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Temperaturas da amostra durante fotoexposição utilizando LED Vermelho

Tempo (minutos)	Fotoexposição sem gelo	Fotoexposição com gelo
	Temperatura (°C)	
T0min	18.4°C	12.0°C
T20min	-	3.6°C
T60min	21.2°C	5.6°C
T120min	22.5°C	8.9°C
$\Delta T$	4,1°C	5,3°C

$\Delta T$ : Variação de temperatura (T120-T0) e (T120-T20), respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

A temperatura no tempo de 20min fora mensurada apenas na fotoexposição com gelo, pois suspeitava-se que, após algum tempo da amostra em contato com o gelo, a temperatura do líquido diminuiria. Com isso, através do cálculo da variação da temperatura representada pelo ( $\Delta T = T120 - T20$ ), confirmou-se, portanto, o aumento da temperatura durante a fotoexposição.

Ademais, não há descrito na literatura experimentos, tampouco práticas clínicas utilizando o LED vermelho para tratamento de hiperbilirrubinemia neonatal. A mesma foi utilizada no presente trabalho como teste, já que existe apenas o uso desta luz para tratamentos cutâneos anti-inflamatórios. Este tratamento baseia-se no fato de que a luz vermelha apresenta uma profundidade limitada junto aos tecidos e influencia a liberação de citocinas dos macrófagos e outras células (PASCHOAL; ISMAEL, 2010).

#### 4.2 LED infravermelho (IV)

A análise dos resultados do LED infravermelho foi muito similar aos resultados obtidos com o LED vermelho, já que as concentrações de BT e BD no tempo de 120min de fotoexposição (T120) e o de BI no T150, foram maiores que no T0. E, por isso, houve diferença estatística significativa, com exceção da comparação entre os resultados obtidos da BD no T120 e T150, que não tiveram diferença estatística significativa (Figura 3). Porém, como os valores de IV T120 BI (quantificação após a fotoexposição de 120min) estavam abaixo do IV T0 BI aproximadamente 8,7%, realizou-se o cálculo para verificar quanto tempo seria necessário para degradar 100% a BI, tendo como resultado 23h. Este tempo de fotoexposição, para o presente estudo era inviável. Ademais, não teria comparação clínica, já

que não há descrito em literatura estudos realizados *in vivo* ou práticas clínicas utilizando LED infravermelho para fototerapia neonatal (apenas uso de filtros para irradiação infravermelha na fototerapia *bilispot*) (MOREIRA; LOPES; CARVALHO, 2004)

Para verificar se o perfil de degradação se manteria, realizou-se o tempo de fotoexposição de 150min. Porém, os resultados se assemelharam novamente a exposição anterior. Tal como no dispositivo LED vermelho, a provável hipótese seria um aquecimento da amostra pelo aumento do tempo de exposição com relação ao emissor de radiação. Isto se confirmou através de medidas da temperatura realizadas na amostra, com um termômetro com sonda térmica em miniatura. Os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Temperaturas da amostra durante fotoexposição utilizando LED Infravermelho.

Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
T0min	15.6°C
T75min	25.4°C
T120min	26.0°C
T150min	27.8°C
$\Delta T$	12,2°C

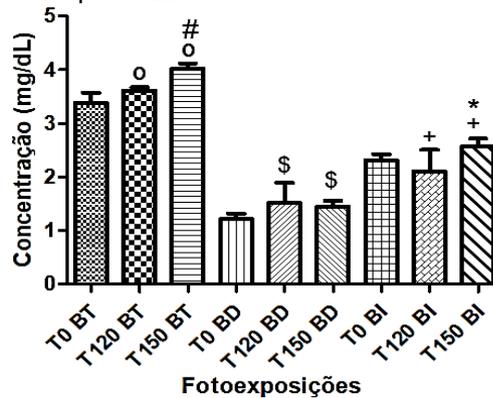
$\Delta T$ : Variação de temperatura (T150-T0).

Fonte: Autoria própria.

Ao refletir no tempo o qual o neonato fica sob a fotoexposição, as 23h citadas anteriormente não seria um empecilho, já que não existe um limite preciso para cada sessão de fototerapia (SILVA; NASCIMENTO, 2006), mas o convencional e intensivo ocorre “continuamente por pelo menos 48 horas (máximo de 72 horas; média intensiva = 58 horas, convencional = 61 horas), exceto durante alimentação, limpeza e coletas” (AYCICEK *et al.* 2008).

Porém, deve-se analisar a resistência desta lâmpada para que esta não seja suficiente para superaquecer o neonato, já que, dentre os efeitos adversos observados em neonatos, encontra-se o *rash* cutâneo e a instabilidade térmica (MARTINS *et al.*, 2007). Ademais, não há descrito em literatura a utilização de LED IV como tratamento da icterícia neonatal, apenas uso desta na área de fisioterapia, “sendo utilizadas em tratamentos fototerápicos tanto de doenças crônicas (artrites e tendinites) como em traumatismos” (LOW; REED, 1995 *apud* SCHMIDT *et al.*, 2006).

Figura 3 – Fotoexposição com a lâmpada LED IV.



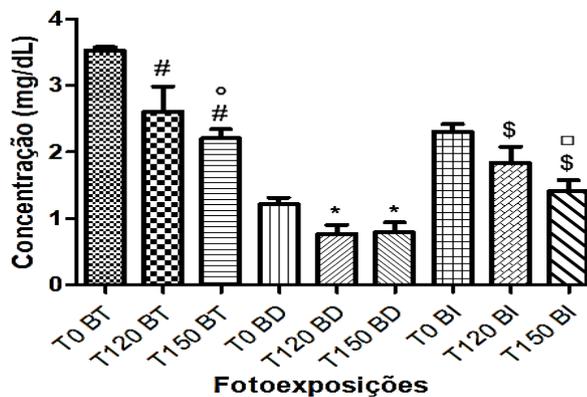
Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa. Para BT: (°) em relação ao T0; (#) em relação ao T120. Para BD: (\$) em relação ao T0. Para BI: (+) em relação ao T0; (\*) em relação ao T120.

Fonte: Autoria própria

#### 4.2 Laser verde

Todos os resultados demonstraram que o *laser* verde degrada a bilirrubina por apresentar diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), exceto a BD dos tempos 120 e 150min. Em 120min, a degradação da BI fora cerca de 20%, enquanto em 150min foi aproximadamente 38,6%. Ao realizar o cálculo para verificar quanto tempo seria necessário para degradar 100% a BI, encontrou-se como tempo aproximadamente 10h. Este tempo de fotoexposição, para o presente estudo, era inviável (Figura 4).

Figura 4 – Fotoexposição com o *laser* verde



Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa. Para BT: (#) em relação ao T0; (°) em relação ao T120. Para BD: (\*) em relação ao T0. Para BI: (\$) em relação ao T0; (□) em relação ao T120.

Autoria própria.

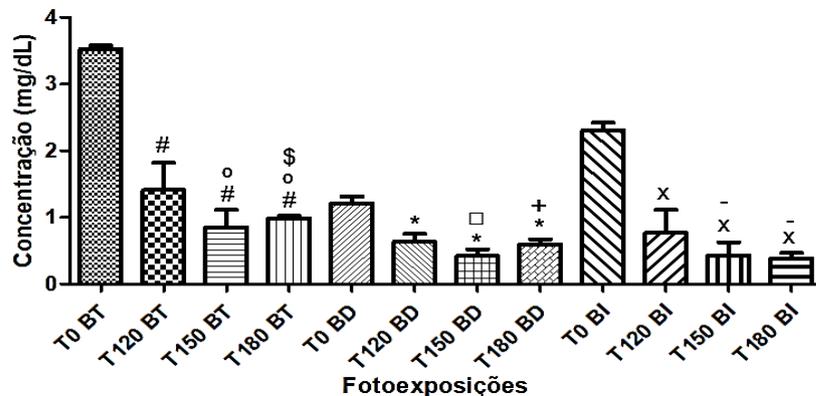
Não há descrito em literatura estudos realizados *in vivo* ou práticas clínicas utilizando o *laser* verde para fototerapia neonatal. Ademais, por mais que tenha demonstrado degradação da bilirrubina, não são resultados vantajosos em relação ao LED e *laser* azul do presente estudo, uma vez que estes demonstraram maior e mais efetiva degradação no mesmos tempos do *laser* verde (120 e 150min).

### 4.3 LED azul

Dentre os resultados obtidos através da fotoexposição utilizando o LED azul, os únicos que não obtiveram diferença estatística significativa foram as comparações entre BT nos tempos 150 e 180min, BD 120 e 180min e BI nos tempos 150 e 180min. Os demais valores estavam  $p < 0,05$ , demonstrando, com isso, diferença estatisticamente significativa.

Neste caso, fora realizada uma fotoexposição a mais, sendo esta de 180min, pois ao verificar que, em 120min fora degradado aproximadamente 66,6% de BI, realizou-se o cálculo para totalizar o processo de fotodegradação e o tempo estimado fora 180min. Porém, a degradação da BI nos tempos 150min e 180min fora, respectivamente, 81,43% e 83,13%. Ademais, não fora observada diferença significativa estatisticamente, como citado acima ( $p > 0,05$ ), indicando que, por mais que a degradação da bilirrubina seja eficiente utilizando o comprimento de onda ideal descrito em literatura, provavelmente não seja linear. Os resultados foram comparados entre si para o mesmo analito e podem ser observados na Figura 5.

Figura 5 – Fotoexposição a partir do LED azul.



Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa. Para BT: (#) em relação ao T0; (°) em relação ao T120; (\$) em relação ao T150. Para BD: (\*) em relação ao T0; (□) em relação ao T120; (+) em relação ao T150. Para BI: (x) em relação ao T0; (-) em relação ao T120.

Fonte: Autoria própria

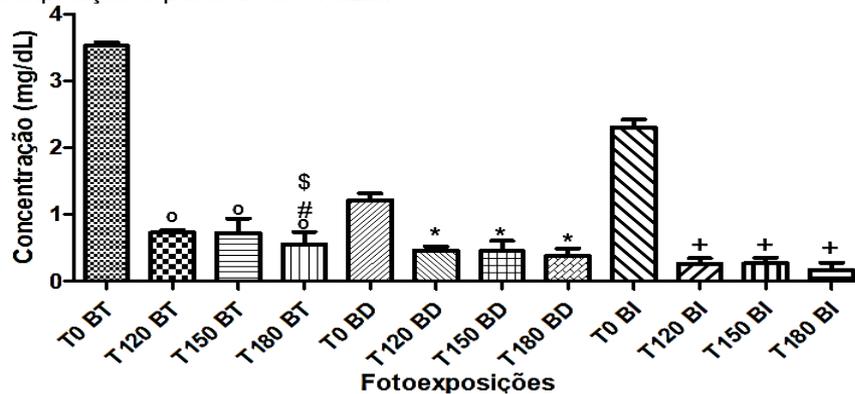
### 4.4 Laser azul

A concentração de BT, BD e BI diminuiu nos tempos T120, T150 e T180 em relação a T0 ( $p < 0,05$ ). Dentre todas as fotoexposições, o *laser* azul fora único que apresentou todos os resultados de BD e BI entre os tempos de fotoexposição 120, 150 e 180 min que não houve diferença significativa estatisticamente ( $p > 0,05$ ). Comparando o *laser* e o LED para a banda de emissão do azul, acredita-se que estas são as mesmas. O que os difere de fato, é que no *laser*, a luz apresenta um comportamento diferente, ou seja, indo pela abordagem da mecânica quântica, os fótons emitidos são coerentes no tempo e espaço. Porém, isto não ocorre no caso do LED, já que neste dispositivo cada fóton oscila em um modo diferente. O

fato de apresentarem resultados semelhantes da degradação da bilirrubina, provavelmente seja por serem sistemas que emitem comprimentos de onda muito próximos (Figura 6).

Tal como para o LED azul, ao realizar os cálculos para estimar uma degradação de 100% da bilirrubina através da fotoexposição do *laser* azul, o resultado aproximou-se de 180min. Por isso, então, com este dispositivo também fora feito a exposição de 180min.

Figura 6 – Fotoexposição a partir do *laser* azul.



Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa. Para BT: (°) em relação ao T0; (#) em relação ao T120; (\$) em relação ao T150. Para BD: (\*) em relação ao T0. Para BI: (+) em relação ao T0.

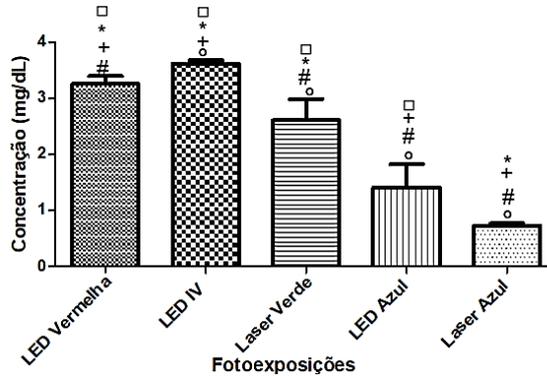
Fonte: Autoria própria

#### 4.5 Comparação entre os resultados:

##### 4.5.1 Fotoexposição – 120 minutos

Dentre os resultados obtidos através das fotoexposições utilizando os diferentes tipos de fontes luminosas, no tempo de 120min, todos da BT obtiveram diferença estatisticamente significativa quando comparados entre si ( $p < 0,05$ ) (Figura 7). Ou seja, ao analisar individualmente a BT, pode-se inferir que há distinção no uso dos diferentes dispositivos de luz para a fototerapia, sendo que o responsável por atingir a menor concentração de BT, fora o *laser* azul.

Figura 7 – Comparação entre os resultados obtidos no tempo 120min das diferentes fotoexposições para BT.

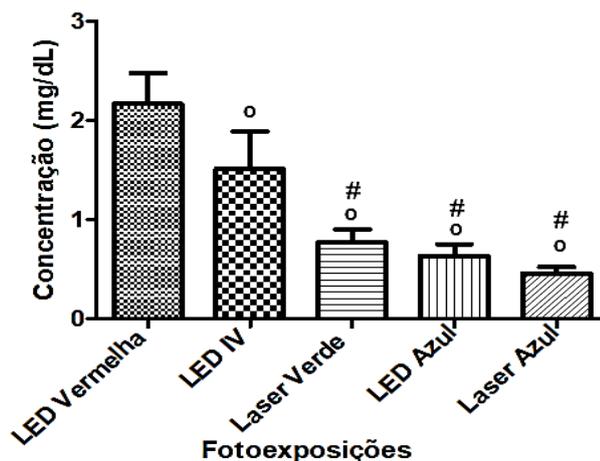


Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa, sendo que todos obtiveram diferença estatisticamente significativa entre si. (°) em relação ao LED vermelho; (#) em relação ao LED IV; (+) em relação ao *laser* verde; (\*) em relação ao LED azul; (□) em relação ao *laser* azul.

Fonte: Autoria própria.

Quanto a BD, os resultados entre o LED azul e o *laser* azul; LED azul e *laser* verde; *laser* verde e *laser* azul, foram os únicos que não obtiveram diferença estatística entre si. Os demais valores demonstraram  $p < 0,05$  (Figura 8). Com isso, pode-se inferir que se a bilirrubina de maior interesse a ser degradada fosse a BD, no tempo de 120min, poderia não haver diferença ao escolher o dispositivo de fototerapia *laser* verde, LED azul ou *laser* azul. Porém, ao observar separadamente as concentrações, encontra-se a menor concentração alcançada através do *laser* azul.

Figura 8 - Comparação entre os resultados obtidos no tempo 120min das diferentes fotoexposições para BD.

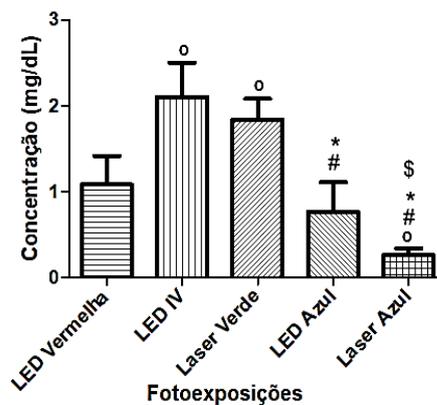


Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa, sendo que todos obtiveram diferença estatisticamente significativa entre si. (°) em relação ao LED vermelho; (#) em relação ao LED IV; (+) em relação ao *laser* verde; (\*) em relação ao LED azul; (□) em relação ao *laser* azul.

Fonte: Autoria própria

Para BI, os resultados entre LED azul e LED vermelha; LED IV e *laser* verde foram os únicos que não obtiveram diferença estatística entre si. Os demais valores demonstraram  $p < 0,05$  (Figura 9). Ou seja, analisando a significância para a fototerapia neonatal, no tempo de 120min, a BI é a qual deve ser melhor analisada e dada maior importância, uma vez que esta é lipossolúvel e pode causar neurotoxicidade. E, diferentemente dos resultados obtidos para BD em relação aos *lasers* azul e verde e LED azul, no caso da BI pode-se observar  $p < 0,05$ , sendo a concentração menor alcançada através da fotoexposição do *laser* azul, conforme ocorreu também com a BT.

Figura 9 - Comparação entre os resultados obtidos no tempo 120min das diferentes fotoexposições para BI.



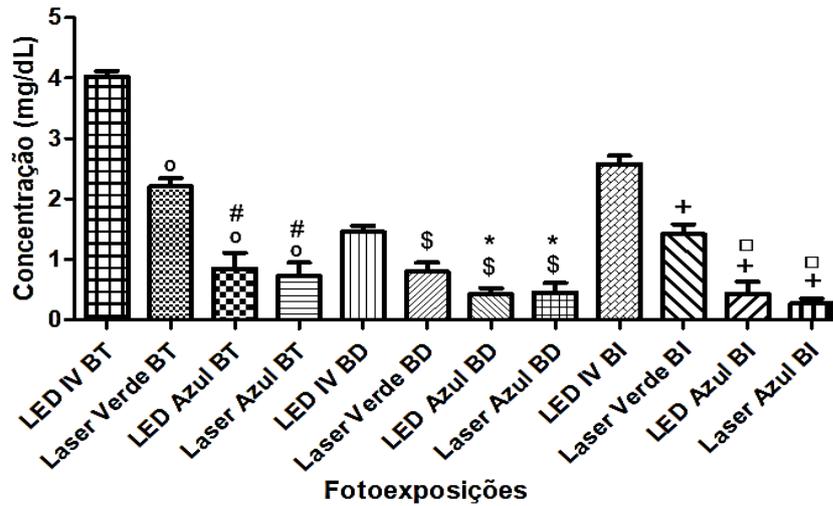
Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa, (°) em relação ao LED vermelho; (#) em relação ao LED IV; (\*) em relação ao *laser* verde; (\$) em relação ao LED azul.

Fonte: Autoria própria

#### 4.5.2 Fotoexposição – 150 minutos

Ao analisar a BT, BD e BI, comparando os resultados entre si de cada fotoexposição, verificou-se que praticamente todas as lâmpadas diferem-se de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), exceto o *laser* azul e LED azul (Figura 10). A partir deste resultado, portanto, pode-se inferir que, por mais que outros comprimentos de onda fora da faixa ideal para degradar a bilirrubina (400-500nm), como no caso do *laser* verde (532nm), por vezes não demonstrou diferença estatisticamente significativa com o *laser* e LED azul, é um equívoco pensar que a degradação utilizando o *laser* verde seria tão eficaz quanto com o uso de *laser* e LED azul.

Figura 10 – Comparação entre os resultados obtidos no tempo 150min das diferentes fotoexposições.



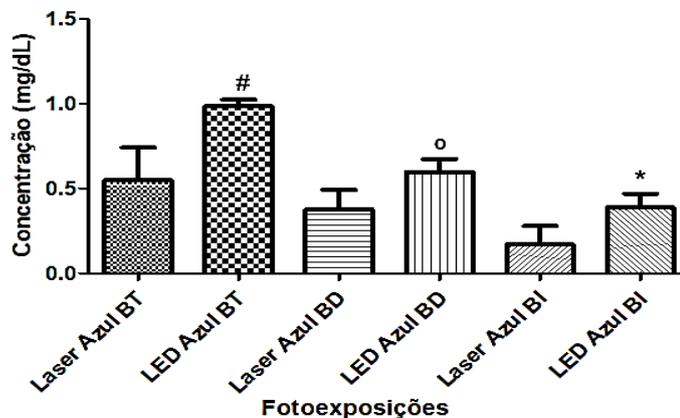
Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa. Para BT: (o) em relação ao LED IV; (#) em relação ao Laser verde. Para BD: (\$) em relação ao LED IV; (\*) em relação ao Laser verde. Para BI: (+) em relação ao LED IV; (□) em relação ao Laser verde.

Fonte: Autoria própria

#### 4.6.3 Fotoexposição – 180 minutos

Por fim, o resultado conclusivo que pode ser comprovado através desta última análise, é que a fonte emissora de luz com maior potencial de degradação de bilirrubina indireta, no presente estudo foi o laser azul. Isto porquê, mesmo que nos tempos 120min e 150min o LED azul obtenha um perfil de degradação muito semelhante ao laser azul (já que o valor de  $p > 0,05$ , ou seja, não houve diferença estatisticamente significativa), este provável padrão fora quebrado ao verificar o potencial de degradação destas luzes no tempo de 180min, pois houve diferença estatisticamente significativa tanto na BT, como na BD e BI, sendo que as menores concentrações encontradas eram referentes a fotoexposição realizada com o laser azul (Figura 11).

Figura 11 - Comparação entre os resultados obtidos no tempo 180min entre o laser e LED azul .



Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa. Para BT: (#) em relação ao laser azul,  $p = 0,0002$ . Para BD: (o) em relação ao laser azul,  $p = 0,0017$ . Para BI: (\*) em relação ao laser azul,  $p = 0,0014$ .

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar os resultados obtidos *in vitro* no presente trabalho com o que é utilizado em fototerapia *in vivo*, serão realizadas algumas considerações.

Não há descrito em literatura o uso de fontes emissoras com outros comprimentos de onda para tratamento da icterícia neonatal, se não a azul ou branca. Entretanto, os tipos de aparelhos de fototerapia existentes no mercado são variados e utilizam diferentes fontes de luz, tais como lâmpada fluorescente, lâmpada halógena e *Light Emitting Diode* (LED). Sendo que, a utilização de Super LED demonstrou menor tempo de tratamento e maior eficácia quando comparado a fototerapia halógena (MARTINS *et al*, 2007). Porém, quanto ao *laser* azul, não há registros de seu uso no tratamento da icterícia neonatal. Neste sentido, uma opção de inovação na fototerapia seria a irradiação por todo o corpo do neonato, utilizando o *laser* azul, através de um mecanismo de varredura. Com isso, a região próxima aos olhos seria evitada enquanto o feixe *laser* percorresse apenas o corpo do neonato. Ainda assim, se faz necessária a proteção adaptada aos olhos. Porém, o risco de ocorrer algum evento adverso se torna menor.

O presente estudo, portanto, confirmou *in vitro* que, ao utilizar o comprimento de onda adequado para a degradação da bilirrubina, sendo este entre 400 e 500nm do espectro eletromagnético (MERITANO *et al.* 2012; SILVA; NASCIMENTO, 2006), pode-se obter a queda da concentração de bilirrubina em um menor tempo de fotoexposição. Isto porquê, o perfil de maior degradação da bilirrubina em um menor tempo (quando comparada aos demais dispositivos emissores de luz utilizadas nesta pesquisa), fora observado através das fotoexposições com o *laser* azul (405nm) e LED azul (380nm).

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ao analisar os resultados de degradação da bilirrubina obtidos pelos dispositivos emissores de luz LED vermelha e LED IV, pode-se inferir que não são opções viáveis para a utilização na fototerapia neonatal, já que, devido ao provável aquecimento visto pela concentração e evaporação do solvente, esta fonte luminosa poderia aumentar os riscos de queimadura e instabilidade térmica, sendo, portanto, inviável para o tratamento de icterícia. Além disso o LED IV não se mostrou tão eficaz na degradação da bilirrubina, já que, após 120min de exposição, a BI decaiu apenas aproximadamente 8,7% e demonstrou um provável platô com relação ao T 150min. Ademais, o coeficiente de absorção óptica da própria bilirrubina para as faixas desde o vermelho até o infra próximo, é bem menos em comparação a banda de azul.

O *laser* verde, por sua vez, demonstrou um perfil de degradação da bilirrubina significante. Porém, a degradação é mais lenta. Ademais, quando comparado ao *laser* azul e LED azul, a concentração da BD no T 120min não diminuiu significativamente, já os valores

de BI destas três luzes, no T 120min diminuiu significativamente. Ou seja, mesmo que a degradação da bilirrubina seja maior do que dos dispositivos emissores LED vermelha e IV, ainda assim não apresenta vantagem para uso na fototerapia neonatal.

As maiores degradações de bilirrubina em um menor espaço de tempo foram obtidas através das fotoexposições com o *laser* azul e LED azul em 180min. Ademais, especialmente quanto a degradação da BI nos tempos 150 e 180 minutos, tanto no *laser* azul quanto no LED azul, fora observado um provável platô. Porém, especificamente no *laser* azul, este perfil de platô fora observado entre os tempos 120min e 150min, 120 e 180min, 150 e 180min (todas as análises não apresentaram diferença estatisticamente significativa). Ou seja, talvez, ao utilizar o *laser* azul, possa se obter um resultado de degradação da bilirrubina maior em um menor tempo.

Ao refletir quanto ao tratamento realizado em neonatos, é provável que, com estes emissores de luz (especialmente o *laser* azul, o qual demonstrou maior potencial de degradação da bilirrubina indireta) o tempo de fotoexposição poderia ser menor e, com isso, os riscos nocivos ao bebê também diminuiriam, bem como a relação bebê-família poderia se tornar melhor. Portanto, considerando os resultados obtidos, merece destaque a possibilidade de que o *laser* azul seja futuramente utilizado como um novo meio de fototerapia no tratamento da icterícia neonatal. Isto porquê, *in vitro*, demonstrou maior eficácia na degradação da bilirrubina em um menor período de tempo quando comparado as demais lâmpadas utilizadas no presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- AYCICEK, A. et al. Fototerapia causa danos ao DNA de leucócitos mononucleares periféricos em recém-nascidos a termo. **Jornal de Pediatria (Rio J)**, 84(2):141-146, 2008. Disponível em: <<http://www.jped.com.br/conteudo/08-84-02-141/port.asp>>. Acesso em: 22 jun 2018.
- CARVALHO, M. Tratamento da icterícia neonatal. **Jornal de Pediatria (Rio J)**, v. 77, n. Supl 1, 2001. Disponível em: <<http://www.jped.com.br/conteudo/01-77-s71/port.pdf>>. Acesso em: 27 de set de 2016.
- COLVERO, A. P.; COLVERO, M. O.; FIORI, R. M. Módulo de ensino: fototerapia. **Scientia Medica**. Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 2, 2005. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/viewFile/1550/7974>>. Acesso em: 23 de jan de 2016.
- EDWARDS, L.; TORCELLINI, P. **A literature review of the effects of natural light on building occupants**. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2002. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy02osti/30769.pdf>>. Acesso em: 23 de jan de 2016.
- FACCHINI, F. P. Proposta de padronização para aferição de equipamentos de fototerapia. **Jornal de Pediatria**. Rio Janeiro, v. 77, n. 2, mar./abr., 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jped/v77n2/v77n2a04>>. Acesso em 13 de mar de 2017.

FERREIRA, G. R. **Caracterização física e química e controle cinético do efeito da luz azul em polímeros luminescentes**: aplicação no desenvolvimento de sensores de radiação para uso em fototerapia neonatal. Ouro Preto, 2013. Disponível em: <[http://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3897/1/TESE\\_Caracteriza%C3%A7%C3%A3oF%C3%ADsicaQu%C3%ADmica.pdf](http://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3897/1/TESE_Caracteriza%C3%A7%C3%A3oF%C3%ADsicaQu%C3%ADmica.pdf)>. Acesso em: 22 de jan de 2017. MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v23n2/2124.pdf>>. Acesso em: 20 de jan de 2017.

MARTINELLI, A. L. C. Icterícia. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 37, n. 3/4, p. 246252, 2004. Disponível em: <[http://revista.fmrp.usp.br/2004/vol37n3e4/6\\_ictericia.pdf](http://revista.fmrp.usp.br/2004/vol37n3e4/6_ictericia.pdf)>. Acesso em: 27 de set se 2016.

MARTINS, Bianca M. R. et al. Avaliação da eficácia clínica de uma nova modalidade de fototerapia utilizando diodos emissores de luz. **Jornal de Pediatria (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 83, n. 3, p. 253-258, jun 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0021-75572007000400011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572007000400011&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 22 jun 2018.

MERITANO, D. J. et al Comparación de la eficacia de la fototerapia convencional con tubos de luz azul vs. LEDs. **Revista Hospital Maternidade Infantil Ramón Sardá**, v. 31, n. 2, p. 57-62, 2012. Disponível em: <<http://www.sarda.org.ar/content/download/1082/7958/file/57-62+Meritano.LEDS.pdf>>. Acesso em: 19 de jan de 2017.

MOREIRA, M. E. L.; LOPES, J. M. A.; CARVALHO, M. **O recém-nascido de alto risco: teoria e prática do cuidar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 564 p. ISBN 85-7541-054-7. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/wcgvd/pdf/moreira-9788575412374-14.pdf>>. Acesso em: 30 de set de 2018.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. Editora: Médica Massau, 2000. Disponível em: <<http://www.laboratoriocentral.com.br/wp-content/uploads/2010/08/Bioq.Clinica-Enzimas.pdf>>. Acesso em: 09 de fev de 2017.

MREIHIL, K. et al. Early formation of bilirubin isomers during phototherapy for neonatal jaundice: effects of single vs. double fluorescent lamps vs. photodiodes. **Pediatric research**, v. 78, n. 1, p. 56-62, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/pr/journal/v78/n1/abs/pr201561a.html>>. Acesso em: 24 de out de 2016.

PASCHOAL, F. M.; ISMAEL, A. P. P. B. A ação da luz no tratamento da acne vulgar. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 2, 2010. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/2655/265521080008/>>. Acesso em: 17 jul 2018.

RAMOS, J. L. A. Icterícia do recém-nascido: aspectos atuais. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**. ISSN eletrônico 1984-4840, v. 4, n. 1-2, p. 17-30, 2002. Disponível em: <[http://utineonatal.med.br/novo\\_site/pdf/pdf\\_arquivos/ictericia\\_neonatal/Art1\\_ictericia\\_neonatal.pdf](http://utineonatal.med.br/novo_site/pdf/pdf_arquivos/ictericia_neonatal/Art1_ictericia_neonatal.pdf)>. Acesso em: 23 de jan de 2017.

SAWYER, T. L. Phototherapy for Jaundice. **Medscape**. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1894477-overview#a1>>. Acesso em: 17 de jan de 2017.

SCHMIDT, E. M. M. et al. Caracterização de fonte de radiação infravermelha aplicada a fototerapia. **X INIC Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, p. 244-6, 2006.

Disponível em: <

[http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2006/inic/inic/07/Engenharias%20Inic%20X006\\_ok.pdf](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2006/inic/inic/07/Engenharias%20Inic%20X006_ok.pdf)  
>. Acesso em: 17 jul 2018.

SILVA, M. P. G.; NASCIMENTO, M. J. P. Fototerapia no tratamento das hiperbilirrubinemias neonatais. **Revista de Enfermagem UNISA**, 7, p. 44-47. São Paulo: 2006. Disponível em: <<http://www.institutonsg.com.br/arquivos/download/7.pdf>>. Acesso em: 20 de jan de 2017.

SIQUEIRA, C. P. C. M. et al. Efeitos biológicos da luz: aplicação de terapia de baixa potência empregando LEDs (*Light Emitting Diode*) na cicatrização da úlcera venosa: relato de caso. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, n. 1, p. 37-46, 2009. Disponível em: <<file:///C:/Users/Cliente/Downloads/2898-9560-1-PB.pdf>>. Acesso em: 13 de mar de 2017.

SOUSA, A. C. A.; OLIVEIRA, J. R.; TREVISAN, J. A. **Fototerapia**: indicações e benefícios para recém-nascidos phototherapy. Disponível em: <[http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais\\_simposio/arquivos\\_up/documentos/artigos/e515f2ba33d89af999fbbffa3e85fbf5.pdf](http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais_simposio/arquivos_up/documentos/artigos/e515f2ba33d89af999fbbffa3e85fbf5.pdf)>. Acesso em: 13 de mar de 2017.

VASCONCELOS, C. K. B.; FERREIRA, G. R.; BIANCHI, R. F. Desenvolvimento e Caracterização de Sensor de Acúmulo de Dose de Radiação Azul Polimérico. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 14-18, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/po/v20n1/aop\\_pol\\_0496.pdf](http://www.scielo.br/pdf/po/v20n1/aop_pol_0496.pdf)>. Acesso em: 20 de jan de 2017.

VIEIRA, A. A. et. al. *O uso da fototerapia em recém-nascidos: avaliação da prática clínica*. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, 4 (4): 359-366, out. / dez., 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbsmi/v4n4/a04v04n4.pdf>>. Acesso em: 13 de mar de 2017.

**Contatos:** victoriamns@hotmail.com e fernanda.fernandes@mackenzie.br