

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

VANESSA FRANÇA PARDINHO

**TRANSMISSÃO DA ENERGIA DE TRÊS DIFERENTES COMPRIMENTOS DE
ONDA E FONTES DE LUZ DE UM DISPOSITIVO DISPONÍVEL
COMERCIALMENTE QUANDO UTILIZADOS DE MANEIRA ISOLADA OU
COMBINADA**

São Paulo, SP

2020

VANESSA FRANÇA PARDINHO

**TRANSMISSÃO DA ENERGIA DE TRÊS DIFERENTES COMPRIMENTOS DE
ONDA E FONTES DE LUZ DE UM DISPOSITIVO DISPONÍVEL
COMERCIALMENTE QUANDO UTILIZADOS DE MANEIRA ISOLADA OU
COMBINADA**

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Ernesto C. P.
Leal- Júnior

Coorientadora: Dra. Heliadora
Leão Casalechi

São Paulo, SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Pardinho, Vanessa França.

Transmissão da energia de três diferentes comprimentos de onda e fontes de luz de um dispositivo disponível comercialmente quando utilizados de maneira isolada ou combinada./ Vanessa França Pardinho. 2020.

36 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof. Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior..

Terapia de fotobiomodulação (TFBM). 2. Laser. 3. LED
Leal-Junior, Ernesto Cesar Pinto.. II. Título.

São Paulo, 31 de março de 2020.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): Vanessa França Pardiniho

Título da Dissertação: "Transmissão da Energia de Três Diferentes Comprimentos de Onda e Fontes de Luz de um Dispositivo Disponível Comercialmente Quando Utilizado de Maneira Isolada ou Combinada".

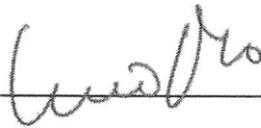
Presidente: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR _____



Membro: PROFA. DRA. KADMA KARÊNINA MONTEIRO _____



Membro: PROF. DR. LÚCIO FRIGO _____



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família,
em especial a minha filha Alice.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, e por estar comigo em todos os momentos, toda Honra e toda Glória para Ele.

Agradeço aos meus Pais, Shirley e Ronaldo, por sempre me incentivarem nos estudos e na vida, me mostrando o caminho correto a seguir, não poderia ter melhor exemplo do que vocês.

Agradeço a toda minha família e amigos, por sempre me apoiarem nos estudos, partilhando da minha alegria ao realizar esse sonho, em especial meu irmão Vinicius.

Agradeço ao meu marido Edinelson, por toda a paciência, carinho e amor e por estar do ao meu lado sempre, me apoiando e incentivando a cada dia e nossa filha Alice que veio para iluminar ainda mais nossos dias.

Agradeço a todos os colegas que fiz durante esse período de estudos por todos os momentos compartilhados de alegria, aprendizado, cumplicidade, obrigada por tornarem meus dias mais felizes.

Em especial agradeço a Laura, Bianca, Magali, Solange, Camila, Mayara, obrigada por tudo, aprendi muito com todas vocês.

Aos professores da Universidade Nove de Julho, pela disposição e ajuda durante esses dois anos de curso.

Agradeço em Especial a Dora, por toda a paciência, carinho e ensinamento durante esse tempo de curso, você é sensacional.

Obrigada professor Ernesto pelo conhecimento compartilhado.

RESUMO

Terapia de fotobiomodulação (TFBM) é o termo utilizado para aplicação de luz de baixa potência, sendo utilizada para diversos fins terapêuticos, promovendo regeneração tecidual, modulação da inflamação e alívio da dor há alguns anos. A intensidade dos efeitos biológicos depende do metabolismo celular e condição clínica tecidual antes da irradiação. A TFBM é aplicada em uma faixa de comprimento de 600 a 1000 nm. A maioria dos estudos é realizada *in vitro* ou *in vivo* em pele humana ou de animais e eventualmente combinadas com outros tipos de tecidos, com medidas de profundidade de penetração imediatas e perda de energia. Ainda faltam estudos que comparem o uso desses tipos de dispositivos, além de pesquisas relacionadas ao tempo de irradiação. Foi realizada o estudo da transmissão da luz de um dispositivo de TFBM com diferentes fontes de luz e três comprimentos de onda sendo eles (640, 875 e 905 nm) de maneira isolada ou combinada durante os tempos de 1 segundo, 10, 30, 60, 90, 120 e 150 segundos através da pele de rato. De acordo com o presente estudo a combinação entre os diferentes comprimentos de onda e fontes de luz foi capaz de entregar maior quantidade de energia quando aplicados de maneira simultânea em relação a aplicação isolada. Sugerindo que a utilização da TFBM de forma combinada seja mais eficiente para alcançar diferentes tipos de tecidos. No entanto, é necessário que estudos clínicos sejam realizados utilizando parâmetros similares aos aplicados neste estudo, para que assim sejam criados protocolos eficientes.

Palavras-chave: Terapia de Fotobiomodulação (TFBM), *Laser*, LED.

ABSTRACT

Photobiomodulation therapy (TFBM) is the term used for the application of low power light, being used for several therapeutic purposes, promoting tissue regeneration, inflammation modulation and pain relief for some years. The intensity of the biological effects depends on cellular metabolism and tissue clinical condition before irradiation. TFBM is applied over a length range of 600 to 1000 nm. Most studies are carried out in vitro or in vivo on human or animal skin and eventually combined with other types of tissue, with immediate penetration depth measures and energy loss. Studies comparing the use of these types of devices are still lacking, in addition to research related to irradiation time. The study of light transmission from a TFBM device with different light sources and three wavelengths (640, 875 and 905 nm) was carried out in an isolated or combined manner during the times of 1 second, 10, 30, 60, 90, 120 and 150 seconds through the mouse skin. According to the present study, the combination of different wavelengths and light sources was able to deliver a greater amount of energy when applied simultaneously in relation to the isolated application. Suggesting that the use of TFBM in a combined way is more efficient to reach different types of tissues. However, it is necessary that clinical studies are carried out using parameters similar to those applied in this study, so that efficient protocols are created.

Key words: Photobiomodulation Therapy (PBMT), *Laser*, LEDs.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros de irradiação utilizados. São Paulo-SP, Brasil, 2020. **16**
- Tabela 2** - Valores para o LED Vermelho 640 nm com os valores de aplicação para a barreira do Ar, Ar + Filme plástico, e Ar + Filme plástico e Pele em todos os tempos de aplicação. São Paulo-SP, Brasil, 2020. **20**
- Tabela 3** - Valores para o LED Infravermelho 875 nm com os valores de aplicação para a barreira do Ar, Ar + Filme plástico, e Ar + Filme plástico e Pele em todos os tempos de aplicação. São Paulo-SP, Brasil, 2020. **21**
- Tabela 4** - Valores para o Laser super-pulsado 905 nm com os valores de aplicação para a barreira do Ar, Ar + Filme plástico, e Ar + Filme plástico e Pele em todos os tempos de aplicação. São Paulo-SP, Brasil, 2020. **22**
- Tabela 5** - Valores para todas as fontes de luz LED vermelho 640 nm, LED infravermelho 875 nm e Laser super-pulsado 904 nm com os valores de aplicação para a barreira do Ar, Ar + Filme plástico, e Ar + Filme plástico e Pele em todos os tempos de aplicação. São Paulo-SP, Brasil, 2020. **23**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Obtenção do retalho de pele do dorso do animal. São Paulo-SP, Brasil, 2020. **18**
- Figura 2** - Sensor envolto por filme plástico e amostra de pele do animal. São Paulo-SP, Brasil, 2020. **19**
- Figura 3** - Representação gráfica da porcentagem média de potência para o LED vermelho 640 nm (ar, filme plástico e pele). São Paulo-SP, Brasil, 2020. **23**
- Figura 4** - Representação gráfica da porcentagem média de potência para o LED Infravermelho 875 nm (ar, filme plástico e pele). São Paulo-SP, Brasil, 2020. **24**
- Figura 5** - Representação gráfica da porcentagem média de potência para o Laser Super-pulsado 904 nm (ar, filme plástico e pele). São Paulo-SP, Brasil, 2020. **25**
- Figura 6** - Representação gráfica da porcentagem média de potência para todas as luzes, LED vermelho 640 nm, LED Infravermelho 875 nm e Super-pulsado 904 nm (ar, filme plástico e pele). São Paulo-SP, Brasil, 2020. **26**

LISTA DE ABREVIATURAS

LED - Light Emitting Diode (Diodos Emissores de Luz)

TFBM - Terapia de Fotobiomodulação

UNINOVE - Universidade Nove de Julho

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

mW - Miliwatt

W - Watt

Nm - Nanômetro

mg - Miligrama

Kg - Quilograma

DP - Desvio padrão

Hz - Hertz

Mt- Campo Magnético (mt)

Sec- Tempo de Irradiação por Área

SUMÁRIO

1.	CONTEXTUALIZAÇÃO	11
2.	OBJETIVO	14
2.1.	GERAL	14
2.2.	ESPECÍFICOS	14
3.	DESAFIOS CIENTÍFICOS E MÉTODOS PARA SUPERÁ-LOS	14
3.1.	ASPECTOS ÉTICOS	14
3.2.	ANIMAIS	15
3.3.	INSTRUMENTOS	15
3.4.	PROCEDIMENTOS	17
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4.	RESULTADOS	19
5.	DISCUSSÃO	26
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Atualmente o termo terapia de fotobiomodulação (TFBM) é empregado para a aplicação de luz de baixa potência (<500mW) nos tecidos biológicos, devido seus efeitos de estimulação ou inibição de processos celulares¹. Uma vez que, a luz emitida por diodos emissores de luz (Light Emitting Diode - LEDs) com menor coerência também demonstrou funcionar de forma consistente, o termo “laser de baixa potência” se tornou um termo impreciso para denominar esse tipo de terapia².

O Laser é considerado um dispositivo que emite luz com alto grau de coerência espacial, pois possuem um feixe estreito limitado por difração, possui uma divergência muito baixa, também apresentam um grau de coerência temporal, isso significa que a mesma apresenta uma onda polarizada em uma única frequência. Os Diodos Emissores de Luz (LED) são uma fonte de luz semicondutora, eles atingem os comprimentos de onda Ultravioleta, Vermelho e Infravermelho, emitindo uma luz mais ampla de comprimentos de onda que o Laser, além disso incluem facilidade de uso doméstico, facilidade de irradiar uma grande área de tecido de uma única vez e custos mais baixos³⁻⁴.

A TFBM com laser de baixa potência ou LED vem sendo utilizada para diferentes fins terapêuticos desde o final da década de 1960, quando houve um grande avanço na produção dos equipamentos e em suas aplicações na área médica⁵⁻⁷. Por se tratar de uma modalidade de tratamento clínico que não produz efeito térmico significativo sobre os tecidos, à intensidade de seus efeitos biológicos depende do metabolismo celular ou da condição clínica tecidual antes da irradiação⁸.

Estudos demonstram que a TFBM exibe bons resultados em diferentes aplicações clínicas, promovendo a regeneração tecidual, modulação da inflamação em condições como doenças musculoesqueléticas, autoimunes e cutâneas, alívio da dor, entre outras, pois seus efeitos anti-inflamatórios estão bem estabelecidos^{1-2,9-12}. Assim, é grande o interesse nas diversas afecções que possivelmente podem se beneficiar dessa interação luz-tecido biológico, que vem se tornando alvo de pesquisas em uma vasta área.

A absorção molecular da luz permite um aumento do metabolismo celular, isso acontece através do citocromo c oxidase, a enzima terminal da cadeia de transporte de elétrons que é encontrado nas mitocôndrias, ela atua

como um fotorreceptor de luz vermelha e infravermelha próxima causando alterações nos níveis de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno¹²⁻¹⁵. A TFBM é empregada tipicamente em uma faixa de comprimento de onda de 600 a 1000 nm e quando utilizados em parâmetros específicos sobre o tecido ou célula (janela terapêutica), tem efeito de modulação, estimulação ou inibição, das reações celulares e biológicas¹¹.

A evidência empírica baseada em ensaios clínicos anteriores sugere que os dispositivos com comprimentos de onda entre 780-860 nm (infravermelhos) operando em um modo contínuo precisam fornecer quase duas doses a mais de energia quando comparados aos que operam no modo super-pulsado a 904 nm, para chegarem a efeitos clínicos semelhantes em tendinopatias¹⁶. No entanto, as diretrizes para a aplicação da TFBM no tratamento de distúrbios musculares, articulares, tendinopatias e outras condições de saúde tiveram origem em ensaios clínicos, logo existe a necessidade de pesquisas básicas para verificação. É bem estabelecido que os comprimentos de onda mais longos tenham maior penetração no tecido quando comparados a comprimentos de onda mais curtos¹⁷⁻¹⁸. Em casos nos quais o tecido alvo não é o cutâneo, para que haja um efeito clínico primeiro a energia da luz deve superar a barreira da pele¹⁹. A pele é o limite externo do corpo em animais e humanos, suas propriedades fotoprotetoras, reflexão da luz epidérmica e absorção da luz por melanócitos, evitam lesões nos tecidos causadas pela radiação durante a exposição a luz solar²⁰⁻²¹. Ela atua como protetor da radiação ultravioleta e pode engrossar ou até mesmo desenvolver uma pigmentação alterada como forma de adaptação ao excesso de exposição a essa radiação, como também a mesma é capaz de fornecer vitamina D que é essencial para a manutenção da saúde humana. A luz vermelha tem uma maior penetração na pele do que a luz azul, isso se deve ao fato de que a pele possui cromóforos que apresentam níveis de dispersão e absorção dependentes do comprimento de onda²².

Entre outras coisas, a pele serve como um impedimento contra intrusões físicas e químicas²³. Assim, representa uma barreira à energia física aplicada por meio de agentes eletrofísicos, que são um dos quatro pilares utilizados em tratamentos fisioterapêuticos²⁴.

O teor da melanina dermal, elastina e colágeno atenuam a penetração da luz por meio de mecanismos de absorção e dispersão, mesmo durante os primeiros milímetros de epiderme²⁵⁻²⁷. Essas propriedades ópticas não dependem apenas do tecido dérmico, mas também de sua estrutura e organização, como as redes de elastina e colágeno²⁸. As diferenças na capacidade de penetração da pele entre 780-860 e 900 nm são teoricamente menores que 20%²⁹, mas este fato não é suficiente para elucidar completamente a diferença entre os dispositivos que operam no modo contínuo 780-860 nm e o super-pulsado 904 nm. Em um contexto clínico as características de variação na capacidade biofísica da luz ao penetrar na pele têm implicações diretas na dosagem da TFBM. No entanto, a literatura biofísica e dermatológica, oferece um bom mapa das características de penetração na pele por fontes de luz ultravioleta e algumas visíveis³⁰.

O comprimento de onda tem como fator importante conseguir ser absorvido pelos cromóforos alvo na profundidade necessária para que ocorra a ação desejada, por isso investigar a profundidade da penetração de luz na pele pode ajudar a direcionar e otimizar tratamentos, pois se parâmetros forem aplicados incorretamente a eficácia do tratamento será afetada^{22,31}. As mitocôndrias presentes nas células podem variar de acordo com os tecidos, isso reflete diretamente nas reações que ela precisa realizar, osteoblastos e fibroblastos tem um número menor de mitocôndrias, já as células musculares e neuronais ou até mesmo células referente aos órgãos internos como fígado e rins contém um número maior de mitocôndrias^{19,32}.

A maioria dos estudos que investiga a penetração da luz laser ou LED é realizada in vitro ou in vivo em pele humana ou de animais e eventualmente combinadas com outros tipos de tecidos, com medidas de profundidade de penetração imediatas e perda de energia^{25-26,33-34}, além disso, faltam estudos que comparem diferentes tipos de dispositivos. Assim, a capacidade de penetração da luz ao longo do tempo de dispositivos que operam continuamente e super-pulsados foi recentemente testada por Bordvik et al. (2017)³⁵ em seres humanos (in situ). Foi observado que observaram que a luz laser a 904 nm penetra relativamente mais que em 810 nm e essa penetração aumenta durante o tempo de exposição, diferente do 810 nm que se mantém

constante durante todo tempo de exposição³⁵. Essas propriedades podem ter importantes implicações clínicas, como proposto por Joensen et al. (2012)³⁰.

O número de dispositivos que utilizam diferentes comprimentos de onda e fontes de luz foi crescente nos últimos anos, contudo a fundamentação para tal não é clara. Sabe-se que para o sucesso da TFBM é fundamental que o tecido alvo seja alcançado. Assim, conhecer a transmissão de diferentes comprimentos de onda isoladamente e de maneira combinada é muito importante para o estabelecimento de protocolos eficientes para diferentes tipos de condições clínicas.

2. OBJETIVO

2.1 - Geral

Investigar a transmissão da luz de um dispositivo de TFBM com diferentes fontes de luz e três comprimentos de onda através da pele de rato.

2.2 - Específicos

- Analisar a transmissão da luz emitida por LED com comprimentos de onda de 640 através da pele de rato.
- Analisar a transmissão da luz emitida por LED com comprimentos de onda de 875 nm através da pele de rato.
- Analisar a transmissão da luz emitida por Laser super-pulsado com comprimentos de onda de 905 nm através da pele de rato.
- Analisar a transmissão da luz emitida com LED e laser super-pulsado com os três diferentes comprimentos de onda (640, 875, 905) agindo de maneira sinérgica, através da pele de rato.

3. DESAFIOS CIENTÍFICOS E MÉTODOS PARA SUPERÁ-LOS

3.1 - Aspectos Éticos

Para a realização deste estudo todos os procedimentos experimentais foram submetidos à avaliação do Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). Todos os procedimentos estão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e aos padrões de experimentação animal do International Council for Laboratory Animal Science.

3.2 - Animais

Foram utilizados 31 ratos machos, em torno de 8 semanas de vida, de linhagem Wistar (240 ± 20 g), provenientes do biotério central da UNINOVE.

Os animais passaram por um período de uma semana para ambientação e adaptação, no biotério de passagem da UNINOVE com alimentação e água a vontade e ciclo de 12 horas claro/escuro, antes do início dos experimentos.

3.3 - Instrumentos

3.3.1 - Medidor de potência

Para medir a potência média de saída do dispositivo foi utilizado o sistema medidor de potência óptica (Thorlabs Instruments, United Kingdom) composto por uma unidade de exibição PM100 com taxa de amostragem de 6 Hz e precisão de 1%, e um sensor de silício S121B. As especificações do fabricante indicam que o diâmetro do sensor é 9.5 e uma faixa de potência óptica de entrada de 500 nW – 500 mW (precisão de 5%).

3.3.2 - Dispositivo para Terapia de Fotobiomodulação (TFBM)

Foi utilizado um dispositivo para terapia de fotobiomodulação MR4[®] Laser Therapy System manufaturado pela Multi Radiance Medical[®] (Solon, OH - EUA), com emissor SE25.

Para a tomada da medida com o comprimento de onda de 905 nm foi utilizado um laser superpulsado (0,625 mW de potência média, 25 W de potência de pico e 250 Hz). Para a medida da transmissão da luz com o comprimento de onda de 875 nm foi utilizado um LED (60 mW de potência média), bem como para 640 nm (70 mW de potência média para cada diodo).

Tabela 1 - Parâmetros de irradiação utilizados. São Paulo-SP, Brasil, 2020.

Número de lasers	1 Super-pulsado infravermelho
Comprimento de onda (nm)	905 (± 1)
Frequência (Hz)	250
Potência de pico (W)	25
Potência média de saída (mW)	0.625
Densidade de potência (mW/cm ²)	1.42
Densidade de energia (J/cm ²)	0.21
Dose (J)	0.093
Área de saída do feixe (cm ²)	0.44
Número de LEDs	4 Vermelhos
Comprimento de onda LEDs (nm)	640 (± 10)
Frequência (Hz)	2
Potência média de saída (mW) – cada	15
Densidade de potência (mW/cm ²) – cada	16.66
Densidade de energia (J/cm ²) – cada	2.499
Dose (J) – cada	2.25
Área de saída do feixe LED (cm ²) - cada	0.9
Número de LEDs	4 Infravermelhos
Comprimento de onda LEDs (nm)	875 (± 10)
Frequência (Hz)	16
Potência média de saída (mW) – cada	17.5
Densidade de potência (mW/cm ²) – cada	19.44
Densidade de energia (J/cm ²) – cada	2.916
Dose (J) – cada	2.625
Área de saída do feixe (cm ²) – cada	0.9
Campo magnético (mT)	35
Tempo de irradiação por área (sec)	150
Dose total por área (J)	19.5
Abertura do dispositivo (cm ²)	0.197
Densidade de potência entregue (mW/cm ²)	663.07
Densidade de energia entregue (J/cm ²)	98.88
Modo de aplicação	Cluster em contato direto com a pele formando um ângulo de 90° e leve pressão

3.4 - Procedimentos

3.4.1 - Eutanásia e obtenção das amostras cutâneas

Os animais foram identificados, pesados e posteriormente eutanasiados com o uso de Tiopental Sódico (200 mg/Kg) numa dose três vezes maior que a indutora de plano anestésico, por via intraperitoneal.

Três minutos após a eutanásia o animal passou por tricotomia e a retirada do retalho ocorreu pós tricotomia. Dois retalhos de pele com dimensões de 6x6 foram retirados do dorso de cada animal, sem a hipoderme, totalizando 62 retalhos.

3.4.1.1 - Etapas

Os experimentos para tomada de medidas de transmissão da luz ocorreram de acordo com as seguintes etapas:

1º Etapa - Medida da produção de energia

O aparelho foi testado para avaliação das potências médias de saída durante 150 segundos, entre a fonte do laser e o medidor de energia óptica.

2º Etapa - Medida da produção de energia em um filme plástico

O aparelho de fototerapia foi testado para potências médias de saída durante 150 segundos de exposição com a barreira de um filme plástico da marca (Lusafilm ®) transparente entre a fonte do laser e o medidor de energia óptica.

3º Etapa - Medida de energia após penetração na pele de rato

Os animais foram eutanasiados com o uso de Tiopental Sódico (200 mg/Kg), por via intraperitoneal e 3 minutos após a eutanásia foram removidos os retalhos de pele (Figura 1). O medidor de energia óptica foi sintonizado no mesmo comprimento de onda do aparelho de fotobiomodulação, e todos os retalhos da pele do rato foram irradiados em sequência. Foi inicialmente registrada a medida da produção de energia do laser no sistema óptico, com um filme plástico sendo colocado sobre o sensor e o retalho da pele do rato colocada sobre esse sensor (Figura 2), a potência média de saída a laser foi registrada. O emissor de luz ficou em contato com a pele por 150 segundos

com uma leve pressão que foi necessária para manter a sonda fixa. A mesma pressão foi exercida sobre a sonda durante a aplicação para todos os retalhos de pele. Foi registrada a penetração da luz através da pele e filme plástico em sete momentos diferentes, após ativação. Sendo eles: 1 segundo, 10, 30, 60, 90, 120 e 150 segundos após a ativação. O mesmo procedimento foi realizado para cada um dos 3 diferentes comprimentos de onda de maneira isolada e com a combinação dos mesmos.



Figura 1 - Obtenção do retalho de pele do dorso do animal. São Paulo, Brasil-SP, 2020.



Figura 2 - Sensor envolto por filme plástico e amostra de pele do animal.
São Paulo-SP, Brasil, 2020.

3.5 - Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados e inicialmente avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, concluindo como resultado a distribuição normal. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA de duas vias e como “*post hoc test*” o teste de Bonferroni, tomando como hipótese de nulidade $p < 0,05$.

4. Resultados

Na etapa 1 do estudo, a potência média de saída de ambas fontes de luz emitidas pelo dispositivo permaneceram estáveis durante o tempo total de exposição (150 segundos).

LED Vermelho (640 nm)

Quando comparado o grupo ar ao grupo ar e plástico filme no menor tempo de aplicação (1 segundo) existe grande perda de transmissão de luz. O grupo que contou apenas com a barreira do ar apresentou valor de transmissão igual a 21,60 mW e grupo que contou com a barreira do ar + plástico filme

demostrou transmissão de 10,80 mW. Já com o retalho de pele fixado ao medidor de energia a luz transmitida em 1 segundo de aplicação foi de 1,20 mW.

Todos os valores de transmissão em todos os tempos aferidos (1, 10, 30, 90, 120 e 150), em todas as etapas estão descritos na tabela 1. Os grupos que sofreram a barreira somente do ar, os que contaram com ar e filme plástico e os que tinham o retalho de pele apresentam diferença nos valores de potência independente do tempo de aplicação.

Tabela 2 - Valores para o LED Vermelho 640 nm com os valores de aplicação para a barreira do Ar, Ar + Filme plástico, e Ar + Filme plástico e Pele em todos os tempos de aplicação. São Paulo-SP, Brasil, 2020.

Tempo	Ar			Ar + Filme plástico			Ar + Filme plástico + Pele		
	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n
1"	21,60	3,29	6	10,80	2,68	6	1,20	0,73	6
10"	34,80	2,68	6	16,80	2,68	6	2,40	0,95	6
30"	50,40	3,29	6	21,60	3,29	6	3,72	0,89	6
60"	58,80	2,68	6	25,20	6,57	6	4,56	0,68	6
90"	58,80	2,68	6	27,60	3,29	6	5,52	0,50	6
120"	62,40	3,29	6	33,60	3,29	6	6,96	0,33	6
150 "	64,80	2,68	6	39,60	3,29	6	8,40	0,42	6

LED Infravermelho (875 nm)

Comparando grupo ar ao grupo ar e filme plástico, no menor tempo de aplicação (1 segundo), quase não houve diferença entre os valores de transmissão da luz, independentemente do tempo de aplicação. O grupo que contou apenas com a barreira do ar apresentou valor de transmissão igual a 44,80 mW e o grupo que contou com a barreira do ar + filme plástico demonstrou transmissão de 44,40 mW. Já com o retalho de pele fixado ao medidor de energia a luz transmitida em 1 segundo de aplicação foi 16,20 mW.

Todos os valores de transmissão em todos os tempos aferidos (1, 10, 30, 90, 120 e 150), em todas as etapas estão descritos na tabela 2. Contudo, os grupos que sofreram a barreira somente do ar, os que contaram com ar e filme plástico e os que tinham o retalho de pele apresentam diferença nos

valores de potência independente do tempo de aplicação, reduzindo em mais da metade, como em 1" segundo e 150" segundos.

Tabela 3 - Valores para o LED Infravermelho 875 nm com os valores de aplicação para a barreira do Ar, Ar + Filme plástico, e Ar + Filme plástico e Pele em todos os tempos de aplicação. São Paulo-SP, Brasil, 2020.

Tempo	Ar			Ar + Filme plástico			Ar + Filme plástico + Pele		
	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n
1 "	44,80	1,10	6	44,40	0,55	6	16,20	0,45	6
10 "	60,40	3,29	6	54,80	0,84	6	22,20	0,45	6
30 "	62,40	3,29	6	56,80	0,84	6	24,40	0,89	6
60 "	63,60	2,19	6	58,40	0,89	6	26,20	0,45	6
90 "	64,40	3,29	6	60,40	0,55	6	27,60	0,89	6
120 "	66,40	3,29	6	61,60	0,89	6	28,80	1,10	6
150 "	66,40	3,29	6	63,60	0,89	6	30,00	1,41	6

Laser Super-pulsado (905 nm)

Quando comparado o grupo ar ao grupo ar e filme plástico no menor tempo de aplicação (1 segundo), não houve diferença entre os valores de transmissão da luz. O grupo que contou apenas com a barreira do ar apresentou valor de transmissão igual a 0,11 mW e grupo que contou com a barreira do ar + filme plástico demonstrou o mesmo valor de transmissão da luz. Já com o retalho de pele fixado ao medidor de energia a luz transmitida em 1 segundo de aplicação foi 0,0014 mW.

Todos os valores de transmissão em todos os tempos aferidos (1, 10, 30, 90, 120 e 150), em todas as etapas estão descritos na tabela 3. Os grupos que sofreram a barreira somente do ar, os que contaram com ar e filme plástico não tiveram nenhuma alteração nos valores de transmissão da luz mas os que tinham o retalho de pele apresentam diferença nos valores de transmissão da luz independente do tempo de aplicação.

Tabela 4 - Valores para o Laser super-pulsado 905 nm com os valores de aplicação para a barreira do Ar, Ar + Filme plástico, e Ar + Filme plástico e Pele em todos os tempos de aplicação. São Paulo-SP, Brasil, 2020.

Tempo	Ar			Ar + Filme plástico			Ar + Filme plástico + Pele		
	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n
1 "	0,11	0,01	6	0,11	0,01	6	0,0014	0,0005	6
10 "	0,11	0,01	6	0,11	0,01	6	0,0024	0,0005	6
30 "	0,12	0,01	6	0,12	0,01	6	0,0024	0,0005	6
60 "	0,13	0,01	6	0,13	0,01	6	0,0034	0,0005	6
90 "	0,14	0,01	6	0,14	0,01	6	0,0034	0,0005	6
120 "	0,15	0,01	6	0,15	0,01	6	0,0034	0,0005	6
150 "	0,15	0,01	6	0,15	0,01	6	0,0044	0,0005	6

Todas as fontes de luz (640, 875 e 904 nm)

Quando comparado o grupo ar ao grupo ar e filme plástico no menor tempo de aplicação (1 segundo), quase não houve diferença entre os valores de transmissão da luz. O grupo que contou apenas com a barreira do ar apresentou valor de transmissão igual a 82,62 mW e grupo que contou com a barreira do ar + plástico filme demonstrou transmissão de 82,28 mW da luz. Já com o retalho de pele fixado ao medidor de energia a luz transmitida em 1 segundo de aplicação foi 34,83 mW.

Todos os valores de transmissão em todos os tempos aferidos (1, 10, 30, 90, 120 e 150), em todas as etapas estão descritos na tabela 4. Contudo, os grupos que sofreram a barreira somente do ar, os que contaram com ar e filme plástico e os que tinham o retalho de pele apresentam diferença nos valores de potência independente do tempo de aplicação, reduzindo praticamente a metade, como em 1" segundo e 150" segundos.

Tabela 5 - Valores para todas as fontes de luz LED vermelho 640 nm, LED infravermelho 875 nm e Laser super-pulsado 904 nm com os valores de aplicação para a barreira do Ar, Ar + Filme plástico, e Ar + Filme plástico e Pele em todos os tempos de aplicação. São Paulo-SP, Brasil, 2020.

Tempo	Ar			Ar + Filme plástico			Ar + Filme plástico + Pele		
	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n
1 "	82,62	0,93	6	82,28	0,93	6	34,83	0,96	6
10 "	116,96	1,86	6	96,56	1,86	6	43,43	0,96	6
30 "	117,64	1,42	6	99,96	1,86	6	46,87	0,96	6
60 "	118,32	1,52	6	100,64	2,79	6	47,52	0,49	6
90 "	123,76	1,86	6	101,32	3,72	6	50,74	1,92	6
120 "	127,16	1,86	6	104,72	3,72	6	55,04	1,92	6
150 "	130,56	1,86	6	107,44	2,79	6	58,48	2,36	6

A figura 3 representa graficamente a porcentagem média de potência entregue com o LED vermelho 640 nm, através do ar, filme plástico e retalho de pele fixado ao medidor de energia a luz, que aumenta de forma progressiva durante o tempo de exposição.

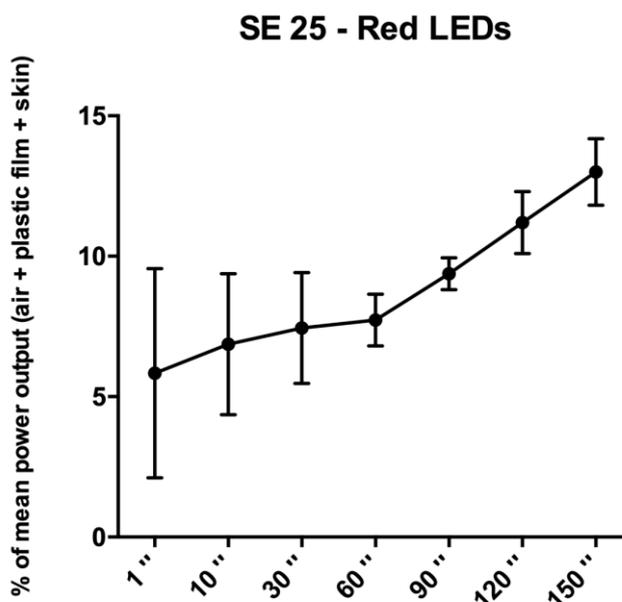


Figura 3 - Representação gráfica da porcentagem média de potência para o LED vermelho 640 nm (ar, filme plástico e pele).

A figura 4 representa graficamente a porcentagem média de potência entregue com o LED Infravermelho 875 nm através do ar, filme plástico e retalho de pele fixado ao medidor de energia a luz, que aumenta de forma progressiva durante o tempo de exposição.

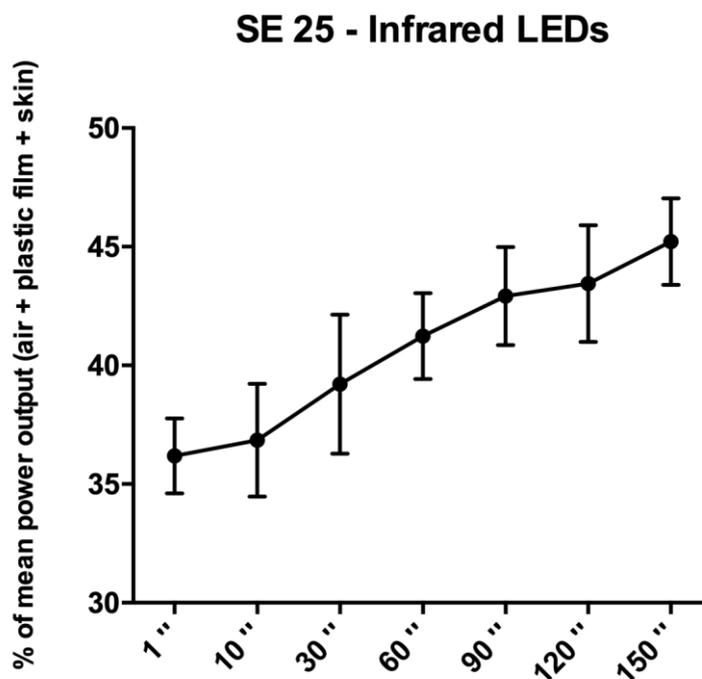


Figura 4 - Representação gráfica da porcentagem média de potência para o LED Infravermelho 875 nm (ar, filme plástico e pele).

A figura 5 representa graficamente a porcentagem média de potência entregue com o Laser super-pulsado 905 nm através do ar, filme plástico e retalho de pele fixado ao medidor de energia a luz, apresenta redução da potência entregue entre 10'' e 30'' e também entre 60'' e 90'' e de 90'' para 120''.

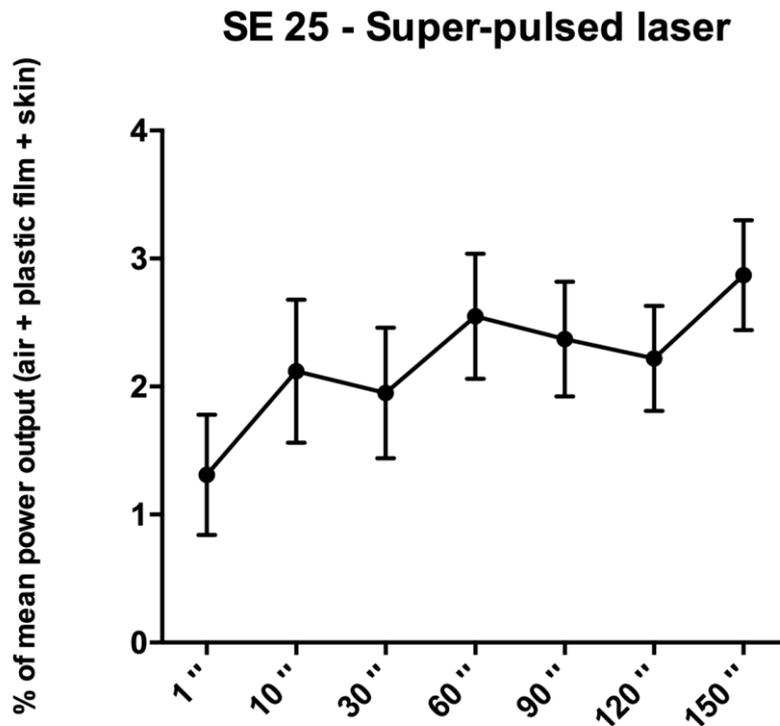


Figura 5 - Representação gráfica da porcentagem média de potência para o Laser Super-pulsado 904 nm (ar, filme plástico e pele).

A figura 6 representa graficamente a porcentagem média de potência entregue com todas as luzes através do ar, filme plástico e retalho de pele fixado ao medidor de energia a luz, onde o valor está acima do que era esperado. Os valores em um 1' segundo apresentam praticamente os mesmos valores que em 150', sendo 42,17 e 44,80 respectivamente.

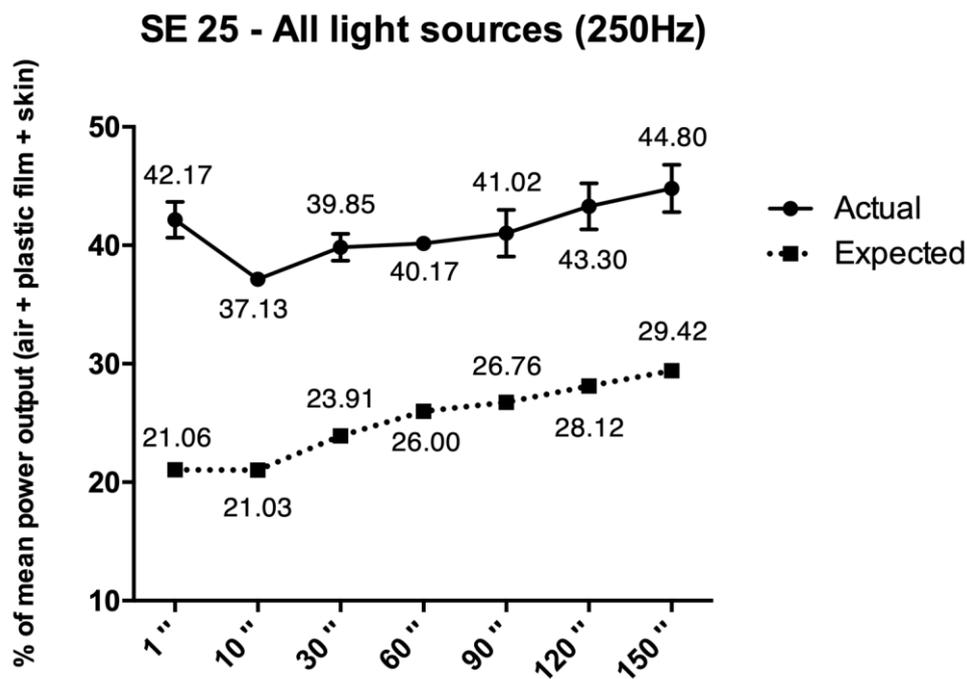


Figura 6 - Representação gráfica da porcentagem média de potência para todas as luzes, LED vermelho 640 nm, LED Infravermelho 875 nm e Super-pulsado 904 nm (ar, filme plástico e pele).

5. DISCUSSÃO

Para aplicação da terapia de fotobiomodulação independentemente do tecido alvo, é preciso conhecer o quanto a pele pode interferir nesse processo, pois somente desta forma é possível planejar tratamentos e protocolos efetivos. Assim, é de grande importância entender a profundidade da penetração dos diversos comprimentos de onda³⁶.

Segundo Jacques³⁷, a capacidade da luz ao penetrar em um tecido depositar energia através das propriedades de absorção do tecido é a chave para aplicações terapêuticas. O presente estudo demonstrou que somente no LED vermelho houve perda de energia quando aplicado em conjunto filme plástico e ar, nas demais fontes de luz não existiu diferença significativa para o filme plástico. A aplicação de filmes plásticos para realização de tratamentos com dispositivos de terapia de fotobiomodulação auxilia na prevenção de contaminação por microrganismos principalmente durante tratamentos com lesões de pele, mas quando utilizada pode resultar em perda de energia da luz por conta das propriedades absorventes refletivas e de dispersão do filme plástico, isso pode ser melhorado através do ajuste do comprimento de onda,

os valores dessa perda podem chegar em torno de 8% ou seja o filme plástico deve ser considerado ao determinar a energia necessária para atingir o tecido alvo³⁸.

Ao considerar o conjunto através do ar, filme plástico e retalho de pele os resultados foram diferentes, independentemente do tempo de aplicação, sendo que para o LED vermelho e infravermelho houve aumento da entrega de energia de forma progressiva no tempo de 150 segundos, já o Laser super-pulsado não atuou de forma progressiva, apresentou redução da potência durante o tempo de 150 segundos. Quando todas as fontes de luz foram aplicadas simultaneamente ocorreu um aumento da entrega de energia de maneira quase linear durante todo o tempo de exposição, e os valores de energia entregues são superiores se comparados a aplicação individual independentemente da fonte de luz, sendo que o valor passou de 29,42 para 44,80 nos 150 segundos de aplicação.

A terapia de fotobiomodulação tem sido amplamente utilizada em diversos tratamentos como recuperação de tendinopatias, osteoartrite e cicatrização de feridas, sendo utilizada tanto na região vermelha ou infravermelho próximo variando nos comprimentos de onda de 600 nm a 1100nm, a faixa de comprimento de onda entre 700 a 780 nm possuem atividade bioquímica limitada ineficaz e os comprimentos de onda mais longos na faixa de 780 a 950 nm que penetram mais, são usados para tratar tecidos mais profundos³. Duas fontes de luz diferentes foram utilizadas no experimento, em relação ao tipo de luz acreditava-se que o fato da luz emitida pelo Laser ser coerente representava mais benefícios em relação a luz emitida pelo LED que não é coerente, porém já foi demonstrado que não procede³¹.

Tratamentos com a Terapia de Fotobiomodulação tem se tornado uma abordagem terapêutica importante, e por isso muitos estudos vêm sendo realizados nos últimos anos em diversos tipos de tecidos e com diferentes finalidades. Ensaio com ratos como modelos experimentais, mesmo apresentando diferença com a pele humana, são amplamente utilizados em estudos pré-clínicos, pois além de serem mais baratos, permitem a realização de trabalhos com grande número amostral³⁹⁻⁴⁰.

A luz que é aplicada sobre a superfície da pele tem a tendência de diminuir de acordo com o aumento da profundidade de penetração, ou seja,

para entregar energia em locais de maior profundidade é necessário maior potência no intuito de compensar a energia que é perdida durante essa aplicação³⁹. Além disso deve ser levado em consideração a importância de se manter o dispositivo emissor pressionado a pele, pois desse modo é possível diminuir a espessura gerando aumento dos coeficientes ópticos⁴¹. Outros autores também demonstraram resultados positivos quando a sonda permanece em contato direto, pois a perda de reflexão da superfície da pele é minimizada⁴². Mas esses resultados podem ser diferentes dependendo do formato do emissor utilizado independente do comprimento de onda utilizado³⁰.

O comprimento de onda no visível entre 630-685 nm (vermelho), se mostrou efetivo em diversos estudos para tratamento de cicatrização de feridas⁴⁰. Mas em um estudo que utilizou a terapia de fotobiomodulação para reparo ósseo em ratos o comprimento de onda entre 790-830 nm (infravermelho) se mostrou mais eficaz comparado a luz vermelha (660-690 nm). De acordo com os autores isso pode estar relacionado ao fato de que os comprimentos de onda mais baixos são menos resistentes a dispersão e acabam não penetrando profundamente devido a alta absorção cutânea⁴³.

Foi observado em um trabalho que a irradiação simultânea com luz de 638 e 830 nm foi capaz de trazer melhores efeitos do que usados isoladamente, pois a absorção e penetração diferentes podem resultar na estimulação de partes superficiais e profundas do tecido⁴⁴, corroborando com os resultados demonstrados em nosso estudo, ao utilizar diferentes comprimentos de onda e luz simultaneamente.

Em outro estudo, para avaliar a aplicação de luz em tecido medular, os autores demonstraram que o comprimento de onda de 810 nm conseguiu ser capaz de melhorar a recuperação após lesão⁴⁵. Dados que, mais uma vez, vão de encontro com o fato que comprimentos maiores são ideais para atingir tecidos profundos.

Em estudo realizado para avaliar a transmissão de luz através da pele e músculo gastrocnêmico, com comprimento de onda 810 nm, emitindo em modo contínuo e 904 nm em modo superpulsado, demonstrou que a transmissão no comprimento de onda de 810 nm em ambos os tecidos avaliados se mostrou maior do que a comprimento superpulsado³⁶. As porcentagens de transmissão de luz através do músculo e da pele em 810 nm foram 7,42% enquanto em 904

nm foi de 4,01%, as taxas de fluência na pele foram 24,63% e 19,94% no comprimento de onda de 810 nm e 904 nm respectivamente³⁶. Já em um estudo para o reparo de nervos de ratos utilizando os comprimentos de onda continua 808 nm e pulsado 905 nm de modo isolado e uma combinação dos dois demonstrou que para ambos os comprimentos de onda o resultado foi positivo, mas o melhor resultado foi a partir da combinação dos dois parâmetros em conjunto⁴⁶. Os achados do presente estudo também indicam que os três comprimentos de onda estudados apresentam melhor transmissão pelo tecido cutâneo quando emitidos de maneira combinada.

A terapia de fotobiomodulação pode ser uma alternativa para tratamentos de diversas condições clínicas de maneira não invasiva e segura, pois esse tipo de terapia não apresenta efeitos adversos reportados pela literatura, pode atuar como adjuvante ao uso de medicamentos, que são capazes de causar efeitos desfavoráveis^{4,47-49}. De modo que os resultados do presente estudo são de fundamental importância, pois muitas vezes a pele não é o tecido alvo da terapia de fotobiomodulação, logo precisamos conhecer a melhor forma de aplicação para que aconteça o efeito desejado da luz. Estes achados se tornam ainda mais relevantes se levarmos em consideração tecidos mais profundos, pois a partir deles é possível ter embasamento para o estabelecimento de protocolos mais efetivos para diferentes tipos de tratamentos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os achados do presente estudo a combinação entre os diferentes comprimentos de onda e fontes de luz foi capaz de entregar maior quantidade de energia quando aplicados de maneira simultânea em relação a aplicação isolada. Sugerindo que a utilização da TFBM de forma combinada seja mais eficiente para alcançar diferentes tipos de tecidos. No entanto, é necessário que estudos clínicos sejam realizados utilizando parâmetros similares aos aplicados neste estudo, para que assim sejam criados protocolos eficientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009;7(2):358-83.
2. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015 Abr;33(4):183-4.
3. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012 Fev; 40(2):516-33.
4. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? *Photochem Photobiol Sci*. 2018 Ago;17(8):1003-17.
5. Bjordal JM, Johnson MI, Iversen V, Aimbire F, Lopes-Martins RAB. Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(2):158-68.
6. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(1):19-24.
7. Leal Junior ECP, Lopes-Martins RAB, Dalan F, Ferrari M, Sbabo FM, Generosi RA, Bjordal JM. Effect of 655-nm low-level laser therapy on exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(5):419-24.
8. Santos FC, Grellet M, Aguilar R, Jamur NC, Pinto JA, Fomin DS. Estudo comparativo histológico na prega vocal após incisão com instrumental a frio e com laser de CO2 em modelo animal. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(6):753-9.
9. Gur A, Sarac AJ, Cevik R, Altindag O, Sarac S. Efficacy of 904 nm gallium arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: a double-blind and randomize-controlled trial. *Lasers Surg Med*. 2004;35(3):229-35.

10. Chow RT, Heller GZ, Barnsley L. The effect of 300mW, 830nm laser on chronic neck pain: A double blind, randomized, placebo-controlled study. *Pain*. 2006;124(1-2):201-10.
11. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516-33.
12. Wickenheisser VA, Zywoot EM, Rabjohns EM, Lee HH, Lawrence DS, Kathleen Tarrant T. Laser Light Therapy in Inflammatory, Musculoskeletal, and Autoimmune Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019 Jul;19(8):37.
13. Ribeiro MS, Silva DFT, Núñez SC, Zezzel DM. Laser em Baixa Intensidade. In: Maio M. (Org). *Tratado de Medicina Estética*. 2. ed. São Paulo: Editora Roca; 2011. p. 945-53.
14. Albuquerque-Pontes GM, Vieira RP, Tomazoni SS, Caires CO, Nemeth V, Vanin AA, Carvalho PDT. Effect of pre-irradiation with different doses, wavelengths, and application intervals of low-level laser therapy on cytochrome c oxidase activity in intact skeletal muscle of rats. *Lasers Med Sci*. 2015;30(1):59-66.
15. Ferraresi C, Sousa MVP, Huang YY, Bagnato VS, Parizotto NA, Hamblin MR. Time response of increases in ATP and muscle resistance to fatigue after low-level laser (light) therapy (LLLT) in mice. *Lasers Med Sci*. 2015;30(4):1259-67.
16. Bjordal JM, Lopes-Martins RA, Joensen J, et al. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord*. 2008 Mai;9:75.
17. Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E. et al. Photobiomodulation Directly Benefits Primary Neurons Functionally Inactivated by Toxins. *J Biol Chem*. 2005 Fev;280(6):4761-71.
18. Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*. 2010, Ago;62(8):607-10.
19. Zein R, Selting W, Hamblin MR. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *J Biomed Opt*. 2018 Dez;23(12):1-17.

20. Alaluf S, Atkins D, Barrett K, Blount M, Carter N, Heath A. Ethnic variation in melanin content and composition in photoexposed and photoprotected human skin. *Pigment Cell Res.* 2002;15(2):112-8.
21. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem.* 2007; 282(38): 27557-61.
22. Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(8):1909-18.
23. Millington PF, Wilkinson R. *Skin. Biological structure and function.* 1 ed. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press; 1983.
24. The Chartered Society of Physiotherapy [online]. The Chartered Society of Physiotherapy. London, United Kingdom:2006. Disponível em: <http://www.csp.org.uk/director/members/practice/rulesandstandards/scoppractice.cfm> Acesso em: 03 de Junho de 2019.
25. Topping A, Gault D, Grobbelaar A, Sanders R, Green C, Linge C. Does low penetration of human skin by the normal mode ruby laser account for poor permanente depilatory success rates? *Lasers Med Sci.* 2001;16(3):224-9.
26. Esnouf A, Wright PA, Moore JC, Ahmed S. Depth of penetration of an 850 nm wavelength low level laser in human skin. *Acupunct Electrother Res.* 2007;32(1-2):81-6.
27. Barun V, Ivanov A. Estimation of the spectral absorption of light by components of human skin. *Opt Spectrosc.* 2009;106:84-91.
28. Bashkatov AN, Genina EA, Tuchin VV. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review. *J Innov Opt Health Sci.* 2011;4(1):9-38.
29. Ackermann G, Hartmann M, Scherer K, et al. Correlations between light penetration into skin and the therapeutic outcome following laser therapy of port-wine stains. *Lasers Med Sci.* 2002;17(2):70-8.
30. Joensen J, Ovsthus K, Reed RK, et al. Skin penetration time-profiles for continuous 810 nm and Superpulsed 904 nm lasers in a rat model. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(12):688-94.

31. Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2016 Mai-Jun;22(3).
32. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol*. 1988 Set;136(3):507-13.
33. Ryan T, Smith R. An investigation into the depth of penetration of low level laser therapy through the equine tendo in vivo. *Ir Vet J*. 2007;60(5):295-9.
34. Hudson DE, Hudson DO, Winger JM, Richardson BD. Penetration of laser light at 808 and 980 nm in bovine tissue samples. *Photomed Laser Surg*. 2013;31(4):163-68.
35. Bordvik DH, Haslerud S, Naterstad IF, Lopes-Martins RA, Leal-Junior ECP, Bjordal JM, Joensen J. Penetration time profiles for two class 3B lasers in *in situ* human Achilles at rest and stretched. *Photomed Laser Surg*. 2017;35(10):546-54.
36. Anders JJ, Wu X. Comparison of Light Penetration of Continuous Wave 810 nm and Superpulsed 904 nm Wavelength Light in Anesthetized Rats. *Photomed Laser Surg*. 2016 Set;34(9):418-24.
37. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol*. 2013; 58(11):R37–R61.
38. Chen C, Diven DG, Lockhart S, Bell B. Laser transmission through transparent membranes used in cutaneous laser treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Dez;45(6):919-23.
39. Sabino CP, Deana AM, Yoshimura TM, Silva DFT, França CM, Hamblin MR. et al. The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. *J Photochem Photobiol*. 2016 Jul;160:72-8.
40. Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser Photobiomodulation of Wound Healing: A Review of Experimental Studies in Mouse and Rat Animal Models. *Photomed Laser Surg*. 2010 Jun;28(3):291-325.
41. Kwon K, Son T, Lee KJ, Jung B. Enhancement of light propagation depth in skin: cross-validation of mathematical modeling methods. *Lasers Med Sci*. 2009 Jul;24(4):605-15.

42. Ohshiro T. The Proximal Priority Theory: An Updated Technique in Low Level Laser Therapy with an 830 nm GaAlAs Laser. *Laser Ther.* 2012 Dez; 21(4):275-85.
43. Barbosa D, Souza RA, Xavier M, Silva FF, Arisawa EÂL, Villaverde AGJB. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: optical densitometry analysis. *Lasers Med Sci.* 2013 Fev; 28(2):651-6.
44. Mendez TM, Pinheiro AL, Pacheco MT, Nascimento PM, Ramalho LM. Dose and Wavelength of Laser Light Have Influence on the Repair of Cutaneous Wounds. *J Clin Laser Med Surg.* 2004 Fev;22(1):19-25.
45. Byrnes KR, Waynant RW, Ilev IK, Wu X, Barna L, Smith K. et al. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. *Lasers Surg Med.* 2005 Mar;36(3):171-85.
46. Gigo-Benato D, Geuna S, Castro Rodrigues A, Tos P, Fornaro M, Boux E. et al. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurorrhaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. *Lasers Med Sci.* 2004;19(1):57-65.
47. Tieppo Francio V, Dima RS, Towery C, Davani S. Prolotherapy and Low Level Laser Therapy: A Synergistic Approach to Pain Management in Chronic Osteoarthritis. *Anesth Pain Med.* 2017 Out;7(5): e14470.
48. Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya GA. Low Level Helium Neon Laser therapy for chemoradiotherapy induced oral mucositis in oral cancer patients – A randomized controlled trial. *Oral Oncol.* 2012 Set;48(9):893-7.
49. Reis SRA, Medrado AP, Marchionni AMT, Figueira C, Fracassi LD, Knop LAH. Effect of 670-nm Laser Therapy and Dexamethasone on Tissue Repair: A Histological and Ultrastructural Study. *Photomed Laser Surg.* 2008 Ago;26(4):307-13.