

**UNIVERSIDADE BRASIL BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA
FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA MICROBIOTA BUCAL**

**EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PHOTODYNAMIC THERAPY
(PDT) IN THE TREATMENT OF ORAL MICROBIOT**

São Paulo- SP

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA BIOMÉDICA

LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA
FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA MICROBIOTA BUCAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica.

Profª Drª Carla Roberta Tim
Orientadora

Profª Drª Lívia Assis
Coorientadora

São Paulo – SP
2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

M843a MORETI, Lucieni Cristina Trovati.

Avaliação da atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica no tratamento da microbiota bucal / Lucieni Cristina Trovati Moreti. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2022.

101 f. il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim.

Coorientação: Profa. Dra. Lívia Assis.

1. Higiene bucal. 2. Unidade de terapia intensiva. 3. Terapia fotodinâmica. I. Tim, Carla Roberta. II. Assis, Lívia. III. Título.

CDD 620.82



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)
NO TRATAMENTO DA MICROBIOTA BUCAL”**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a) Carla Roberta Tim (presidente-orientadora)

Prof(a). Dr(a) Dora Inés Kosusny-Andreani (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) José Antonio Santos Souza (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a). José Carlos Tatzmatsu Rocha (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)

Prof(a). Dr(a). Eneas de Freitas Dutra Junior (CENTRO UNIVERSITÁRIO UNINOVAFAPÍ)

São Paulo, 30 de setembro de 2022.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Carla Roberta Tim

Houve alteração do Título: sim () não (x):

Campus Itaquera

Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030

Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070

www.ub.edu.br



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) NO TRATAMENTO DA MICROBIOTA BUCAL"

Autor(es):

Discente: Lucieni Crjetina Trowati Moreti

Assinatura: _____

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Carla Roberta Tim

Assinatura: _____

Coorientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Lívia Assis Garcia

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não ():

Data: 30/05/2022

Campus Itaquera

Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030

Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070

www.ub.edu.br

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os meus companheiros de jornada terrestre que em algum momento contribuíram para minha evolução.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar sabedoria e força para chegar até aqui. A toda a minha família, em especial a minha mãe por suas preces e ao meu esposo por toda compreensão e paciência, obrigada família amada por estar sempre ao meu lado, sem vocês nada seria possível.

A minha orientadora Profa. Dra. Carla Roberta Tim, por toda dedicação e colaboração neste meu sonho, gratidão por ter sido sempre muito amiga, partilhando todo o seu conhecimento com muita clareza e paciência, obrigada pelo aprendizado, serei eternamente grata por tudo.

A minha querida amiga de caminhada Prof^a. Dra. Karina G.C. Fernandes que sempre esteve do meu lado em todos os momentos nestes anos do doutorado, obrigada por fazer parte da minha vida e pelo companheirismo e amizade, estarei sempre torcendo por você.

A querida prof^a Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani e as colaboradoras do laboratório de microbiologia da Universidade Brasil – campus Fernandópolis, o meu muito obrigado pelo carinho e profissionalismo.

Agradecimento especial à Universidade Brasil pelo Programa de bolsa Pró-mestre no qual sou bolsista.

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu...”*

(FERNANDO PESSOA- 1972)

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (PDT) fundamenta-se na interação da luz com um fotossensibilizador capaz de promover a destruição microbiana. No presente trabalho avaliou-se *in vitro* a atividade antimicrobiana da aPDT utilizando dois fotossensibilizadores (fenotiazínico e urucum) e diferentes tempos de tratamento do biofilme oral, bem como foram identificados microrganismos e avaliou-se a resistência e sensibilidade bacteriana a determinados antibióticos. Para isso, foram coletadas amostras antimicrobianas de biofilme oral (língua) de pacientes sem e com pneumonia internados na UTI, que estavam entubados por um período de no mínimo 24 e no máximo 48 horas, utilizando *swabs* embebidos em solução salina (NaCl 0,5%) e posteriormente foram cultivadas em meios agarizados. As amostras de paciente sem pneumonia foram aleatorizadas em: grupo não pneumonia controle (NP - C): microrganismos sem intervenção; grupo não pneumonia clorexidina (NP - CLX): empregou clorexidina a 0,12%; grupo não pneumonia PDT vermelho (NP - PDTV): empregou o uso da aPDT utilizando LED 630 nm e fotossensibilizador fenotiazínicos; grupo não pneumonia PDT azul (NP - PDTA): empregou o uso da aPDT utilizando LED 450 nm e fotossensibilizador urucum ambos utilizando uma única aplicação. E grupo pneumonia controle (P - C): microrganismos sem intervenção; grupo com pneumonia clorexidina (P - CLX): empregou clorexidina 0,12%; grupo com pneumonia PDT vermelho (P - PDTV): empregou o uso da PDT utilizando LED 630 nm e fotossensibilizador fenotiazínicos; grupo com pneumonia PDT azul (P - PDTA): empregou o uso da PDT utilizando LED 450 nm e fotossensibilizador urucum. Foram irradiados com os seguintes parâmetros: LED vermelho ($\lambda 630 \pm 10\text{nm}$) ou LED azul ($\lambda 450 \pm 10\text{nm}$), ambos na potência 100 mW e receberam tratamento por 150, 300 ou 600 segundos. Após 24 horas, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e antibiograma. Os resultados demonstraram que os grupos NP – CLX e P – CLX promoveram redução total de UFC. Os grupos PDT em biofilme oral sem e com pneumonia demonstraram que a redução de UFC foi dependente do tempo de tratamento, sendo melhor nos 600 segundos de tratamento. Por meio do código genético foram identificados microrganismos, Gram-negativos como as *Pseudomonas aeruginosa* e Gram-positivos como a *Bhargavaea sp.*, *Desemzia incerta*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus sp.*

,*Micrococcus luteus*, *Agrococcus carbonis*, *Microbacterium paraoxydans*, *Corynebacterium sp.*, *Dietzia aurantiaca*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus saprophyticus*. O antibiograma realizado avaliou o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) caracterizando multirresistência a todos. Conclusão: Mesmo sendo composto por microrganismos multirresistentes, a aPDT apresentou potencial para o tratamento do biofilme oral de paciente sem e com pneumonia.

Palavras-chave: Higiene bucal. Unidade de terapia intensiva. Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is based on the interaction of light with a photosensitizer capable of promoting microbial destruction. In the present work, the antimicrobial activity of aPDT was evaluated *in vitro* using two photosensitizers (phenothiazine and annatto) and different times of treatment of oral biofilm, as well as microorganisms were identified and bacterial resistance and sensitivity to certain antibiotics were evaluated. For this, antimicrobial samples of oral biofilm (tongue) were collected from patients without and with pneumonia admitted to the ICU, who were intubated for a period of at least 24 and at most 48 hours, using swabs soaked in saline solution (NaCl 0.5 %) and later cultivated in agarized media. Samples from patients without pneumonia were randomized into: non-pneumonia control group (NP - C): microorganisms without intervention; non-pneumonia chlorhexidine group (NP - CLX): used 0.12% chlorhexidine; non-pneumonia group red PDT (NP - PDTV): used aPDT using 630 nm LED and phenothiazine photosensitizer; non-pneumonia blue PDT group (NP - PDTA): used the use of aPDT using 450 nm LED and annatto photosensitizer, both using a single application. And control pneumonia group (P - C): microorganisms without intervention; group with chlorhexidine pneumonia (P - CLX): used 0.12% chlorhexidine; group with red PDT pneumonia (P - PDTV): used the use of PDT using 630 nm LED and phenothiazine photosensitizer; group with blue PDT pneumonia (P - PDTA): used the use of PDT using 450 nm LED and annatto photosensitizer. They were irradiated with the following parameters: red LED ($\lambda 630 \pm 10\text{nm}$) or blue LED ($\lambda 450 \pm 10\text{nm}$), both at 100 mW power and treated for 150, 300 or 600 seconds. After 24 hours, colony forming units (CFU) and antibiogram were counted. The results showed that the NP - CLX and P - CLX groups promoted total CFU reduction. The PDT groups in oral biofilm without and with pneumonia showed that the CFU reduction was dependent on the treatment time, being better at 600 seconds of treatment. Through the genetic code, Gram-negative microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive microorganisms such as *Bhargavaea sp.*, *Desemzia incerta*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus sp.*, *Micrococcus luteus*, *Agrococcus carbonis*, *Microbacterium paraoxydans*, *Corynebacterium sp.*, *Dietzia aurantiaca*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus saprophyticus*. The antibiogram performed evaluated the multiple antimicrobial resistance index (IRMA)

characterizing multiresistance to all. Conclusion: Despite being composed of multidrug-resistant microorganisms, aPDT showed potential for the treatment of oral biofilm in patients with and without pneumonia.

Keywords: Oral hygiene. Intensive care unit. Photodynamic therapy.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Os pacientes das unidades de terapia intensiva (UTIs) necessitam de cuidados especializados, em virtude da queda dos mecanismos normais de defesa. A higiene bucal é um fator significativo e, quando bem aplicada, reduz a microbiota oral e os índices de infecção, diminuindo os riscos de que estes patógenos sejam aspirados pela orofaringe para o pulmão contribuindo para a instalação da pneumonia hospitalar, principalmente nos pacientes submetidos à ventilação mecânica pulmonar. A terapia fotodinâmica é uma terapia não invasiva, que não provoca resistência dos microrganismos, no entanto um antibiótico poderá apresentar esta desvantagem. Este estudo avaliou o emprego desta terapia com diferentes fotossensibilizadores (fenotiazínico e urucum) e diferentes tempos de tratamento na atividade antimicrobiana contra o biofilme oral comparados com o emprego da clorexidina a 0,12%. Os resultados demonstraram que os grupos clorexidina com e sem pneumonia promoveram redução total de UFC. Os grupos PDT em biofilme oral sem e com pneumonia demonstraram que a redução de UFC foi dependente do tempo de tratamento, sendo melhor nos 600 segundos de tratamento. O por meio do código genético foram identificados microrganismos, Gram-negativos como as *Pseudomonas aeruginosa* e Gram-positivos como a *Bhargavaea sp.*, *Desemzia incerta*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus sp.*, *Micrococcus luteus*, *Agrococcus carbonis*, *Microbacterium paraoxydans*, *Corynebacterium sp.*, *Dietzia aurantiaca*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus saprophyticus*. Após o antibiograma foi identificada a presença de microrganismos do biofilme oral multirresistentes a todos os antimicrobianos empregados, contudo, a aPDT apresentou potencial para o tratamento do biofilme oral de paciente sem e com pneumonia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração apresentando os cinco estágios do biofilme oral	26
Figura 2 – Ilustração da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.....	27
Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica	30
Figura 4 – Esquema da reação de fotossensibilização seguida de dois mecanismos (tipo I e tipo II).....	35
Figura 5 – Cultura de microrganismos isolados.....	48
Figura 6 – Redução do biofilme oral sem pneumonia.....	60
Figura 7 – Redução do biofilme oral com pneumonia.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos Grupos experimentais.....	43
Tabela 2 – Parâmetros da Terapia Fotodinâmica	45
Tabela 3 – Classificação em Gram-positivos e Gram-negativos.....	47
Tabela 4 – Antibiógrama das amostras dos microrganismos Gram-negativo, isolados nos biofilmes (NP-1 e NP-2).....	49
Tabela 5 – Antibiógrama das amostras dos microrganismos Gram-positivo, isolados dos biofilmes (NP-1e NP-2).....	51
Tabela 6 – Antibiógrama das amostras dos microrganismos Gram-positivo, isolados no biofilme oral pneumonia (P-1).....	54
Tabela 7 – Cálculo do índice de resistência antimicrobiana dos microrganismos Gram-negativos, isolados dos biofilmes (NP-1e NP-2).....	56
Tabela 8 – Cálculo do índice de resistência antimicrobiana dos microrganismos Gram-positivo, isolados dos biofilmes (NP-1e NP-2).....	57
Tabela 9 – Cálculo do índice de resistência antimicrobiana dos microrganismos Gram-positivo, isolados do biofilme (P-1).....	57
Tabela 10 – Proporção dos microrganismos Gram-positivos resistentes ou sensíveis aos diferentes tipos de antibióticos (NP 1 e NP-2).....	58
Tabela 11 – Proporção dos microrganismos Gram-positivos resistentes ou sensíveis aos diferentes tipos de antibióticos (P- 1).....	59
Tabela 12 – Proporção dos microrganismos Gram-negativos resistentes ou sensíveis aos diferentes tipos de antibióticos (NP- 1 e N2).....	60
Tabela 13 – Comparação intragrupo unidade formadores de colônia (UFC/mL Log10).....	63
Tabela 14 – Comparação entre biofilme oral não pneumonia e pneumonia unidade formadores de colônia (UFC/mL Log10).....	64

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
%	Porcentagem
O_2	Oxigênio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
$\text{OH}\cdot$	Hidroxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
CO_2	Gás carbônico
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
NaCl	Cloreto de Sódio
$^\circ\text{C}$	Grau Celsius
J	Joule
W	Watts
mW	Miliwatts
H_2O	Água
<i>sp</i>	Espécie (ainda não identificada)
\bar{e}	Elétron

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 PNEUMONIA	Erro! Indicador não definido.
3.2 TERAPIA FOTODINÂMICA.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	Erro! Indicador não definido. 38
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	38
4.3 AMOSTRA.....	39
4.4 COLETA MICROBIOLÓGICA.....	39
4.5 SEMEADURA DOS MICROGANISMOS.....	39
4.6 TÉCNICA DE COLORAÇÃO GRAM.....	40
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	40
4.8 ANTIBIOGRAMA.....	41
4.9 CONDIÇÕES DE CULTURA E FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	43
4.10 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	43
4.11 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA.....	44
4.12 CONTAGEM DE UNIDADE FORMADORAS DE COLÔNIAS.....	46
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 RESULTADOS	46
5.1 TÉCNICA DE COLORAÇÃO GRAM.....	46
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	47
5.3 ANTIBIOGRAMA.....	49
5.4 CONTAGEM DE UNIDADE FORMADORAS DE COLÔNIAS.....	60
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	72

REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	89
ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	92
ANEXO C- RELATÓRIO DO SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	94

1 INTRODUÇÃO

Nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) os pacientes internados necessitam de cuidados de excelência, devido ao quadro clínico caracterizado pela redução dos mecanismos normais de defesa, tornando-os mais susceptíveis a instalações de infecções bucais e/ ou sistêmicas (LAMBERT et al., 2013; KIYOSHITEO & BLEGEN, 2015).

Aproximadamente 70% das infecções hospitalares provêm da microbiota do paciente, no entanto, oportuno enfatizar que a microbiota exógena responde pela transmissão de microrganismos de outras fontes (SALMON et al., 2015; WHO, 2016; WILLE et al., 2018).

Uma das principais causas de morbimortalidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) são as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Frequentemente os patógenos que provocam essas infecções habitam as superfícies circunvizinhas do paciente, os equipamentos e dispositivos encontrados nos hospitais (DRESCH et al., 2018; RAMPELOTO, 2019) e nos bioaerossóis, caracterizados por partículas infecciosas transmitidas pelo ar (WALTER; HALLER; QUINTEN, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019; TOLABI; ALIMOHAMMADI; HASSANVAND, 2019).

O surgimento e a frequência das IRAS estão relacionados a fatores diversos que podem ser categorizados em três principais: agentes microbianos, suscetibilidade do paciente e fatores ambientais. Geralmente as infecções primárias de corrente sanguínea em virtude do uso de cateter venoso central, a pneumonia associada à ventilação mecânica e a infecção do trato urinário (ITU), surgem entre as principais doenças infecciosas na UTI (SIVAGNANASUNDARA et al., 2019; DUBBS SB & SOMMERKAMP SK, 2019).

A Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAVM) é a mais importante e comum infecção sistêmica que acomete os pacientes críticos ventilados mecanicamente nas UTIs, devido ao estado vulnerável destes pacientes (ULLDEMOLINS; RESTREPO; RELLO, 2011).

Estima-se que a PAVM ocorra em 9-27% de todos os pacientes sob ventilação mecânica, sendo o maior risco durante os cinco primeiros dias (KALANURIA; ZIAI; MIRSKI, 2014). Pacientes sob ventilação mecânica apresentam um risco 2-10 vezes maior de morte que pacientes sem ventilação, gerando aumento no tempo de hospitalização, em média, de quatro a nove dias. Ainda, as

taxas de mortalidade podem variar de 24% a 76% dos casos, especialmente quando a pneumonia está associada à *Pseudomonas spp.* ou *Acinetobacter sp.* ambas bactérias Gram-negativas com alta resistência a vários antibióticos (TROUILLET, 2012; GUILLON et al., 2018; SOARES et al., 2020; FONSECA; MENCALHA; PAOLI, 2021).

O estabelecimento da PAVM ocorre frequentemente pela aspiração do conteúdo presente na boca e faringe (MORAIS et al., 2006). Uma vez que os pacientes internados apresentam uma higiene bucal precária, com presença de biofilme e isso pode influenciar na virulência dos microrganismos, aumentando a colonização de patógenos que podem ser aspirados pela orofaringe para o pulmão contribuindo para a instalação da pneumonia nosocomial (hospitalar) (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (SES)- Manual de odontologia hospitalar 2012). Ainda, a presença do tubo endotraqueal é um fator de risco importante, pois resulta em uma violação dos mecanismos de defesa natural (reflexo da tosse, da glote e da laringe) contra a microaspiração ao redor do manguito do tubo. Além disso, os patógenos também são constantemente impulsionados para o pulmão pela pressão positiva exercida pelo ventilador mecânico (HUNTER, 2012).

Diante disso, é evidente que a higienização bucal deficitária influencia diretamente na elevação de pacientes com PAVM e conseqüentemente nas taxas de morbidade e mortalidade (BERRY et al., 2007; EDWARD; FELSTEAD; MAHONEY, 2012). Assim, a higiene bucal em pacientes sob terapia intensiva tem sido massivamente estudada e as evidências alertam para a necessidade de se implementar um pacote de medidas acerca da higiene oral, com protocolos seguros e fármacos que sejam efetivos e eficazes na descolonização da orofaringe (BELLISSIMO-RODRIGUES & BELLISSIMO-RODRIGUES, 2012).

De maneira geral, o cuidado bucal em UTI tem baixa prioridade, uma vez que o maior foco e importância neste local são dados para a estabilização da condição clínica e a manutenção da vida do paciente (CUTLER & DAVIS, 2005; GRAP, 2009). Este fator pode ser minimizado com a implementação de um protocolo padronizado de cuidados bucais com o objetivo de aumentar a frequência e a qualidade do cuidado bucal fornecido ao paciente (FRANCO et al., 2014).

No entanto, considerando que a microbiota da cavidade bucal representa uma ameaça aos pacientes críticos, algumas estratégias para prevenir e/ou tratar a colonização têm sido investigadas, como a profilaxia antibiótica e o uso de antissépticos (OLIVEIRA; ZAGALO; CAVACO-SILVA, 2014; LAU et al., 2015).

Entretanto, o uso contínuo de antibióticos profiláticos aumenta o risco da indução e seleção de microrganismos resistentes e, portanto, não tem sido recomendado (LAMBERT et al., 2013; KIYOSHI-TEO & BLEGEN, 2015). Dentre os antissépticos utilizados está o gluconato de clorexidina, um agente antimicrobiano com amplo espectro de atividade contra Gram-positivos, e com menor eficácia contra Gram-negativos (HUA et al., 2016).

Diante do exposto, o desenvolvimento de intervenções terapêuticas inovadoras e mais eficientes na prevenção e/ou tratamento PAVM é de extrema importância clínica (KOBAYASHI et al., 2017; SOUZA et al., 2017). Nesse contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), tem sido considerada uma intervenção terapêutica muito promissora para a prevenção e/ou tratamento de patógenos microbianos (HUANG et al., 2012).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) surge como um método antimicrobiano com significativa redução microbiana, sendo uma modalidade terapêutica que utiliza a irradiação luminosa em um determinado tecido ou microrganismo previamente exposto à ação de um corante fotoativado inerte (fotofármaco ou fotossensibilizador), o qual deve ser sensível ao comprimento de onda da luz utilizada. Posteriormente à interação da luz com uma substância fotossensibilizadora ocorre um estresse oxidativo que pode induzir a citotoxicidade celular, promovendo a morte dos microrganismos por reação com o DNA e membrana plasmática com inibição enzimática e mudanças nos componentes celulares teciduais (JORI et al., 2006; SPERANDIO, 2009). As células visadas pela aPDT são todos os tipos de microrganismos (bactérias, fungos e parasitas), incluindo vírus, e provaram ser eficazes contra membros representativos de todos eles.

No campo da dermatologia, a aPDT foi testada com resultados promissores em diferentes infecções, como úlceras crônicas, acne, onicomicose e outras micoses cutâneas, bem como na leishmaniose. Portanto, apresenta-se como uma possível opção de tratamento contra os agentes causadores de infecções de pele e / ou mucosas (PEREZ-LAGUNA et al., 2018). Estudos *in vitro* empregando a aPDT em bactérias *Cutibacterium acnes* apresentaram ações efetivas antimicrobianas a este microrganismo (De ANNUNZIO et al. 2018; BARROSO et al. 2021). Uma revisão sistemática apresentou artigos envolvendo pacientes contaminados por fungos em infecções primárias em pele e cabelo e unhas, sendo abordados em ensaios clínicos, relatos de casos e resumos de conferências e demonstrou a eficácia da

aPDT no tratamento destas oncomicoses e outras infecções superficiais (SHEN et al. 2020). Em um estudo *in vitro* realizado para identificar os efeitos biológicos e os mecanismos de morte celular com o emprego da aPDT e um FS (feoforbídeo, produto de degradação da clorofila) no tratamento do protozoário causador da *leishimaniose amazonenses* (MIRANDA et al. 2017) indicou um potencial da aPDT para a morte celular.

Ainda, um estudo *in vitro* demonstrou que a aPDT foi capaz de reduzir o biofilme de tubo endotraqueal em 99,9%, após uma única aplicação da terapia (BIEL et al., 2011; SOARES et al., 2020). Assim, a aPDT tem demonstrado ser um recurso promissor no tratamento de patógenos microbianos.

2 OBJETIVOS

Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da aPDT utilizando dois fotossensibilizadores (fenotiazínico e urucum) e diferentes tempos de tratamento.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os microrganismos por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento Genético;
- Avaliar a resistência ou sensibilidade bacteriana a determinados antibióticos.
- Avaliar a eficácia antimicrobiana da aPDT utilizando o fotossensibilizador fenotiazínico (azul de metileno + azul de toluidina) na microbiota oral;
- Avaliar a eficácia antimicrobiana da aPDT utilizando o fotossensibilizador urucum na microbiota oral;
- Comparar a ação antimicrobiana entre os fotossensibilizadores aplicados na aPDT com a solução de clorexidina a 0,12%;
- Avaliar se o tempo de tratamento interfere na atividade antimicrobiana;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PNEUMONIA

A pneumonia é uma doença respiratória relacionada a processos inflamatórios agudos ou crônicos do parênquima pulmonar (região na qual ocorrem as trocas gasosas) tendo como patógenos bactérias, vírus, fungos e micoplasmas (TOEWS, 1986) ou outros processos que causam no aparelho respiratório a sua inflamação ou infecção (MATOSO & CASTRO, 2013). Sendo a de origem bacteriana a mais frequente (WELTE; TORRES; NATHWANI, 2012; MATOSO & CASTRO, 2013). Três a cada 10 pacientes diagnosticados com a doença, tem como principal agente causador a bactéria pneumococo (ou *Streptococcus pneumoniae*) (WELTE; TORRES; NATHWANI, 2012; DRIJKONINGEN & ROHDE, 2014).

Geralmente a pneumonia é classificada em pneumonia comunitária (adquirida na comunidade) ou pneumonia nosocomial (chamada de pneumonia relacionada à assistência) definida como pneumonia adquirida no hospital (PAH) sendo tratada na própria unidade de internação e a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAVM), este tipo de pneumonia pode se desenvolver após 48 horas da intubação do paciente, não tendo sido identificada sua presença no momento da internação (VARELLIS, 2018).

As bactérias são os principais patógenos associados à pneumonia, no entanto os padrões patológicos dos microrganismos envolvidos não são muito bem esclarecidos. A maior parte dos estudos tem enfoque na evolução clínica e tratamento (ROCHA NETO; LEITE; BALDI, 2013). Frequentemente a fisiopatologia da PAVM começa na grande maioria dos casos com a migração por aspiração ou inalação de microrganismos patógenos da cavidade oral para o trato respiratório inferior (brônquios) (BELLISSIMO-RODRIGUES & BELLISSIMO-RODRIGUES, 2012; CILLONIZ et al., 2016). Ainda, os pacientes com doença periodontal podem sofrer a colonização das vias aéreas superiores por patógenos pulmonares, em virtude dos microrganismos presentes no biofilme oral que favorecem esta migração. Presentes em altas concentrações na saliva, estes podem ser aspirados para o pulmão favorecendo o desenvolvimento das infecções respiratórias (ZUANAZZI et al., 2010).

A presença de biofilme em pacientes debilitados pode propiciar a exacerbação da placa bacteriana, o que promoverá a interação entre microrganismos nativos como bactérias periodontais, como a *Porphyromonas gingivalis* com os patógenos respiratórios, como a *Pseudomonas aeruginosa* (RORIZ; BOAVENTURA; DALBELLO, 2014). Autores reforçaram que patógenos bucais influenciam diretamente sendo considerados os principais responsáveis pelas PAVM (FONSECA et al., 2017). Posteriormente a migração para o pulmão, os microrganismos envolvidos colonizam e invadem a região. Considerando o quadro de imunodepressão dos pacientes da UTI, até mesmo patógenos de média e baixa virulência podem estar envolvidos neste comprometimento. Forma-se exsudato inflamatório que rapidamente se acumulam nos bronquíolos e alvéolos, dificultado a hematose e levando ao quadro clássico de insuficiência respiratória (MACHADO et al., 2017).

Frequentemente os agentes etiológicos relacionados com as pneumonias podem ser diversos, sendo estes vírus, fungos, parasitas, micoplasma (são bactérias que causam infecções do trato respiratório e não têm parede celular) e as bactérias, que são as de maior prevalência (WELTE; TORRES; NATHWANI, 2012; SILVA, 2013). As bactérias que geralmente estão relacionados à pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM) na UTI são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus hemolyticus* e *Streptococcus pneumoniae* (BARBOSA et al., 2010).

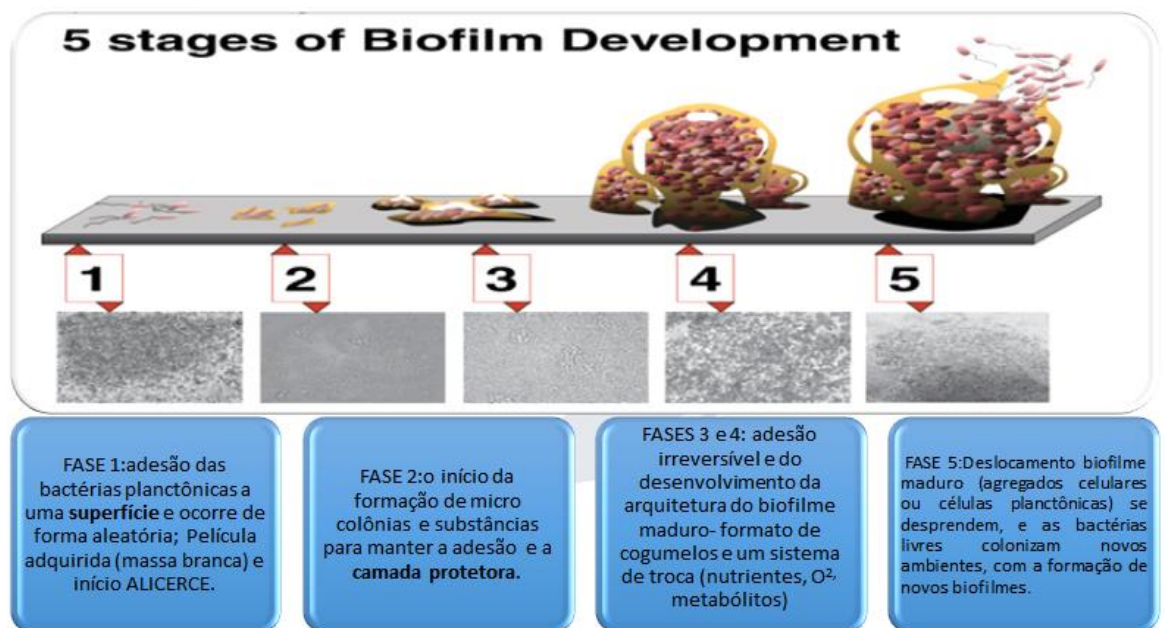
A predisposição de contrair patógenos mais virulentos que aqueles encontrados na microbiota bucal de pacientes saudáveis ou que se encontram hospitalizados em enfermarias, é bem maior em pacientes admitidos na UTIs (LAMBERT et al., 2013). Por ter uma higiene bucal mais deficitária estes pacientes apresentam em seus dentes e mucosas a colonização de patógenos respiratórios, o que favorece o desenvolvimento de um biofilme patogênico com microbiota que pode colonizar os pulmões (ZUANAZZI et al., 2010).

Frequentemente o biofilme bucal é colonizado por espécies bacterianas, fungos e vírus, estando presente em praticamente todos os nichos da cavidade bucal, tendo o dorso da língua e as superfícies dos dentes como principais locais, contudo, também pode se formar sobre qualquer superfície que esteja na cavidade oral, tubo orotraqueal, sondas orogástricas, próteses e aparelhos ortodônticos. Pode ser colonizado por mais de 500 espécies, se destaca por ter alto potencial

patogênico local e sistêmico, propicia aos microrganismos multirresistentes adesão e proteção, inclusive contra agentes antibacterianos (LOBÃO et al., 2016).

O biofilme abrange uma comunidade altamente estruturada de células microbianas fixado em uma matriz autogerada ou derivada do hospedeiro de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) fixado a uma superfície com ou sem vida (NEMEZIO et al., 2017), que apresenta alguns estágios de desenvolvimento (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração apresentando os cinco estágios de desenvolvimento do Biofilme oral

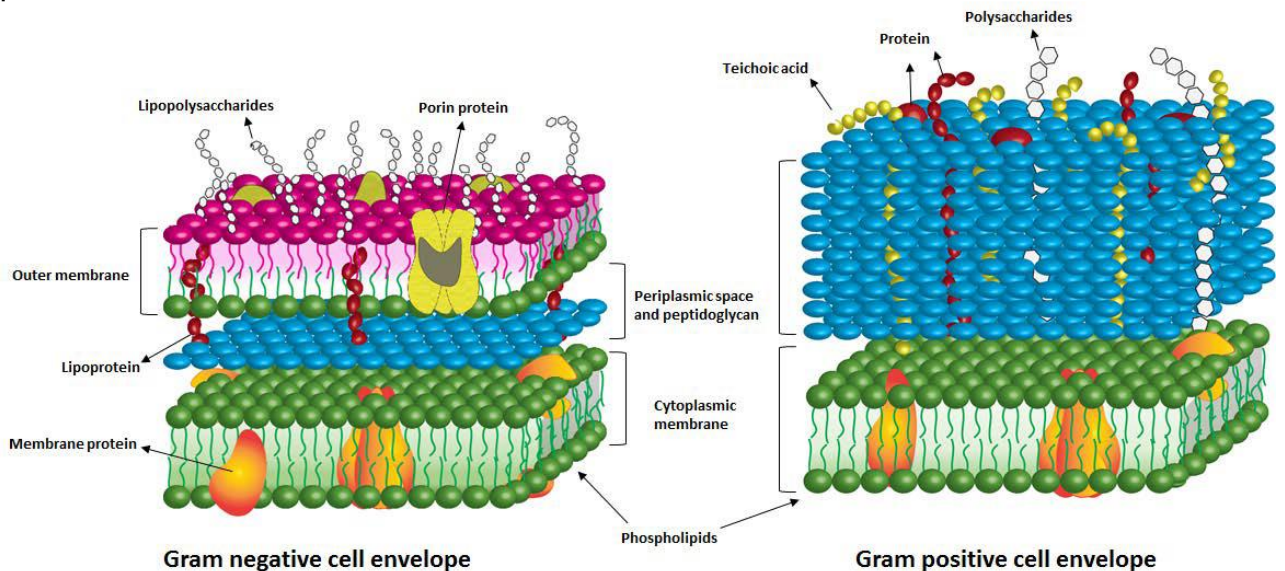


Fonte: Monroe D (2007) Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. PLoS Biol 5(11): e307. doi:10.1371/journal.pbio.0050307 (adaptado pelo autor).

A adesão das bactérias ao substrato pode ser permeada pela superfície celular, a qual se relaciona também com a adesão entre as células microbianas circunvizinhas. Existe similaridade entre a estrutura e composição das paredes celulares e membranas citoplasmáticas entre bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas, entretanto algumas diferenças são significativas (Figura 2). Estas bactérias apresentam membrana citoplasmática, composta por uma dupla camada fosfolipídica associada a proteínas. Essa membrana separa o interior da célula do ambiente externo sendo seletivamente permeável a íons inorgânicos e algumas moléculas orgânicas, favorecendo o controle da absorção e excreção de substâncias metabólicas. Porém, uma parede celular espessa contendo muitas camadas de peptidoglicanos e ácidos teicóicos é característica de bactérias Gram-positivas,

enquanto as bactérias Gram-negativas dispõem de parede celular relativamente delgada formada por camadas de peptidoglicanos envoltas por uma segunda membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS- endotoxinas consideradas substâncias tóxicas) e lipoproteínas (HU et al., 2018).

Figura 2 - Ilustração da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas



Fonte: Liu et al (2015). Journal of Clinical and Translational Research.

Considerando a estrutura e como é composta a parede celular bacteriana, seu comportamento pode ser diferente segundo um processo químico de coloração bacteriológica chamado coloração de Gram. Caso ocorra a coloração da bactéria pelo método de Gram, esta será chamada de Gram-positiva; caso a bactéria não se deixa corar pela coloração de Gram, é considerada Gram-negativa. A diferença de coloração entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas ocorre em virtude de suas paredes celulares terem características distintas (DÓRIA, 2007; CRUZ, 2008).

Com a presença deste biofilme na cavidade oral o odontólogo é o melhor profissional para pôr em prática as diretrizes relacionadas à higiene bucal para a equipe de enfermagem, já que a odontologia deve estar inserida na terapia intensiva, o que diminui ou elimina os focos infecciosos bucais (ANVISA: MANUAL, 2017). As UTIs geralmente dispõem de poucos cuidados com a assistência à saúde bucal dos pacientes admitidos nesta unidade, o que propicia um incremento direto entre má saúde bucal e elevados índices de morbidade e mortalidade (BARBOSA et al., 2010)

A pneumonia associada à ventilação mecânica é uma das infecções que permeiam e são constantes nas UTIs e constitui um grande problema hospitalar devido a sua elevada incidência, acometendo em média 30% dos pacientes graves ou pelo seu sistema imunológico debilitado, com índices de mortalidade que variam de 13% a 60%. Esta complicação influencia a recuperação dos pacientes, aumentando a morbidade e mortalidade dos doentes, assim como o tempo de permanência no leito e as despesas hospitalares (BARBOSA et al., 2010; FRANCO et al., 2014).

Nestes pacientes graves e instáveis, muitas vezes considerados de alta complexidade geralmente há dificuldade em realizar a higiene bucal de forma mecânica, por meio de escova de dente e dentífrício. Entretanto, são utilizados protocolos de higiene bucal com a clorexidina a 0,12 %, alternativa empregada para diminuir os índices de infecção e prevenção das PAVM. Esta prática integra os protocolos de higiene bucal preconizados e implementados na maioria das unidades de terapia intensiva sendo que o emprego da clorexidina a 0,12% é considerada o padrão ouro, obrigatório e definido por legislação federal (ANVISA: MANUAL, 2017; NOGUEIRA & JESUS, 2017; ANVISA: INFECÇÕES, 2017; RIBEIRO; LIMA; BRITO, 2018).

Apesar de a clorexidina a 0,12% ser empregada nas práticas de enfermagem e odontologia para o controle do biofilme bucal, este produto deverá ter seu uso limitado em virtude de seus efeitos colaterais após 15 dias de uso, como o manchamento dos dentes e restaurações, alteração do paladar e sensação de queimação em tecidos moles e lesões descamativas nas bochechas (AUTIO-GOLD, 2008).

Prevenção e o controle da pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) é condição fundamental na maioria das UTIs. Dentre as medidas de prevenção que frequentemente integram o protocolo de prevenção das PAVM, estão a elevação da cabeceira da cama, cuidados bucais com clorexidina (padrão ouro), e testes de respiração espontânea. Ensaios clínicos randomizados citaram que o emprego da clorexidina a 0,12% para a higienização bucal foi associado a pequenas taxas de desenvolvimento de PAVM, entretanto as taxas de mortalidade identificadas foram potencialmente mais elevadas (KLOMPAS et al., 2014; KLOMPAS, 2017).

A mortalidade associada a este protocolo padrão (emprego da clorexidina a 0,12%) foi pesquisada por análise de regressão logística em uma população

hospitalar geral, evidenciando que estes cuidados bucais estão significativamente relacionados a uma elevação na mortalidade. Autores reforçaram que com esta conclusão é fundamental mais investigações da prática de cuidados bucais com clorexidina a 0,12% em pacientes para os quais falta um benefício baseado em evidências (DESCHEPPER et al., 2018).

Estudos de metanálises evidenciaram que o emprego da clorexidina a 0,12% pode elevar a mortalidade em pacientes não submetidos à cirurgia cardíaca e que este procedimento não diminui as taxas de PAVM. Estes mecanismos que induzem o aumento da mortalidade não são bem definidos. Acredita-se que isto possa ocorrer em virtude da mínima aspiração da clorexidina a 0,12% por alguns pacientes e que devido a esta ocorrência haja o desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (KLOMPAS, 2017; DALE et al., 2019).

A ausência de evidências claras frente ao benefício do emprego da clorexidina a 0,12% na higiene oral e sinais de possíveis danos, além da controvérsia na literatura sugerem que são necessárias mais pesquisas para investigar este método de prevenção da PAVM bem como definir outros protocolos que promovam menos eventos adversos (KLOMPAS, 2017).

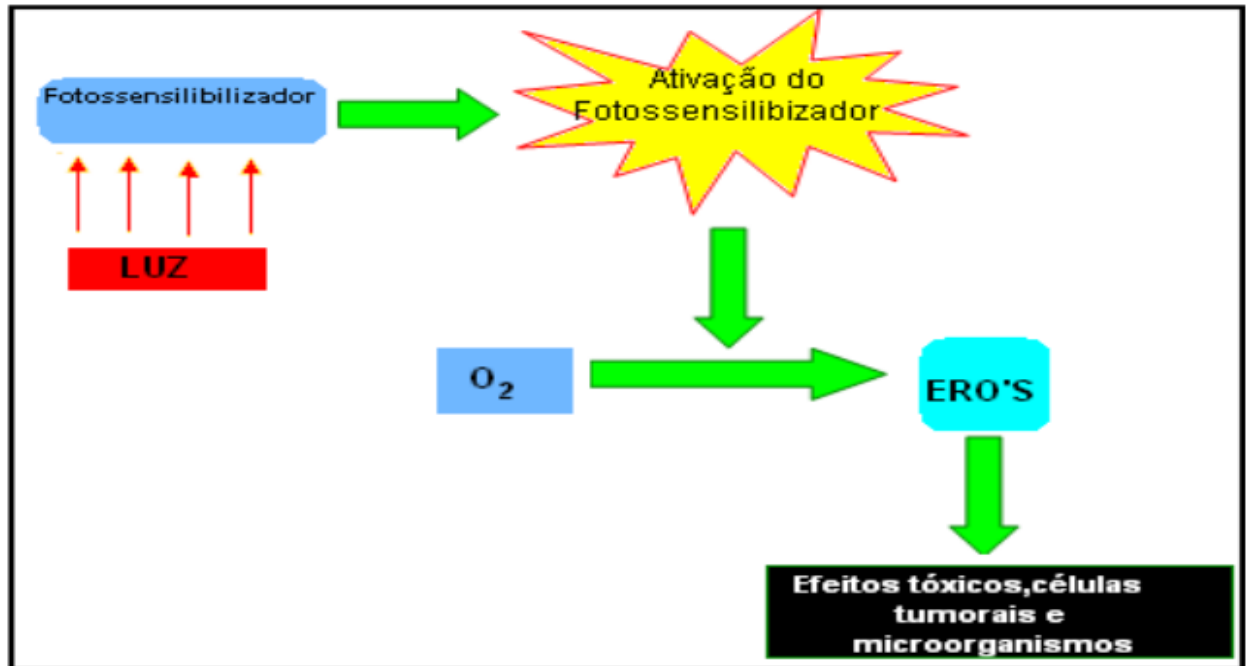
3.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

É fundamental que o odontólogo procure alternativas para atuação e aplicação de procedimentos mais efetivos, assim sendo a utilização de novas tecnologias permitirá que suas intervenções sejam mais eficientes trazendo benefícios aos seus pacientes. A aplicação do efeito antimicrobiano com introdução da terapia fotodinâmica (do inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy- aPDT*) como principal ferramenta no processo de higienização bucal de pacientes debilitados na UTI demonstra a capacidade dos profissionais em se adequarem a frequente evolução que envolve a odontologia, uma ciência que vem progredindo ao longo dos anos, exigindo dos cirurgiões-dentistas uma postura receptiva frente as novas alternativas de tratamentos (VARELLIS, 2018).

Quando uma fonte de luz é associada a um agente fotossensibilizador (FS) para a morte bacteriana, está sendo empregada a terapia fotodinâmica antimicrobiana (GARCEZ et al., 2015) (Figura 3). A irradiação realizada com fontes de luz em diferentes comprimentos de onda tem sido utilizada na aPDT em virtude de esta ter penetração eficaz nas células (HUANG et al., 2012). Relatos presentes

na literatura demonstraram que a destruição ou inativação microbiana pode ocorrer com a interação entre os lasers ou leds e os fotossensibilizadores (FSs) que absorvem estes comprimentos de onda, como o azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita (ROLIM et al., 2012; REINIERS et al., 2014; MELO et al., 2015;).

Figura 3 - Esquema do mecanismo de ação da Terapia fotodinâmica



Fonte: De Paoli, (2005) (adaptado).

Os FSs pertencentes ao grupo dos fenotiazínicos, tais como azul de toluidina (TB) e azul de metileno (AM) têm sido avaliados quanto à erradicação de microrganismos. São conhecidos como FSs de primeira geração sendo inicialmente investigados para PDT de cânceres. Esses FSs são comumente empregados na aPDT devido à sua alta afinidade de ligação a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (VILELA et al., 2012).

Tanto AM e TB tem boa penetração tecidual, custo reduzido e baixa toxicidade resultando em uma tolerância tecidual aceitável. Frequentemente estes FSs são empregados em associação à radiação de luz visível, uma vez que possuem características que propiciam ampla aplicabilidade na aPDT, incluindo o espectro de excitação desses compostos que permite ação em tecidos mais profundos (BUCK, 2009). Com relação a aPDT, foi demonstrado que os corantes fenotiazínicos tem como alvo o DNA citoplasmático (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003).

Estes FSs AM e TB são comumente empregados tanto no controle de infecção local quanto na terapia fotodinâmica oncológica, sendo que nestas situações a aplicação tópica diretamente sobre os tecidos e a pele foi indicada (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019).

Estudos publicados salientaram que fenotiazínicos como AM e TB são eficazes em bactérias planctônicas (bactérias livres e dispersas). Além disso, alguns estudos também testaram a eficácia do fenotiazínico contra estruturas de biofilme (bactérias em comunidade) (FONTANA et al., 2009; GHORBANI et al., 2018; LI et al., 2021).

Um fator primordial em relação ao FS é a sua concentração. O mercado odontológico utiliza estes com a finalidade antimicrobiana, e os comercializa em duas concentrações de AM 0,005% (50 µg/mL) e 0,01% (100 µg/mL). Geralmente a primeira concentração é indicada em casos onde não haja exsudato, sangue, fluido gengival, saliva ou qualquer outro tipo de diluente ou conteúdo proteico, como canais radiculares e superfície dental (após o preparo protético ou cavitário). Já na presença destas substâncias, opta-se pelo AM a 0,01%, em uma maior concentração (EDUARDO et al., 2015).

Por apresentar alta absorção de luz na região espectral de 598 nm a 660 nm, o corante AM, é muito empregado na aPDT pela sua maior penetração por meio de tecidos biológicos, além de possuir custo reduzido e fácil manuseio e aplicabilidade (CARVALHO, 2002). O emprego do AM como fotossensibilizador usado na aPDT justifica-se por ele proporcionar efeito antimicrobiano eficaz e por necessitar de um menor tempo de irradiação para ser ativado (WILSON, 2004).

Os corantes fenotiazínicos, como AM e TB foram os fármacos FSs mais frequentemente empregados e estudados na literatura para o tratamento de infecções bucais comumente usados na aPDT (LONGO & AZEVEDO, 2010; GHORBANI et al., 2018). Diversos estudos clínicos relataram a aplicação da aPDT mediada por FSs no tratamento de periodontite e na descontaminação endodôntica (GARCEZ et al., 2015; FILIPINI et al., 2019; JAVALI et al., 2019; FIGUREDO-JÚNIOR et al., 2021; LI et al., 2021). Estudos *in vitro* com suspensões bacterianas derivadas de amostras de dentina infectadas foram realizados utilizando estes FSs como o AM. Os principais achados salientaram que ambas as concentrações testadas, 25 e 50 µg/mL (0,0025% e 0,005%) foram efetivas na geração de efeito bactericida fotodinâmico contra as culturas bacterianas testadas. Empregou-se o laser vermelho com comprimento de ondas de 660 nm na potência de 40 mW ,

sendo que dentre as 3 diferentes densidades de energia testadas (6,8; 20,55 e 61,65 J/cm²) a maior densidade empregada proporcionou os melhores efeitos bactericidas quando combinada com as soluções fotossensibilizadoras de AM (LONGO & AZEVEDO, 2010).

O efeito bactericida antimicrobiano da aPDT sobre cepas de *Staphylococcus aureus* foi avaliado usando diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL) de composto fenotiazínicos em solução 1:1 de TB e AM combinado com luz LED ($\lambda 632 \pm 2$ nm) usando densidades de energia variadas (12; 9.6; 7.2; 4.8 e 2.4 J/cm²). Foi estabelecida a metade da máxima concentração inibitória (IC₅₀) para medir a efetividade da solução na inibição do crescimento bacteriano. IC₅₀ representa a concentração requerida para 50 % de inibição *in vitro*. O IC₅₀ encontrado foi de 19,10 µg/mL. Quando a aPDT foi utilizada, houve inibição significativa acima de 70 % sendo detectada para todas as concentrações da fotossensibilização (p <0,0001), exceto 6,25 µg/mL. Conclui-se que, uma aplicação única de aPDT, usando densidade de energia de 12 J/cm² associada a 12,5 µg/mL (81,52%) ou 25 µg/mL (91,57%) proporcionou maior inibição *in vitro* de *S. aureus* (OLIVEIRA et al., 2017).

Fungos oportunistas como a *Candida albicans* produzem infecções superficiais e sistêmicas, especialmente em indivíduos com queda de imunidade, sendo que a capacidade destes fungos em gerar biofilmes é um processo imprescindível para sua colonização e virulência. Os efeitos da Apdt foram avaliados utilizando o corante TB como FS em diferentes concentrações (0.01; 0.02; 0.05 e 0.10 µg/mL) empregando a irradiação com LED (Light Emitting Diode-Diodo Emissor de Luz), vermelho com potência de 0,073 W , comprimento de onda de 630 nm, sendo avaliados frente a viabilidade de biofilmes produzido por *C. albicans* em diferentes estágios de desenvolvimento. Comprovou-se que aPDT é efetiva na terapia antifúngica inclusive contra infecções relacionada a biofilmes em diversas fases de desenvolvimento (PINTO et al. 2018).

A higiene bucal em pacientes com má-oclusões que utilizam aparelhos ortodônticos pode ser prejudicada e tornar estes pacientes propensos a desenvolver doenças periodontais e cárie. O acúmulo de biofilme em virtude da dificuldade de higiene bucal causada por esses dispositivos ortodônticos afeta a saúde periodontal. Foi empregada a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) como auxiliar no controle antimicrobiano destes pacientes, sendo utilizado a PDT com um composto de fenotiazina (AM + TB, 1:1,12,5 µg) como agente fotossensibilizador associado

com irradiação LED vermelho ($\lambda 640 \pm 5$ nm, 110 mW, 294 s, 30 J/cm²). Esta terapia associada ao uso de compostos fenotiazínicos e LED vermelho foi capaz de diminuir o número de unidades formadoras de colônias nos pacientes (SOARES et al., 2019).

Bixa orellana L., popularmente conhecida como "urucum", é uma planta nativa do Brasil. As sementes são usadas para produzir um corante amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, têxteis, tintas e cosméticos (VILAR et al., 2014). O urucum é um produto empregado na medicina tradicional, sendo que suas folhas são utilizadas para higiene bucal, antiemético, e como gargarejo para dores de garganta; já as sementes usadas como purgativas, antipruriginosas e para tumores bucais (PAMPLONA-ROGER, 1998).

Os extratos etanólicos das folhas e sementes de *Bixa orellana* L. tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada e demonstraram atividade contra todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e a levedura *C. albicans*. A atividade parece ser mais pronunciada no extrato de folhas. Os resultados forneceram suporte científico para o uso de *B. orellana* L. em remédios, especialmente como gargarejo para dores de garganta e higiene bucal (FLEISCHER et al., 2003).

Esse corante natural, o urucum, é um dos poucos que são aceitos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), devido ao fato de não ser tóxico (VILAR et al., 2014). O uso de corantes vermelho / amarelado, como a curcumina e o urucum estão sendo pesquisadas para aplicação na aPDT. Devido às suas características positivas, principalmente a falta de atividade mutagênica e citotóxica (GONÇALVES et al., 2018), aliada aos resultados promissores relatados por estudos de laboratório quanto ao seu efeito antimicrobiano (CUONG & CHIN, 2016) o extrato de *Bixa orellana* L. poderia ser considerado como um agente fotossensibilizador. Desta forma, ambos os fotossensibilizadores não apresentam riscos aos pacientes (OLIVEIRA et al., 2017; SILVA JR et al., 2019).

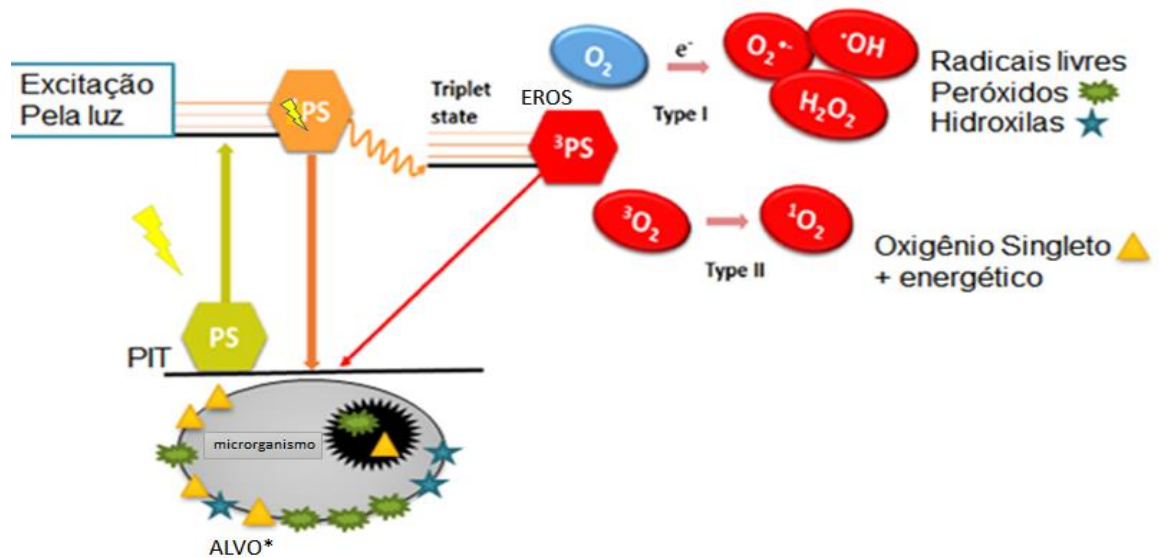
Um estudo clínico randomizado se propôs a verificar se a aPDT associada ao extrato de *Bixa orellana* L. (corante) e diodos emissores de luz (LEDs) azuis seria eficaz na diminuição da halitose. A *Bixa orellana* L. é um FS natural, inovador e avermelhado, que teve sua aplicabilidade como FS por 2 minutos na pré-irradiação associado ao LED azul no comprimento de onda 395-480 nm por 20 segundos 9,6 J por ponto em um total de 6 pontos. O estudo reforçou que a halitose é um tema que ainda merece muitos estudos, porém sugere que a aplicação diária da aPDT com LED azul e *Bixa orellana* L. resultou na mesma tendência de redução da halitose que a relatada na literatura, contudo a terapia com LED azul pode favorecer um

protocolo de tratamento mais acessível, pois a maioria dos dentistas já tem essa fonte de luz presente nos aparelhos fotopolimerizadores (GONÇALVES et al., 2018).

Um produto clinicamente testado eficaz na remoção de cáries dentárias foi associado ao urucum (*Bixa Orellana L.*) com a finalidade de melhorar sua ação antimicrobiana. Foi realizado o tratamento combinado de Papacarie Duo™ com urucum (Papa Urucum™) com a intenção de criar ferramenta efetiva para o tratamento de cárie dentária. O extrato do urucum foi obtido do pericarpo das sementes que contém um pigmento primário solúvel em água (cis-bixina) com quantidades pequenas de outros carotenóides. Diferentes concentrações de Urucum, associadas ou não a Papacarie Duo™, foram avaliadas em um trabalho *in vitro*. Este produto demonstrou sua aplicabilidade como um método químico-mecânico para remoção a cárie dentinária, bem como sendo um produto potencial para o emprego na aPDT. A aplicação do Papa Urucum™ não apresentou citotoxicidade, e apresentou um espectro de absorção UV pico em torno de 460 ± 20 nm, o que é compatível com a luz azul na ativação para uso da PDT (SILVA JR et al., 2019).

A terapia fotodinâmica antibacteriana é uma abordagem promissora no tratamento de infecções bacterianas resistentes aos antibióticos. A utilização da aPDT para efeitos antimicrobianos necessita de algumas variáveis, como a luz com comprimento de onda próprio que ative o fotossensibilizador que na presença de oxigênio, irá propiciar a formação de radicais livres e do oxigênio singleto (espécies reativas do oxigênio), que promoverão a destruição tecidual de maneira rápida após penetração nas células dos microrganismos, sem propiciar resistência bacteriana e danos teciduais (LIU et al., 2015) (Figura 4).

Figura 4 - A reação de fotossensibilização seguida de dois mecanismos (tipo I e tipo II)



Fonte: Liu et al (2015). Journal of Clinical and Translational Research (adaptado).

A maior parte dos microrganismos bucais, excetuando-se alguns gram-positivos como *Actinomyces odontolyticus* e *Porphyromonas gingivalis* (realizam a síntese de porfirinas endógenas) não absorvem a luz dos lasers de baixa intensidade. Assim sendo é necessário o emprego de um produto de absorção óptica atóxico que ao se unir a parede celular bacteriana promova a atração da luz laser para si (TROUILLET, 2012).

O processo tem como base a presença de matéria orgânica e sua foto-oxidação. Toda essa terapia é um processo fotodinâmico em que a excitação eletrônica do agente fotossensibilizador irá gerar os mecanismos de ataque fotoquímico a biomoléculas divididas em duas classes: o tipo I (mecanismo de transferência de elétrons- ou mecanismo radicalar) e o tipo II (mecanismo de transferência de energia) (VATANSEVER et al., 2013).

A reação de fotossensibilização decorre da excitação eletrônica do corante pela luz, seguida de dois mecanismos (tipo I e tipo II), sendo que esta tem início com a geração de espécies de tripletos, que geralmente tem uma sobrevivência maior e apresentando uma reatividade típica de espécies birradicalares. A reação dos tripletos ocorre tanto por transferência de elétrons produzindo radicais livres (tipo I), quanto pela transferência de energia que pode gerar outras espécies excitadas (tipo II), dentre elas o oxigênio singleto (HUANG et al., 2012; REINIERS et al., 2014). Acredita-se que as reações tipo I e tipo II ocorram simultaneamente durante a aPDT

e a proporção da ocorrência entre os dois depende do tipo de FS administrado e do microambiente no qual a aPDT é aplicada (LIU et al., 2015).

Na reação tipo I a energia luminosa é transferida da molécula excitada para a biomolécula (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) pelo mecanismo radicalar (ou seja, transferência de elétrons), resultando na formação de espécies reativas do oxigênio, como os radicais livres como superóxidos, altamente tóxicos aos microrganismos, propiciando danos diretos às biomoléculas. As espécies tripletos são as maiores causadoras destes danos. Contudo no mecanismo tipo II a transferência de energia de excitação é feita para o oxigênio molecular com a geração do oxigênio singleto, altamente citotóxico por ser muito eletrofílico (HUANG et al., 2012; REINIERS et al., 2014).

A formação de espécies reativas do oxigênio, ou seja, o mecanismo tipo I, está presente em 5% da reação. Entretanto, no mecanismo tipo II, se tem 95 % da reação, sendo está a mais desejável, em virtude da apoptose que ela proporciona, que contrária a necrose, não causa injúrias aos tecidos adjacentes. Com a morte celular programada (apoptose), a célula sofrerá um encolhimento com formação de vesículas (corpos apoptóticos) posteriormente fagocitados pelos macrófagos. Não é identificado lise celular, bem como não há o extravasamento do conteúdo citoplasmático, prevenindo lesão tecidual. Com isso é possível afirmar que a aPDT é uma terapia segura e eficaz (KOCHEVAR et al., 2000; QUEIROGA, 2010; SMITH & YELLON, 2011; VATANSEVER et al., 2013; NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019; CHAVES LAMARQUE et al., 2020).

A eliminação de bactérias com uma fonte de luz operando em baixa intensidade tem sido demonstrada em diversas pesquisas, imediatamente após estes microrganismos terem sido sensibilizados por uma quantidade mínima do corante (FSs) (ROOD et al., 1992; AHMED & NIEDERMAN, 2001). O efeito fotodestrutivo das espécies reativas do oxigênio em múltiplos alvos intracelulares, incluindo a membrana, pode ser considerado a maior vantagem da aPDT em relação às abordagens antibióticas convencionais, que geralmente incluem um único alvo (ROOD et al., 1992; REINIERS et al., 2014).

A aPDT, terapia baseada na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), é responsável pela morte celular, sendo que o oxigênio singleto é considerado o maior potencial gerado, conforme ilustrado em muitos estudos e portanto, é predominantemente responsável por foto-danos e reações citotóxicas.

Estudos se propuseram a verificar se o oxigênio singleto gerado (reação fotoquímica tipo II) é mais potencial que os radicais livres (reação fotoquímica tipo I) contra o biofilme de *Streptococcus mutans*. Os corantes TB e o novo azul de metileno (NMB) uma nova formulação de FS, foram empregados. Ficou evidenciado que a eficiência da terapia fotodinâmica antimicrobiana de um FS tem uma conexão estreita com a geração de oxigênio singleto por irradiação. De acordo com isso, verificou-se que o TB propiciou melhores atividades contra o biofilme que o NMB devido à maior produção de oxigênio singleto (MISBA; ZAIDI; KHAN, 2018).

A aPDT não é invasiva e não causa a resistência dos microrganismos (SILVA et al., 2019). Essa modalidade antimicrobiana da PDT atende a diversas condições clínicas de forma eficaz e segura, sendo que o efeito fotodinâmico demonstra ter seletividade dupla, à luz e localização preferencial dos fármacos nos microrganismos. A aPDT é considerada um meio promissor para superar as dificuldades no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes (LIU et al., 2015). É uma ferramenta terapêutica que vem sendo estudada no combate da infecção bacteriana intimamente ligada ao biofilme, e permite um meio de dano seletivo às células alvo, poupando células vizinhas (MISBA; ZAIDI; KHAN, 2017).

Autores reforçaram uma característica importante e positiva da aPDT promovida por este tratamento que é a seletividade e segurança. Pesquisas *in vivo* com camundongos induzidos à candidíase oral experimental e tratados com a PDT demonstraram a redução significativa na viabilidade de *C. albicans*, sem gerar efeitos adversos ou queimaduras nos tecidos circunvizinhos dos animais (DOVIGO et al., 2011; CARMELLO et al., 2015). O emprego da aPDT por meio da irradiação luminosa de lasers ou LEDs associada a corantes fotossensibilizantes possibilita que a estrutura alvo seja atingida causando a morte não tóxica de microrganismos (PRAZMO et al., 2016).

Um estudo investigou a aPDT, utilizando o AM como FS estimulado por laser com comprimento de onda de 665 nm, para erradicar bactérias que causam infecção nas próteses articulares. Os autores relatam que a técnica do emprego da aPDT teve efeito bactericida significativo, tendo efeito localizado atingindo a área que requer tratamento promovendo poucos efeitos colaterais sistêmicos. A terapia teve uma ação rápida sem induzir a resistência bacteriana, atingindo efetivamente o microrganismo sobre o tecido circundante e ainda é uma terapia relativamente com baixo custo (BRIGGS et al., 2018).

Em um estudo *in vitro* comparou-se a atividade antimicrobiana da aPDT sobre o biofilme de *Streptococcus mutans* com um grupo experimental controle utilizando o digluconato de clorexidina a 0,12 %, que é o protocolo considerado padrão ouro em UTI. Os autores demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos na viabilidade bacteriana. Assim, os resultados demonstraram que a terapia aPDT, assim como a clorexidina a 0,12%, pode ser uma abordagem empregada no controle do biofilme dental. No entanto, a aPDT apresenta a vantagem de não apresentar efeitos colaterais como a clorexidina (DE SOUZA, 2015).

Apesar desta efetividade da aPDT como agente antimicrobiano, são escassos os estudos que compararam o efeito do digluconato de clorexidina 0,12 %, padrão ouro utilizado em procedimentos clínicos com a atividade antimicrobiana da aPDT. Portanto mais estudos comparando diferentes métodos antimicrobianos com a aPDT são necessários (DE SOUZA, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental *in vitro* que empregou coletas de amostras de biofilme oral de pacientes internados e entubados em UTI, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana da aPDT.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Brasil. O estudo seguiu as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS nº. 466/12 e suas complementares). Aprovação CAAE: 28700619.0.0000.5494.

Os responsáveis pelos pacientes da UTI foram orientados pelo pesquisador sobre os objetivos e procedimentos aos quais eles foram submetidos, além da liberdade de poderem desistir de participarem da pesquisa a qualquer momento sem penalização ou prejuízo algum. Eles permitiram de livre e espontânea vontade a

realização da coleta de amostras do biofilme oral dos pacientes internados e intubados, e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

4.3 AMOSTRA

Foi realizada a coleta do biofilme oral individual dos pacientes envolvidos a partir da autorização do TCLE. Foram colhidas amostras de 3 pacientes independente do gênero com o tempo de intubação entre 24 e 48 horas, sendo que dois não apresentavam pneumonia e um neste período de intubação desenvolveu a PAVM. Todos os pacientes tinham características semelhantes como: eram dentados, com pelo menos 2 dentes inferiores na boca; idades entre 18 e 60 anos; nível de consciência rebaixada, impossibilitados de autocuidados e sem comprometimento de abertura de boca.

Após a intubação, os pacientes recebiam a higienização oral (com digluconato de clorexidina a 0,12% a cada 8 horas), sendo que a coleta das amostras foi realizada imediatamente antes da próxima higienização com clorexidina a 0,12%.

4.4 COLETA MICROBIOLÓGICA

A coleta da amostra foi realizada por meio da técnica “*swab test*”. Resumidamente, foi utilizado um *swab* embebido em solução salina (NaCl 0,5%), friccionado no dorso da língua no sentido póstero-anterior, em seguida a amostra coletada foi identificada e transportada em caixa isotérmica a 4°C imersa em meio *Stuart* (meio de transporte) para posterior cultivo em meios agarizados *Baird Parker* no laboratório de microbiologia da Universidade Brasil.

4.5 SEMEADURA DOS MICRORGANISMOS

O material coletado no *swab* foi transferido para tubos de ensaio contendo 4 mL caldo de cultura TSB - caldo de soja tripticaseína (Merck Darmstadt, Hessen, Alemanha), e estes procedimentos eram realizados em câmara de fluxo laminar (Veco, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Posteriormente a solução foi homogeneizada pelo dispositivo de vórtice por 15 segundos (vortex AD 56 Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brasil) e sucessivas diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram realizadas

com PBS - Solução salina tamponada com fosfato (Merck, Darmstadt, Alemanha). Com ajuda de uma pipeta eletrônica, foram colocados 100 microlitros dessa solução em cada placa de Petri com TSA ágar, (em câmara de fluxo laminar) em culturas únicas para cada diluição e semeadas por meio de uma alça de *Drigalski*.

As placas de Petri foram identificadas para cada paciente da UTI como Amostra 1 e 2 sem pneumonia; Amostra 3 com pneumonia. Essas placas foram colocadas em uma incubadora (com 5 % de CO₂ à 37°C) por 24 horas. A metodologia de coloração de Gram foi empregada para selecionar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

4.6 TÉCNICA DE COLORAÇÃO GRAM

A técnica de coloração Gram foi utilizada para caracterizar as bactérias identificadas. Foram realizadas lâminas de todas as replicações dos grupos experimentais e avaliadas uma a uma na microscopia óptica. Colônias típicas de microrganismos foram submetidas à coloração de Gram e observadas em microscópio de luz. Assim, seria possível caracterizar as bactérias presentes no biofilme nas espécies Gram + e Gram -.

Amostras de todos os pacientes foram coradas pela técnica de Gram a fim de diferenciar microrganismos gram-negativos e gram-positivos em todas elas.

Após este período foi realizada a contagem e a avaliação das características das colônias como, por exemplo, forma, tamanho e cor. Para a caracterização das espécies bacterianas Gram-negativas foi utilizado o sistema Api 20E e para a caracterização das espécies bacterianas Gram-positivas foram realizados os testes de: catalase, coagulase, DNAase, oxidase e hemólise.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

4.7.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Aproximadamente 20 mg de “pellet bacteriano” foram depositados no fundo de tubos de 1,5 ml estéreis, e congelados logo em seguida até que se iniciasse a etapa de extração de DNA. A extração de DNA foi realizada com o kit AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit® (Axygen), seguindo as instruções do fabricante, com uma modificação, onde as amostras foram incubadas com RNase A, por 3 horas, na fase inicial de lise celular. Ao final do processo de extração, o DNA foi eluído pela

adição de 50 µL água ultrapura aquecida a 65°C, e finalmente a solução contendo o DNA foi armazenada a -20°C até sua utilização na PCR (SEBASTIÃO, 2015).

4.7.2 PCR E SEQUENCIAMENTO DO DNA

O DNA obtido na etapa de extração foi utilizado como “template” na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com iniciadores específicos (primers) para o gene da subunidade 16S do RNA ribossomal (16S RNAr) conforme Sebastião (2015). Em seguida, o produto da PCR foi encaminhado para o Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO (UNESP de Jaboticabal-SP) para a realização do sequenciamento sendo amplificado com a enzima AmpliTaq polimerase e BigDye Terminator (Applied Biosystems). Finalmente, a sequência obtida no sequenciamento foi comparada com o banco de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI-GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) através da ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Admitiu-se concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade da sequência. O sequenciamento do DNA do gene 16S rRNA bacteriano teve a finalidade de demonstrar a presença de material genético de microrganismos classificando-os em diferentes gêneros.

Estas informações estavam presentes no Relatório de Sequenciamento enviado pela Empresa Prevet® (laboratório de diagnóstico e sanidade agrícola), responsável pela realização do PCR e Sequenciamento do DNA.

4.8 ANTIBIOGRAMA

As placas foram replicadas, e foi realizado o antibiograma em um sistema de 15 discos de todas as amostras. Considerando a sensibilidade das bactérias a antimicrobianos, o método empregado para tal fim foi o de Kirby Bauer (difusão em placas).

4.8.1 DESCRIÇÃO DO ANTIBIOGRAMA

As placas de petri contendo as amostras dos microrganismos foram replicadas, e após 24 horas do crescimento bacteriano foi realizado o antibiograma. Todo o método foi realizado em câmara de fluxo laminar, sendo que um swab estéril era passado suavemente 3 vezes sobre a placa replicada para coletar amostra do microrganismos e posteriormente este swab foi inserido em tubo de ensaio contendo 100 ml de solução salina estéril (NaCl 0,8%), agitado manualmente por 1 minuto,

para a formação do inóculo bacteriano. Após a avaliação da turbidez do caldo do inóculo, era dispensado na placa de ágar com a pipeta eletrônica 100 µL do inóculo bacteriano. Em seguida, com um swab o inóculo era espalhado sobre a superfície do meio de cultura estéril contido na placa de 14 cm. Esta placa era girada, duas ou mais vezes, ao mesmo tempo em que se fazia o referido esfregaço. Após era feita a deposição dos discos de antimicrobianos sobre a superfície da placa com auxílio de uma pinça estéril, e feito leve pressão sobre eles para uma boa aderência ao meio, decorridos 30 minutos as placas eram invertidas e colocadas na incubadora a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. As placas eram incubadas por 24 horas antes dos resultados serem determinados. A presença ou ausência dos **halos de inibição** do crescimento bacteriano ao redor de cada disco eram analisados.

Os microrganismos identificados como bactéria **Gram- Positiva** foram analisados quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos: Cefalotina 30µg (CFL), Clindamicina 2µg (CLI), Eritromicina 15µg (ERI), Oxacilina 1µg (OXA), Penicilina G 10UI (PEN), Vancomicina 30µg (VAN), Amicacina (AMI-30ug), Ampicilina (10µg (AMP), Ceftazidima 30µg (CAZ), Ciprofloxacino 5µg (CIP), Cotrimoxazol 25µg (SUT), Cloranfenicol 30µg (CLO), Gentamicina 10µg (GEN), Tetraciclina 30µg (TET), Tobramicina 10µg (TOB).

Para as bactérias **Gram- Negativa** foi analisado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos: Cefepime 30µg (CPM), Cefoxitina 30µg (CFO), Cefotaxima 30µg (CTX), Ceftriaxona 30µg (CRO), Amoxicilina+Ac Clavulanico (20/10µg (AMC), Aztreonam 30µg (ATM), Amicacina (AMI-30ug), Ampicilina (10µg (AMP), Ceftazidima 30µg (CAZ), Ciprofloxacino 5µg (CIP), Cotrimoxazol 25µg (SUT), Cloranfenicol 30µg (CLO), Gentamicina 10µg (GEN), Tetraciclina 30µg (TET), Tobramicina 10µg (TOB).

Os resultados foram interpretados de acordo com os parâmetros estabelecidos pela pelo CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015; CLSI, 2019). O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi definido seguindo a metodologia descrita por Krumperman ,1983. O IRMA foi calculado pela razão entre o número de antibióticos aos quais o isolado se mostrou resistente (sem a formação de halo de crescimento ou com presença de contaminação no halo) e o número de

antibióticos ao qual o isolado foi exposto. IRMA igual ou superior a 0,2 caracterizou multirresistência.

4.9 CONDIÇÕES DE CULTURA E FORMAÇÃO DO BIOFILME

Após a identificação dos microrganismos (MO), estes foram cultivados isoladamente meio TSB (Merck Darmstadt, Hessen, Alemanha) a 37 °C por 24 horas, quando eram realizados os experimentos, segundo protocolo adaptado de Barroso et al. (2020).

Todas as amostras após crescimento em meio líquido eram replicadas, cultivadas nos meios de cultura apropriados e armazenadas nas mesmas condições de temperatura (sob refrigeração, 8°C).

Foi realizado um pool bacteriano para cada amostra coletada, sendo composto por 100 microlitros (µL) de suspensão bacteriana de cada MO homogeneizadas em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (NaCl 0,8%) obtendo-se uma suspensão de 10^{-5} (escala *Mac Farland*) de microrganismos viáveis.

Para a realização dos experimentos, em cada microtubo (eppendorf) eram depositados 500 µL do pool bacteriano.

4.10 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As amostras coletadas foram aleatorizadas de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais

GRUPO SEM PNEUMONIA (NP)	GRUPO PNEUMONIA (P)
GRUPO SEM PNEUMONIA CONTROLE (NP-C) - amostras sem intervenção	GRUPO PNEUMONIA CONTROLE (P-C) - amostras sem intervenção
GRUPO SEM PNEUMONIA CLOREXIDINA (NP-CLX) -amostras tratadas com clorexidina 0,12%	GRUPO PNEUMONIA CLOREXIDINA (P-CLX) - amostras tratadas com clorexidina 0,12%
GRUPO SEM PNEUMONIA PDT VERMELHO (NP-PDTV) -amostras FS fenotiazínicos e irradiadas LED	GRUPO PNEUMONIA PDT VERMELHO (P-PDTV) -amostras FS fenotiazínicos e irradiadas LED vermelho

GRUPO SEM PNEUMONIA PDT AZUL (NP- PDTA)

-amostras FS urucum e irradiadas LED Azul

GRUPO PNEUMONIA PDT AZUL (P-PDTA)

- amostras FS urucum e irradiadas LED Azul

Fonte: Autoria própria.

GRUPO SEM PNEUMONIA CONTROLE (NP - C): Amostras não receberam nenhuma intervenção.

GRUPO SEM PNEUMONIA CLOREXIDINA (NP - CLX): Amostras tratadas com Clorexidina a 0,12% (padrão ouro UTI);

GRUPO SEM PNEUMONIA PDT VERMELHO (NP - PDTV): Amostras que receberam a aplicação do fotossensibilizador fenotiazínico (Azul de metileno + Azul de toluidina) e a irradiação com LED vermelho.

GRUPO SEM PNEUMONIA PDT AZUL (NP - PDTA): Amostras que receberam a aplicação do fotossensibilizador (Urucum) e a irradiação com LED azul.

GRUPO PNEUMONIA CONTROLE (P - C): Amostras que não receberam nenhuma intervenção;

GRUPO PNEUMONIA CLOREXIDINA (P - CLX): Amostras tratadas com Clorexidina a 0,12% (padrão ouro UTI);

GRUPO PNEUMONIA PDT VERMELHO (P - PDTV): Amostras que receberam a aplicação do fotossensibilizador fenotiazínico (Azul de metileno + Azul de toluidina) e a irradiação com LED vermelho.

GRUPO PNEUMONIA PDT AZUL (P - PDTA): Amostras que receberam a aplicação do fotossensibilizador (Urucum) e a irradiação com LED azul.

Todos os grupos foram subdivididos em 3 tempos de tratamento, 150, 300 ou 600 segundos.

4.11 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

Para o composto fenotiazínico, foi empregada uma preparação do azul de metileno + azul de toluidina na proporção de 1:1, na concentração de 100 µg/mL (0,01%) de cada corante. Cada corante foi manipulado e pronto para o uso (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil), sendo utilizados 50 µL para cada ensaio que empregou o FS, segundo protocolo adaptado de Soares et al. (2019).

O extrato de urucum (extrato do *Bixa orellana* L.), foi utilizado em uma preparação oleosa do produto manipulado na concentração de 20 %, sendo 3 mL da H₂O e 1,88 gramas de óleo de urucum (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil), segundo protocolo de Gonçalves et al. (2018). Houve necessidade realizar uma preparação do urucum devido a sua oleosidade com 2 mL do corante urucum dissolvidos em 50 µL de TWEEN 80 – solubilizante de acordo com o protocolo adaptado de Oliveira et al., 2007. Essa preparação foi utilizada 50 µL em cada ensaio que empregou o FS.

Então as amostras permaneceram incubadas em contato com os FSs, em câmara de fluxo laminar e envoltas em folhas de papel alumínio para evitar qualquer exposição a luz, período de pré-incubação, por 15 minutos.

Para a estimulação do FS foi utilizada uma fonte de luz não ionizante, o diodo emissor de luz (LED) comercial (MMOptics®, São Carlos, Brasil), modo de operação contínuo, comprimento de onda 630 nm ± 10 nm e 450 nm ± 10nm, ambos na potência de 100 mW. A aplicação ocorreu com a ponteira aplicadora em contato com o microtubo (eppendorf) e foram utilizados em 3 diferentes tempos 150, 300 ou 600 segundos, correspondendo a 15 J, 30 J e 60 J, segundo protocolo adaptado de Soares et al. (2019). Os parâmetros empregados na aPDT estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros da Terapia fotodinâmica antimicrobiana

aPDT	Parâmetros	LED VERMELHO	LED AZUL
	Comprimento de onda (nm)	630 nm ± 10 nm	450 nm ± 10nm,
	Energia (J)	15 , 30 e 60	15 , 30 e 60
	Potência (mW)	100	100
	Tempo de irradiação (s)	150, 300 ou 600	150, 300 ou 600
	Número de aplicações	1 sessão	1 sessão
	FS	azul de metileno + azul de toluidina 1:1, concentração de 100µg/mL	urucum 20%, sendo 3 mL da H ₂ O e 1,88 gramas de óleo
	Tempo de pré-irradiação (s)	900	900

FS: fotosensibilizador. Fonte: Autoria própria.

A caneta aplicadora era higienizada com álcool 70% para evitar a contaminação do aplicador com a amostra. Todas as aplicações da aPDT foram feitas pelo mesmo pesquisador.

No final de cada tempo de tratamento os ensaios eram submetidos a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), eram realizados 2 experimentos em duplicatas de 100 μ L distribuídas em placas de *Petri* contendo meio ágar TSA. A suspensão bacteriana era distribuída uniformemente com a ajuda de alça de *Drigalski* estéril e as placas eram incubadas a 37 °C por 24 horas.

4.12 CONTAGEM DE UNIDADE FORMADORAS DE COLÔNIAS

Após esse período, era realizada a contagem direta das colônias em todas as placas, utilizando contador de colônias manual CP608 (Phoenix®) para avaliar a atividade antimicrobiana da aPDT sobre as linhagens bacterianas. Todos os procedimentos foram realizados em duplicatas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC). Após a contagem final de UFC bacterianas, os resultados e foram submetidos às análises estatísticas.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística, utilizou o programa estatístico GraphPad Prism® (versão 5.0, InStat Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Foi realizado o teste de proporção para verificar a presença de diferenças significativas na comparação dos percentuais de resistência e sensibilidade dos microrganismos no antibiograma. Os dados de unidade formadora de colônia (UFC) foram avaliados e analisados por meio da análise de variância one-way (ANOVA), seguido de teste de Tukey (dados paramétricos) ou Dunn (dados não paramétricos), com significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 TÉCNICA DE COLORAÇÃO GRAM

Primeiramente foi realizada a semeadura das amostras de biofilme oral coletadas para identificação da quantidade de microrganismos isolados em cada amostra. Em duas amostras, coletadas de pacientes sem pneumonia (NP), foram identificadas 9 espécies de microrganismos, sendo 3 na amostra (NP-1) e 6 na

amostra (NP-2) de microrganismos do biofilme oral. Para a amostra do paciente com pneumonia (P-1) foram identificadas 6 espécies de microrganismos (Figura 5).

Neste estudo foram identificados 15 microrganismos, sendo 13,3 % de bactérias Gram-negativas e 86,6 % de bactérias Gram-positivas (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação dos microrganismos em Gram-positivos e Gram-negativos

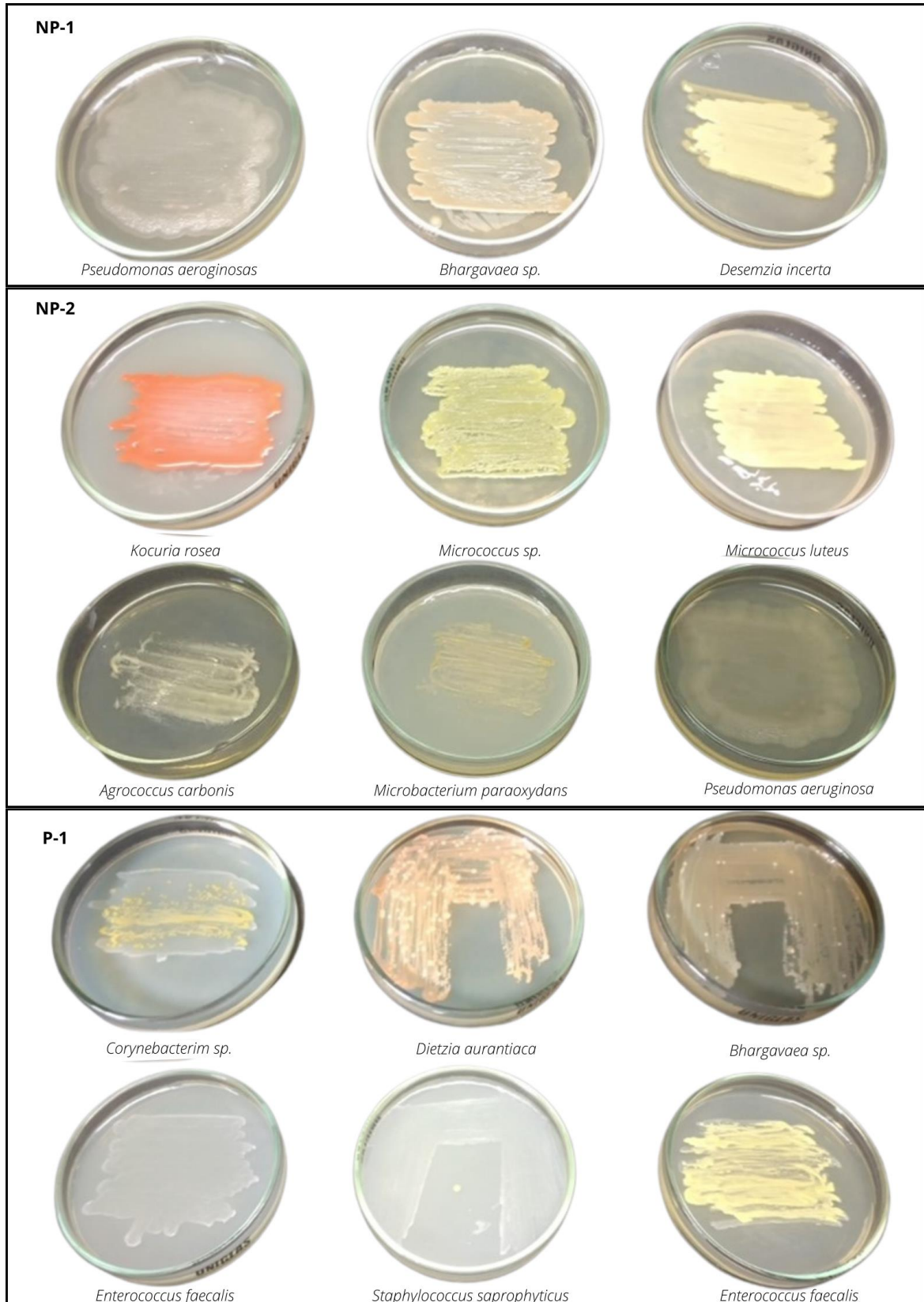
Amostra	Microrganismos GRAM-POSITIVO		Microrganismos GRAM-NEGATIVO	
	N	%	N	%
NP – 1	02	13,33	01	6,66
NP – 2	05	33,33	01	6,66
P – 1	06	40	00	0
TOTAL	13	86,6 %	2	13,3 %

N= número; % = porcentagem; NP = sem pneumonia; P = pneumonia. Fonte: Autoria própria.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Nas amostras do biofilme oral sem pneumonia (NP-1 e NP-2) foi identificado os microrganismos Gram-negativo, *Pseudomonas aeruginosa*. Microrganismos Gram-positivos como a *Bhargavaea sp.* e *Desemzia incerta* foram encontradas na NP-1 e *Kocuria rosea*, *Micrococcus sp.*, *Micrococcus luteus*, *Agrococcus carbonis*, *Microbacterium paraoxydans* foram detectados na amostra NP-2. Já na amostra com pneumonia (P-1) não foram identificadas bactérias Gram-negativas, sendo composta por bactérias Gram-positivas como *Corynebacterium sp.*, *Dietzia aurantiaca*, *Bhargavaea sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*. A bactéria Gram-positiva *Bhargavaea sp.* estava presente nas amostras NP-2 e P-1.

Figura 5 - Cultura de microrganismos isolados



Legenda: NP-1 = microrganismos obtidos do paciente 1 não pneumonia; NP-2 = microrganismos obtidos do paciente 2 não pneumonia; P = microrganismos obtidos do paciente com pneumonia.

Fonte: Autoria própria.

5.3 ANTIBIOGRAMA

A tabela 4 representa os resultados do antibiograma dos microrganismos Gram-negativos que foram isolados dos biofilmes. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos biofilmes NP-1 e NP-2 demonstraram resistência a 12 e 13 antibióticos, respectivamente.

Tabela 4 - Antibiograma das amostras dos microrganismos Gram-negativo, isolados nos biofilmes (NP-1 e NP-2)

Antibióticos	Microrganismos	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NP-1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NP-2)
AMI-30 amicaína	Resistente	Resistente
AMC-30 Amoxicilina + Ac. Clavulânico	Resistente	Sensível
AMP-10 ampicilina	Resistente	Sensível
CAZ-30 ceftazidime	Resistente	Resistente
CRO -30 ceftriaxona	Resistente	Resistente
CFO-30 cefoxitina	Resistente	Resistente
CIP-5 ciprofloxacina	Sensível	Resistente
CPM-30 cefepima	Resistente	Resistente
CLO-30 cloranfenicol	Resistente	Resistente
CTX-30 cefotaxima	Resistente	Resistente
GEN-10 gentamicina	Resistente	Resistente
ATM-30 aztreonam	Sensível	Resistente
SUT-25 Cotrimoxazol	Resistente	Resistente
TET -30tetraciclina	Resistente	Resistente
TOB-10 Tobramicina	Sensível	Resistente

NP = sem pneumonia. Fonte: Autoria própria.

A tabela 5 representa os resultados do antibiograma dos microrganismos Gram-positivos que foram isolados dos biofilmes NP-1 e NP-2. As bactérias *Bhargavaea sp.* e *Desemzia incerta* isoladas dos biofilmes NP-1 demonstraram resistência a 12 e 03 antibióticos respectivamente. Quanto a resistência, os microrganismos dos biofilmes NP-2 demonstraram resistência a 03 antibióticos como a *Kocuria rosea*, já o *Micrococcus sp.* a 13 antimicrobianos, *Micrococcus luteus* apresentaram resistência a 06 antibióticos, o *Agrococcus carbonis* e *Microbacterium paraoxydans* a 09 e 13 antibióticos respectivamente.

PEN-10 penicilina	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente	Resistente
SUT-25 Cotrimoxazo I	Resistente	Resistent e	Sensível	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente
TET-30 tetraciclina	Resistente	Sensível	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
TOB-10 Tobramicina	Resistente	Sensível	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente
VAN-30 vancomicina	Resistente	Sensível	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente

NP = sem pneumonia; P = pneumonia. Fonte: autoria própria.

A Tabela 6 representa os resultados do antibiograma dos microrganismos Gram-positivos que foram isolados do biofilme com pneumonia (P-1) e demonstraram resistência a 15 antibióticos como a *Corynebacterium sp.*, 05 antibióticos como a *Dietzia aurantiaca*, a *Bhargavaea sp.* demonstrou resistência a 13 antibióticos, o *Enterococcus faecalis* a 08 e 13 antibióticos respectivamente e o *Staphylococcus saprophyticus* a 12 antibióticos.

PEN-10 penicilina	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível
SUT-25 Cotrimoxazol	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente
TET-30 tetraciclina	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente
TOB-10 Tobramicina	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
VAN-30 vancomicina	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

P = pneumonia Fonte: Autoria própria.

Para verificar a multirresistência dos microrganismos foi realizado o cálculo do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA), sendo que para os resultados iguais ou superiores a 0,2 estes foram caracterizados com multirresistência.

A tabela 7 demonstra o cálculo do IRMA dos microrganismos Gram-negativos, isolados dos biofilmes (NP-1e NP-2), com valores superiores a 0,2 caracterizando multirresistência.

Tabela 7 - Cálculo do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos dos microrganismos Gram-negativos, isolados dos biofilmes (NP-1e NP-2)

IRMA	Microrganismos	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NP-1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NP-2)
nºR /nº Antib.	12/15 = 0,8	13/15 = 0,86
Resultado	Multi-resist.	Multi-resist.

NP = sem pneumonia; IRMA: cálculo do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos;
Fonte: Autoria própria.

A tabela 8 demonstra o cálculo do IRMA dos microrganismos Gram-positivos, isolados dos biofilmes (NP-1e NP-2), com valores iguais ou superiores a 0,2 caracterizando multirresistência.

Tabela 8 - Cálculo do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos dos microrganismos Gram-positivo, isolados dos biofilmes (NP-1e NP-2)

IRMA	<i>Microrganismos</i>						
	<i>Bhargavaea</i> <i>sp.</i> (NP-1)	<i>Desemzia</i> <i>incerta</i> (NP-1)	<i>Kocuria</i> <i>rosea</i> (NP-2)	<i>Micrococcus</i> <i>sp.</i> (NP-2)	<i>Micrococcus</i> <i>luteus</i> (NP-2)	<i>Agrococcus</i> <i>carbonis</i> (NP-2)	<i>Microbacterium</i> <i>paraoxydans</i> (NP-2)
nºR /nº Antib.	12/15= 0,8	03/15= 0,2	03/15= 0,2	13/15= 0,86	06/15= 0,4	09/15= 0,6	13/15= 0,86
Resultado	Multi-resist.	Multi-resist.	Multi-res.	Multi-res.	Multi-res.	Multi-res.	Multi-res.

NP = sem pneumonia. IRMA: cálculo do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos. Fonte: Autoria própria.

A tabela 9 demonstra o cálculo do IRMA dos microrganismos Gram-positivos, isolados do biofilme (P-1), com valores superiores a 0,2 caracterizando multirresistência.

Tabela 9 - Cálculo do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos dos microrganismos Gram-positivo, isolados do biofilme (P-1)

IRMA	<i>Microrganismos</i>					
	<i>Corynebacterium</i> <i>sp.</i> (P-1)	<i>Dietzia</i> <i>aurantiaca</i> (P-1)	<i>Bhargavaea</i> <i>sp.</i> (P-1)	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> (P-1)	<i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i> (P-1)	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> (P-1)
nºR /nº	15/15=	05/15=	13/15=	08/15=	12/15=	13/15=
Antib.	1	0,33	0,86	0,53	0,8	0,86
Resultado	Multi-resist.	Multi-resist.	Multi-resist.	Multi-resist.	Multi-resist.	Multi-resist.

P = pneumonia. IRMA: cálculo do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos. Fonte: Autoria própria.

A tabela 10 representa os achados referentes a proporção dos microrganismos Gram-positivos resistentes ou sensíveis aos diferentes tipos de antibióticos. A análise estatística mostrou que a Oxacilina (OXA) é estatisticamente ineficaz contra as bactérias Gram-positivas, porém a Amicacina (AMI) apresentou eficácia antimicrobiana significativa em relação aos microrganismos Gram-positivos. Para os demais antibióticos avaliados, os percentuais de resistência e sensibilidade não diferiram de forma significativa.

Tabela 10 – Proporção dos microrganismos Gram-positivos resistentes ou sensíveis aos diferentes tipos de antibióticos (NP 1 e NP-2)

Amostra NP (1+2)			
	Resistente (N)	Sensível (N)	p-valor
AMI – 30 amicacina	1	6	0.0001
AMP-10 ampicilina	2	5	0.076
CAZ-30 ceftazidime	4	3	0.589
CFL-30 cefaloxina	3	4	0.589
CIP- 5 ciprofloxacina	3	4	0.589
CLI- 2 clindamicina	5	2	0.076
CLO-30 cloranfenicol	4	3	0.589
ERI-15 eritromicina	4	3	0.589
GEN-10 gentamicina	3	4	0.589
OXA-1 oxacilina	7	0	< 0,001
PEN-10 penicilina	3	4	0.589
SUT-25 Cotrimoxazol	5	2	0.076
TET-30 tetraciclina	5	2	0.076
TOB-10 Tobramicina	4	3	0.589
VAN-30 vancomicina	4	3	0.589

N= número de microrganismos. Fonte: Autoria própria.

A tabela 11 representa os achados referentes a proporção dos microrganismos Gram-positivos resistentes ou sensíveis aos diferentes tipos de antibióticos. Na amostra pneumonia (P-1), foi observado que os antibióticos estatisticamente ineficazes são CAZ-30 ceftazidime, CFL-30 cefaloxina, CLI- 2 clindamicina, CLO-30 cloranfenicol, ERI-15 eritromicina, Oxacilina (OXA), Cotrimoxazol (SUT), TOB-10 Tobramicina e VAN-30 vancomicina contra as

bactérias Gram-positivas no biofilme P-1. Para os demais antibióticos avaliados, os percentuais de resistência e sensibilidade não diferiram de forma significativa.

Tabela 11- Proporção dos microrganismos Gram-positivos resistentes ou sensíveis aos diferentes tipos de antibióticos (P- 1)

Amostra P			
	Resistente (N)	Sensível (N)	p-valor
AMI – 30 amicaína	2	4	0.221
AMP-10 ampicilina	4	2	0.221
CAZ-30 ceftazidime	6	0	<0,001
CFL-30 cefaloxina	5	1	0.002
CIP- 5 ciprofloxacina	3	3	1.000
CLI- 2 clindamicina	5	1	0.002
CLO-30 cloranfenicol	5	1	0.002
ERI-15 eritromicina	5	1	0.002
GEN-10 gentamicina	2	4	0.221
OXA-1 oxacilina	6	0	<0,001
PEN-10 penicilina	4	2	0.221
SUT-25 Cotrimoxazol	5	1	0.002
TET-30 tetraciclina	4	2	0.221
TOB-10 Tobramicina	5	1	0.002
VAN-30 vancomicina	5	1	0.002

N= número de microrganismos. Fonte: Autoria própria.

A tabela 12 apresenta os resultados da resistência ou a sensibilidade aos diferentes tipos de antibióticos considerando a classificação das bactérias em Gram-Negativo, foi observado que os antibióticos AMI-30 amicaína, CAZ-ceftazidime, CRO-30 ceftriaxona , CFO-30 cefoxitina, COM-30 cefepima , CLO-30 cloranfenicol , CTX-30 cefotaxima , GEN-10 gentamicina, SUT-25 cotrimoxazol e TET-30 tetraciclina não apresentaram eficácia antimicrobiana estatisticamente significativa.

Tabela 12- Proporção dos microrganismos Gram-negativos resistentes ou sensíveis aos diferentes tipos de antibióticos (NP- 1 e NP-2)

GRAM-NEGATIVOS	Amostra NP (1+2)		
	Resistente (N)	Sensível (N)	p valor
AMI-30 ampicilina	2	0	<0,001
AMC-30 Amoxicilina+ Ac. Clavulânico	1	1	1.000
AMP-10ampicilina	1	1	1.000
CAZ-ceftazidime	2	0	<0,001
CRO-30 ceftriaxona	2	0	<0,001
CFO-30 ceftioxitina	2	0	<0,001
CIP-5 ciprofloxacina	1	1	1.000
COM-30 cefepima	2	0	<0,001
CLO-30 cloranfenicol	2	0	<0,001
CTX-30 cefotaxima	2	0	<0,001
GEN-10 gentamicina	2	0	<0,001
ATM-30 aztreonam	1	1	1.000
SUT-25 cotrimoxazol	2	0	<0,001
TET-30 tetraciclina	2	0	<0,001
TOB-10 tobramicina	1	1	1.000

N= número de microrganismos. Fonte: Autoria própria.

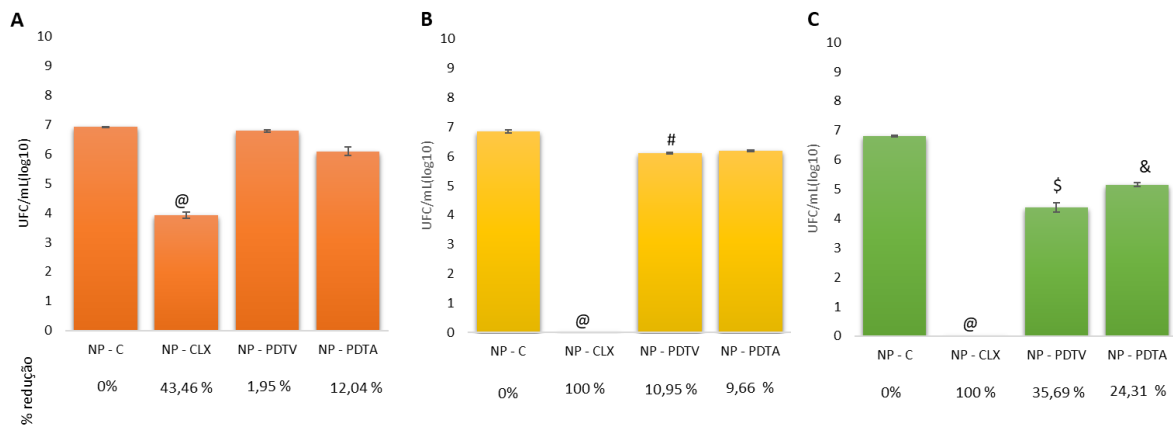
5.4 CONTAGEM DE UNIDADE FORMADORAS DE COLÔNIAS

Os resultados de contagem de unidade formadoras de colônia para o biofilme oral sem pneumonia demonstraram que após 150 minutos de tratamento, as bactérias que receberam a aplicação de clorexidina (NP – CLX), tratamento realizado como controle positivo, reduziu as UFC em 43,46 %. Neste mesmo período de tratamento, quando foi realizado a aplicação da aPDT foi demonstrado a redução de 1,95 e 12,04 % quando utilizado LED vermelho associado com corante fenotiazínico (NP – PDTV) e LED azul associado com corante urucum (NP – PDTA), respectivamente (Figura 6A).

Após 300 segundos de tratamento, as bactérias do grupo NP – CLX apresentaram redução total de UFC, enquanto o grupo NP – PDTV mostrou 10,95 % e o grupo NP – PDTA 9,66 % de redução de UFC (Figura 6B). No último período de tratamento, 600 segundos, pode ser observado que o grupo NP – CLX continuou com redução total de UFC e os grupos tratados com PDT (NP – PDTV e NP –

PDTA) aumentaram a porcentagem de redução de UFC para 35,69 e 24,31 %, respectivamente (Figura 6C).

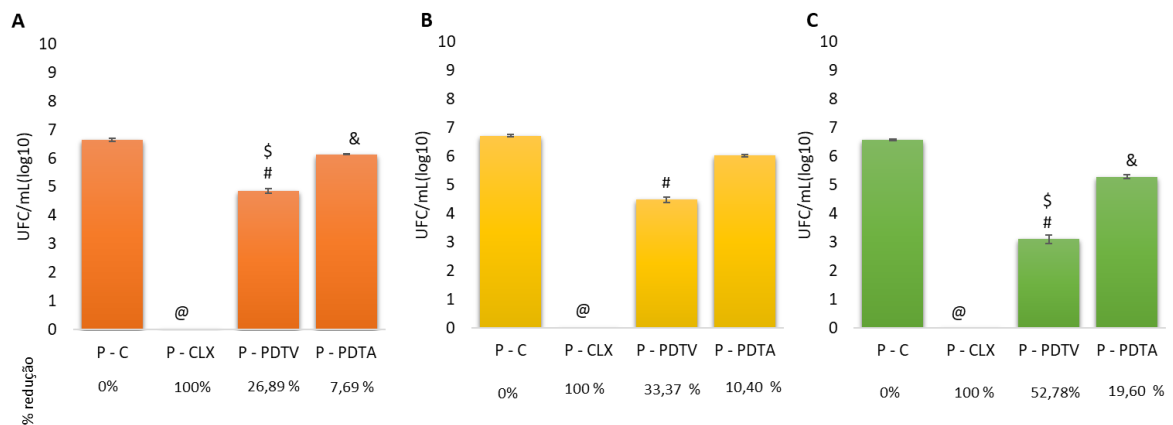
Figura 6 - Redução do biofilme oral sem pneumonia



A) biofilme oral recebeu 150 segundos de tratamento; B) biofilme oral recebeu 300 segundos de tratamento; C) biofilme oral recebeu 600 segundos de tratamento. Diferença estatística @ vs NP – C; NP – PDTV; NP – PDTA; # vs NP – C; \$ vs NP – C; NP - PDTA; & vs NP – C. NP – C = sem pneumonia não receberam nenhum tratamento; NP – CLX = sem pneumonia recebeu tratamento com clorexidina 0,12 %; NP – PDTV: sem pneumonia recebeu tratamento PDT vermelho; NP – PDTA: sem pneumonia recebeu tratamento PDT azul. Fonte: Autoria própria.

A figura 7 mostra os resultados para a contagem de colônia do biofilme oral com pneumonia. Pode ser observado que o grupo P – CLX promoveu redução total de UFC nos períodos tratados. Os grupos que receberam tratamento com aPDT demonstram um aumento progressivo na redução de UFC. O grupo P – PDTV apresentou 26,89%, 33,37% e 52,78% de redução após 150, 300 e 600 segundos de tratamento, respectivamente. Já o grupo P – PDTA demonstrou taxas de redução de 7,69%, 10,40% e 19,60% após 150, 300 e 600 segundos de tratamento, respectivamente.

Figura 7 - Redução do biofilme oral com pneumonia



A) biofilme oral recebeu 150 segundos de tratamento; B) biofilme oral recebeu 300 segundos de tratamento; C) biofilme oral recebeu 600 segundos de tratamento. Diferença estatística @ vs P – C; P – PDTV; P – PDTA; # vs P – C; \$ vs P – C; P - PDTA; & vs P – C. P – C = com pneumonia não receberam nenhum tratamento; P – CLX = com pneumonia recebeu tratamento com clorexidina 0,12 %; P – PDTV: com pneumonia recebeu tratamento PDT vermelho; P – PDTA: com pneumonia recebeu tratamento PDT azul. Fonte: Autoria própria.

A tabela 13 apresenta os dados da UFC na comparação intragrupos, foi observado que nos grupos controle e PDTA do biofilme oral não pneumonia não apresentaram diferença estatística, ou seja, o tempo de tratamento não interferiu nos resultados. Entretanto, nos grupos CLX e PDTV o tempo de tratamento influenciou na redução nas unidades formadoras de colônia. No grupo CLX, a análise estatística demonstrou diferença entre 150 segundos com os grupos 300 e 600 segundos, assim a CLX necessitou de um tempo de no mínimo 300 segundos para que ocorresse a redução total da UFC. Já o tratamento com PDTV, mostrou que conforme aumenta o tempo de tratamento, maior é a redução de UFC no biofilme oral não pneumonia. Para o biofilme oral pneumonia, os grupos controle e CLX não apresentaram diferença intragrupo. Já o grupo PDTV mostrou diferença estatística intragrupo, mostrando que conforme aumenta o tempo de tratamento aumenta a redução de UFC. No grupo PDTA apenas foi observado diferença estatística quando comparado 150 e 600 segundos.

Tabela 13: Comparação intragrupo unidade formadores de colônia (UFC/mL Log10)

Grupos	Tempo de tratamento			p-valor	pós-teste
	150 Segundos	300 Segundos	600 Segundos		
NP-C	6,93 ± 0,31	6,85 ± 0,39	6,81 ± 0,40	0,857	
NP-CLX	3,91 ± 0,55	0	0	< 0,0001	a, b
NP-PDTV	6,79 ± 0,43	6,10 ± 0,70	4,38 ± 0,54	< 0,0001	b, c
NP-PDTA	6,09 ± 1,20	6,18 ± 0,42	5,15 ± 0,19	0,056	
P-C	6,64 ± 0,04	6,71 ± 0,02	6,56 ± 0,00	0,001	c
P-CLX	0	0	0		
P-PDTV	4,85 ± 0,08	4,47 ± 0,00	3,10 ± 0,12	< 0,0001	*
P-PDTA	6,13 ± 0,02	6,02 ± 0,02	5,27 ± 0,03	0,0005	b

Diferença estatística a: grupo 150s difere do grupo 300s; b: grupo 150s difere do grupo 600s; c: grupo 300s difere do grupo 600s; *: todos os grupos diferem estatisticamente entre si. NP – C = sem pneumonia não receberam nenhum tratamento; NP – CLX = sem pneumonia recebeu tratamento com clorexidina 0,12 %; NP – PDTV: sem pneumonia recebeu tratamento PDT vermelho; NP – PDTA: sem pneumonia recebeu tratamento PDT azul; P – C = com pneumonia não receberam nenhum tratamento; P – CLX = com pneumonia recebeu tratamento com clorexidina 0,12 %; P – PDTV: com pneumonia recebeu tratamento PDT vermelho; P – PDTA: com pneumonia recebeu tratamento PDT azul. Fonte: Autoria própria

Na tabela 14 é possível observar a comparação dos tratamentos nos biofilmes orais não pneumonia e pneumonia. A comparação do biofilme oral controle não pneumonia e pneumonia, não apresentou diferença estatística. Já quando comparado os biofilmes orais não pneumonia e pneumonia tratados com CLX, observou que com 150 segundos não foi possível promover redução total das UFC no biofilme oral não pneumonia, diferentemente das amostras pneumonia que mostraram redução total. Também foi possível observar que a PDTV apresentou maior taxa de redução das UFC, em todos os tempos de tratamento, quando utilizado em biofilme oral pneumonia. A utilização da PDTA não mostrou diferença estatística de utilização entre os biofilmes orais.

Tabela 14: Comparação entre biofilme oral não pneumonia e pneumonia unidade formadores de colônia (UFC/mL Log10)

	NP	P	p-valor
150 segundos			
C	6,93 ± 0,31	6,64 ± 0,04	0,083
CLX	3,91 ± 0,55	0	0,005
PDTV	6,79 ± 0,43	4,85 ± 0,08	0,0001
PDTA	6,09 ± 1,20	6,13 ± 0,02	0,932
300 segundos			
C	6,85 ± 0,39	6,71 ± 0,02	0,447
CLX	0	0	
PDTV	6,10 ± 0,70	4,47 ± 0,00	0,0002
PDTA	6,18 ± 0,42	6,02 ± 0,02	0,936
600 segundos			
C	6,81 ± 0,40	6,56 ± 0,00	0,194
CLX	0	0	
PDTV	4,38 ± 0,54	3,10 ± 0,12	0,002
PDTA	5,15 ± 0,19	5,27 ± 0,03	0,191

NP = biofilme oral não pneumonia; P = biofilme oral pneumonia. C = não receberam nenhum tratamento; CLX = tratamento com clorexidina 0,12 %; PDTV: tratamento PDT vermelho; PDTA: tratamento PDT azul. Fonte: autor.

5. DISCUSSÃO

A pneumonia associada à ventilação mecânica é uma infecção adquirida no ambiente hospitalar, que se desenvolve na grande maioria dos casos em virtude da migração por aspiração ou inalação de microrganismos patógenos da cavidade oral para o trato respiratório inferior (brônquios) (FONSECA et al., 2017; VARELLIS, 2018; SOARES, 2020). Constitui um grande problema hospitalar devido a sua elevada incidência, acometendo em média 30 % dos pacientes graves, com índices de mortalidade que variam de 20 % a 50 %. Esta complicação influencia a recuperação dos pacientes, aumentando a morbidade e mortalidade dos pacientes, assim como o tempo de permanência no leito e as despesas hospitalares (KALIL et al., 2016; ANVISA –INFECÇÕES, 2017; LI et al., 2020). Assim, o presente estudo avaliou os efeitos da atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica em biofilme oral coletado de pacientes em UTI.

Após a coleta de amostras do biofilme oral foram identificados 9 microrganismos nas amostras dos pacientes sem pneumonia (NP-1 e NP-2) e 6

microrganismos na amostra do paciente com pneumonia (P-1). A cavidade bucal, em virtude de suas características, favorece a colonização e proliferação constante de diversas populações microbianas presentes no corpo humano. O biofilme oral agrega espécies de bactérias, fungos e vírus, que são geralmente incorporados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas automaticamente pelos microrganismos (MISBA; ZAIDI; KHAN, 2018) e se localiza em praticamente todos os nichos da cavidade bucal, sendo o dorso da língua e as superfícies dos dentes suas principais localizações, entretanto pode se desenvolver também sobre qualquer superfície que esteja na cavidade oral, tubo orotraqueal, sondas orogástricas, próteses e aparelhos ortodônticos. Esta comunidade microbiana pode apresentar elevado potencial patogênico local e sistêmico, e fornecer proteção aos microrganismos multirresistentes, inclusive contra agentes antimicrobianos (LOBÃO et al., 2016; HOMD, 2018; TULLIO et al., 2018).

Dentre os microrganismos presentes nos biofilmes orais coletados neste estudo, foram identificadas *Pseudomonas aeruginosa* que estavam presentes nas duas amostras coletadas dos pacientes sem pneumonia (NP-1 e NP-2). As *Pseudomonas aeruginosa*, são bactérias Gram-negativas aeróbios, dispendo de relevante importância clínica atualmente, pois se apresentam como um patógeno hospitalar com elevada influência no desenvolvimento de infecções nosocomiais respiratórias. Frequentemente reportadas em estudos como microrganismos com alta resistência a vários antibióticos sendo responsáveis pelo desenvolvimento de infecções graves (CANZI & COLACITE, 2016; GUILLON et al., 2018; SOARES et al., 2020). Podem estar presentes colonizando artigos cirúrgicos, medicamentos e outros equipamentos (GASPAR, BUSSATO E SEVERO, 2012).

Ainda, neste estudo foram identificados microrganismos Gram-positivos como *Bhargavaea sp.*, *Desemzia incerta*, *Kocuria rosea*, *Micrococcus sp.*, *Micrococcus luteus*, *Agrococcus carbonis*, *Microbacterium paraoxydans*, *Corynebacterium sp.*, *Dietzia aurantiaca*, *Bhargavaea sp.*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus saprophyticus*.

Foi observado que o biofilme oral pesquisado apresentou patógenos relacionados às infecções respiratórias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Corynebacterium sp.* e outros microrganismos causadores de infecções nosocomiais que atingem pacientes imunodeprimidos como *Dietzia aurantiaca*, *Kocuria rósea*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteos*, *Microbacterium paraoxydans* e *Enterococcus faecalis* (sendo este microrganismo relacionado a

infecções hospitalares e orais) (KOOKEN; FOX; FOX, 2012; BAIO et al., 2013; ANNUNZIO et al., 2017; CHOROST, et al. 2018; SOARES et al., 2020; KOHL et al., 2021; MENDEZ et al., 2022).

Dentre os microrganismos identificados em UTI, a literatura reporta a predominância de bactérias comumente identificadas como resistentes a antimicrobianos, e causadoras de infecções como a PAVM dentre elas as *Pseudomonas aeruginosa* (FONSECA et al., 2017; SOUZA et al., 2017; NAKONIECZNA et al., 2019). Estudos identificaram que o microbioma oral destes pacientes críticos se altera, com predomínio de agentes agressores constituídos por patógenos Gram-negativos multirresistentes confirmados como causadores da PAVM. Algumas espécies do gênero *Corynebacterium sp.*, microrganismo Gram-positivo, têm sido relacionadas a infecções humanas em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pneumonia, septicemia, endocardite (FUNKE; BERNARD, 2011; BAIO et al., 2013; FONSECA et al., 2017; SOUZA et al., 2017; SOARES et al., 2020).

Neste estudo foram identificados microrganismos relacionados a pneumonia nas amostras NP-1 (*Pseudomonas aeruginosa*), NP-2 (*Pseudomonas aeruginosa*) e P-1 (*Corynebacterium sp.*), contudo apenas um indivíduo foi acometido pela PAVM (P-1), demonstrando que outros fatores podem influenciar no desenvolvimento desta doença como a hospitalização prolongada, o emprego excessivo de antibióticos e doenças pré-existentes (FONSECA et al., 2017; VALDERRAMA et al., 2019).

Ainda compondo o biofilme analisado, foram identificadas bactérias bucais como o *Enterococcus faecalis* espécie relacionada a infecções nosocomiais e odontológicas, que se associam a biofilmes em várias superfícies, sendo resistentes a antimicrobianos (FREITAS et al., 2019), bem como outros microrganismos presentes nas mucosas da cavidade oral como a *Desemzia incerta*. Neste biofilme também foram identificadas bactérias frequentes na pele de pacientes ou dos profissionais da saúde como *Staphylococcus saprophyticus*, *Kocuria rósea*, *Micrococcus sp.*, *Micrococcus luteos*. Além disso, ainda foram isolados microrganismos presentes no ambiente hospitalar geralmente dispersos no ar ou depositados em superfícies e equipamentos como *Bhargavaea sp.*, *Dietzia aurantiaca*, *Micrococcus sp.*, *Agrococcus carbonis*, *Microbacterium paraoxydans* (DHANJAL et al., 2011; CHITTPURNA et al., 2012; FOX, 2012; ANANIEVA et al., 2017; PAILHORIÈS et al., 2017; TIAN et al., 2018; CHOROST, et al. 2018; SING;

SING; NERURKAR, 2020; STUBER et al., 2021; KOHL, et al., 2021; MENDEZ et al., 2022).

Do mesmo modo, foi identificada em uma única amostra (P-1), duas espécies de *Enterococcus faecalis*, patógeno com importância crescente como causadores de infecção nosocomial, apresentando resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente empregados para tratamento destas infecções. Os *Enterococcus faecalis* comumente isolados, são responsáveis por 90 % dos casos de infecções com elevado potencial de colonização de pacientes e capacidade de contaminarem superfícies ou equipamentos empregados em hospitais (ANVISA, 2011; NAKONIECZNA et al., 2019). A espécie *Enterococcus faecalis* é responsável por muitas das infecções humanas, incluindo as odontológicas podendo ser encontrado no sistema de canais radiculares. Esta espécie na forma de biofilme é considerada uma das mais resistentes em cavidade oral, devido à resistência aos antimicrobianos convencionais e soluções irrigadoras como a clorexidina e o hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (ARIAS & MURRAY, 2009; AFKHAMI; AKBARI; CHINIFORUSH, 2017; ZORITA-GARCIA et al., 2019).

É frequente nas UTIs que os pacientes sejam tratados com diversos medicamentos, dentre eles antimicrobianos o que aumenta o risco à indução e seleção de microrganismos resistentes, sendo que o estado imunológico comprometido destes pacientes, a gravidade da doença e o número de bactérias no local de infecção são alguns fatores que influenciam a instalação da resistência (SANTOS, 2004; KIYOSHI-TEO & BELGEN, 2015).

O emprego abusivo e inapropriado dos antimicrobianos para muitos autores já é considerado um dos maiores problemas da atualidade, em virtude da resistência dos patógenos aos antibióticos, proporcionando um aumento nas taxas de morbidade e mortalidade (NAKONIECZNA et al. 2019; WARRIER et al., 2020). O aumento da prescrição de antimicrobianos durante a pandemia viral da COVID 19, irá contribuir e impulsionar a resistência global a antibióticos (LANGFORT et al., 2021; LIVERMORE, 2021). Previsões para 2050 alertam que a resistência antimicrobiana poderá estar relacionada a 10 milhões de mortes anuais (WHO, 2016). Acredita-se que no cenário atual pelo menos 700 mil pessoas vão a óbito por ano em virtude da resistência microbiana (WARRIER et al., 2020).

Nossos resultados mostraram que vários antibióticos apresentaram resistência antimicrobiana, um dos antibióticos resistentes foi a Oxacilina (OXA). Este antimicrobiano empregado exclusivamente nas infecções causadas por

estafilococos produtores de penicilinase e é pouco empregada em UTI. Já a AMI (aminoglicosídeos) é comumente empregada em tratamentos a curto prazo de infecções graves causadas por cepas sensíveis de bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* e *Acinetobacter sp.*, microrganismos frequentes nas UTIs (BAPTISTA, 2013).

Estudos identificaram microrganismos com resistência antimicrobiana, sendo que os mais comumente encontrados são as bactérias Gram-positivas (*Enterococcus spp.*) resistentes à vancomicina (VAN) e (*Staphylococcus aureus*) resistentes à penicilina (PEN), ampicilina (AMP), metilina e vancomicina (VAN), sendo que 95% destes *S. aureus* isolados em todo o mundo resistem a estes antibióticos (PATEL & SAIMAN, 2010; GIACOBBE, et al., 2011). Para as bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) existe a resistência a antimicrobianos como a gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), amicacina (AMI) e neomicina (DAVIES & WRIGHT, 1997).

Importante ressaltar que nas UTIs de hospitais brasileiros é preocupante o aumento da resistência aos antimicrobianos, sendo que os índices destas resistências segundo estudos multicêntricos (considerando a região sudeste do país) demonstraram mais de 38% de resistência a antibióticos como os carbapenêmicos (Imipenen, betalactâmicos de amplo espectro) estes empregados como o último recurso em infecções contra sistêmicas *Pseudomonas aeruginosa*, bem com elevados índices para demais fármacos de escolha frequente nas UTIs contra Gram-positivos e Gram-negativos como a amicaina (35%), ceftazidime (36%) e ciprofloxacina (43%) de resistência (NEVES et al., 2011).

Considerando que a microbiota da cavidade bucal representa uma ameaça aos pacientes críticos, algumas estratégias para prevenir e ou tratar a colonização têm sido investigadas, como o uso de antissépticos (OLIVEIRA; ZAGALO; CAVACOSILVA, 2014; LAU et al., 2015). Dentre antissépticos utilizados está o gluconato de clorexidina, um agente antimicrobiano com amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, e com menor eficácia contra bactérias Gram-negativas (HUA et al., 2016).

Neste estudo os resultados demonstraram que o uso da clorexidina a 0,12% foi eficiente em promover a inativação das UFC tanto para o biofilme oral não pneumonia como em pneumonia. O uso da clorexidina a 0,12% como antisséptico bucal para evitar a ocorrência da PAVM é conflitante. Sua utilização ocorre há mais de 30 anos e é a mais empregada nos protocolos de higiene bucal preconizado

como padrão ouro nas UTIs, minimizando a ocorrência das PAVM e promovendo a redução bacteriana em até 90 % após sua aplicação na cavidade bucal (HUA et al., 2016; ANVISA: INFECÇÕES , 2017; TAKAHAMA JR et al., 2020). Entretanto, autores relataram que enxaguatórios bucais antissépticos podem estar associados à mortalidade em pacientes hospitalizados, contudo falta um mecanismo patogênico claro, levando a controvérsia e relutância em abandonar ou limitar o uso de antissépticos bucais (KLOMPAS, 2017; DALE et al., 2019). Da mesma forma, Bolt, (2020) sugeriu que a mortalidade pode estar associada ao uso de antissépticos orais e um distúrbio na via enterosalivar do óxido nítrico, sendo que uma redução na biodisponibilidade deste pode estar associada à ocorrência ou agravamento de patologias como aterosclerose e diabetes com risco de sepse.

Muitos estudos têm apresentado a aPDT como estratégia antimicrobiana, empregada como modalidade de tratamento ou terapia complementar sendo uma opção segura e eficiente destacando-se como um método alternativo e promissor de desinfecção tendo sido explorada para o tratamento de bactérias orais (DE ANNUNZIO et al., 2018; NAKONIECZNA et al., 2019; ZAGO et al., 2020).

Diante disso, a presente pesquisa evidenciou que o tratamento dos grupos aPDT, independente do FS utilizado houve um aumento progressivo na redução de UFC com o aumento do tempo de irradiação e energia em biofilme oral sem e com pneumonia. Da mesma forma, em um estudo *in vitro*, comparou a atividade da aPDT com a clorexina a 0,12 % em biofilme oral. Os autores evidenciaram que não houve diferença estatística entre os grupos na viabilidade bacteriana. Entretanto, o uso da aPDT tem a vantagem de não apresentar efeitos colaterais, com mínimo risco de toxicidade e possibilidade de desenvolver resistência antimicrobiana (NUNES; RIBEIRO; GARCEZ, 2019). Em outro estudo foi avaliado a ação da aPDT em *C. albicans*, e demonstrou que ao dobrar o tempo da irradiação, houve uma diminuição de 20 % das bactérias (HOSSEINI et al., 2016). Na investigação realizada por Colina et al., (2018), aPDT para a inativação de *C. albicans* mostrou-se eficaz quando utilizou fotossensibilizador AM e 300 segundos de irradiação. Em outro estudo, a utilização de fotossensibilizador AM nas concentrações 25 e 50 µg/mL foram efetivas na geração de efeito bactericida. Quanto a doses testadas, 2 J, 4 J, 7,2 J e 21,6 J, a maior energia proporcionou os melhores efeitos bactericidas (LONGO & AZEVEDO, 2010).

O presente estudo também demonstrou que a redução de UFC foi dependente do fotossensibilizador utilizado, sendo o composto fenotiazínico como maior redução de UFC.

Do mesmo modo, De Annunzio, 2018 observou que aPDT foi eficaz na eliminação de *Enterococcus faecalis* e *Cutibacterium acnes*. Entretanto, os microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Cutibacterium acnes* não responderam da mesma forma aos parâmetros da aPDT utilizados. Maiores concentrações dos fotossensibilizadores Clorin C6 e curcumina, assim como maiores doses de luz foram necessárias para promover efeito antimicrobiano em *Enterococcus faecalis* em comparação ao *Cutibacterium acnes*. Similarmente, quando a aPDT utilizando os fotossensibilizadores TB e AM foram comparados em biofilme de *Enterococcus faecalis*, observou-se que o efeito antimicrobiano foi maior quando utilizado o AM (LOPEZ-JIMENEZ et al., 2015).

Fundamental enfatizar que a eficácia da aPDT pode ser influenciada por parâmetros como a dose de luz administrada às células-alvo, tempo de exposição à luz e tipo de FS utilizado (KWIATKOWSKI et al., 2018). Os resultados obtidos no presente estudo reforçam estas investigações, pois nos grupos PDT em biofilme oral sem e com pneumonia foi demonstrado que a redução de UFC foi dependente do tempo de tratamento (irradiação) e tipo de FS. Esses resultados são embasados pela Lei de Arndt Schulz, na qual uma dose de luz muito baixa não tem efeito, mas à medida que a dose vai sendo elevada ocorre o efeito positivo desejado até atingir um platô. Acima do ponto limite deste platô o benefício proporcionado irá diminuir progressivamente até se tornar sem efeito. Esse comportamento da luz sobre as células é chamado dose-dependente (HAMBLIN et. al, 2011; ZEIN; SELTING; HAMBLIN, 2018).

Autores sugerem que quanto maior o tempo de pré-irradiação, mais o corante penetrará no biofilme dental (FUMES et al., 2018; DE OLIVEIRA, 2019). No entanto, ainda não há um protocolo definido quanto ao tempo de pré-irradiação para que essa terapia seja eficaz. Na pesquisa realizada tempos menores que 15 minutos na pré-irradiação, não foram suficientes para se obter o efeito da aPDT com redução UFC, considerando emprego da amostra de biofilmes essa necessidade corrobora com outros artigos, que sugerem o aumento do tempo de pré-irradiação em biofilme (FUMES et al., 2018; NEMEZIO et al., 2017; COLINA et al. 2018; SOARES et al., 2019).

Ainda, é importante destacar que este estudo utilizou a amostra adquirida do paciente e que cada amostra apresentava no mínimo três bactérias diferentes, além disso, foi identificado que nas amostras havia a presença de bactéria Gram-negativa. Assim, é possível supor que, os achados deste estudo podem estar relacionados à presença de bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) que podem ter dificultado a eficácia da aPDT na redução da UFC. Melo & Perussi (2012), salientaram que a aPDT pode eliminar maior porcentagem de bactérias Gram-positivas em comparação com as Gram-negativas. Do mesmo modo, em um estudo *in vitro* utilizando *Enterococcus faecalis* (Gram-positivos) e *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativos), ambos expostos a aPDT tiveram maior eficácia na eliminação de colônias de bactérias Gram-positivas (MISBA et al., 2017). Estes resultados, com outros citados na literatura, reforçaram que as diferenças estruturais nas membranas bacterianas devem ser consideradas para a utilização da aPDT (TANG; HAMBLIM; YOM, 2007; JORI et al., 2011; SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013, WARRIER et al., 2020).

Para os efeitos da aPDT, além de considerar a estrutura da membrana bacteriana é preciso levar em consideração se a bactéria está em formação de biofilme ou planctônicas. Costa et al. (2011) utilizando a aPDT na concentração de 0,39 $\mu\text{mol/L}$ a 200 $\mu\text{mol/L}$ de eritrosina, comprimento de ondas de 532 ± 10 nm e energia de 16,2 J inativou *C. Albicans* em cultura planctônicas, entretanto, para a inativação da bactéria em biofilme, 400 $\mu\text{mol/L}$ de FS não foi suficiente para atingir uma redução semelhante na cultura planctônica. Similarmente, Fontana et al., 2009 empregou a aPDT em cultura planctônica e no biofilme. Houve a inativação de 63% das bactérias presentes em suspensão, no entanto, apenas 32% das bactérias no biofilme foram destruídas. Os autores concluíram que as bactérias na estrutura do biofilme têm menor suscetibilidade a APDT se comparadas com as bactérias planctônicas em virtude da maior dificuldade de penetração do FS no biofilme. Neste contexto, outros autores enfatizaram que a ação da aPDT contra bactérias formadoras de biofilme é fundamental, mais do que contra bactérias planctônicas, pois do ponto de vista clínico, a maior parte das bactérias orais se associam a biofilmes na cavidade oral agindo diferentemente de suas contrapartes planctônicas (KOLENBRANDER; PALMER; PERIASAMY; JAKUBOVICS, 2010).

Assim, é possível sugerir, considerando os achados deste estudo no qual foram comparados diferentes FSs (AM+ TB e Urucun) nos mesmos parâmetros, tendo um maior efeito na aPDT na redução da UFC com o emprego da associação

AM + TB, que os parâmetros empregados no Urucum deveriam ser alterados, como maior tempo de irradiação e dose de energia, assim como o aumento da concentração do FS. Importante enfatizar que há pouca literatura envolvendo o uso do urucum como FS na aPDT, o que sugere que outros parâmetros e concentrações com este corante devam ser investigados.

6.CONCLUSÃO

Os resultados apontaram a presença de microrganismos do biofilme bucal multirresistentes a todos os antimicrobianos empregados.

Apesar dos microrganismos serem multirresistentes a antimicrobianos o uso da aPDT apresentou potencial para o tratamento de biofilme oral de paciente com ou sem pneumonia. Esta pesquisa reitera a necessidade de alternativas terapêuticas como a aPDT que atinjam os microrganismos e não proporcionem a formação de resistência antimicrobiana. Faz-se necessárias evidências de protocolos e estratégias aplicadas em situações reais *in vivo* a fim de confirmar sua eficácia e longevidade antibacteriana.

REFERÊNCIAS

AFKHAMI, F.; AKBARI, S.; CHINIFORUSH, N. *Enterococcus faecalis* elimination in root canals using silver nanoparticles, Photodynamic Therapy, diode laser, or laser-activated nanoparticles: An *in vitro* study. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 2, p. 279–282, 2017. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.029>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA/ INFEÇÃO: **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasília, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Investigação e controle de bactérias multirresistentes**. 2011. Disponível em: http://anvisa.gov.br/servicosade/controle/reniss/manual%20controle_bacterias.pdf. Acesso em: dez. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA/ **Manual da ANVISA- Série Segurança do paciente: Medidas de prevenção de infecção relacionadas à assistência à saúde**. Gerência de vigilância e monitoramento em serviços de saúde, GVIMS/GGTES, Brasília, 2017.

AHMED, Q. A.; NIEDERMAN, M. S. Respiratory infection in the chronically critically ill patient. Ventilator-associated pneumonia and tracheobronchitis. **Clin Chest Med**, v. 22, p. 71-85, 2001.

ANANIEVA, M. M; FAUSTOVA, M. O.; BASARAB, I. O.;LOBAN, G. A. *Kocuria rosea*, *kocuria kristinae*, leuconostoc mesenteroides as caries-causing representatives of oral microflora. **Wiad Lek**, v. 70, n.2- pt 2, p. 296-298, 2017.

ANNUNZIO, S. R.; FREITAS, L. M.; BLANCO, A. L.; COSTA, M. M.; CARMONA-VARGAS, C. C.; OLIVEIRA, K. T.; FONTANA, C.R. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 178, p. 545-550, 2018. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.11.035

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century – a clinical super-challenge. **N Engl J Med**, v. 360, n. 5, p. 439–443,2009.

AUTIO-GOLD, J. The role of chlorhexidine in caries prevention. **Operative dentistry**, v. 33, n. 6, p. 710-6, 2008. doi: 10.2341/08-3.

BAIO, P. V.; MOTA, H. F.; FREITAS, A.D.; GOMES, D. L.; RAMOS, J. N.; SANT'ANNA, L. O.; SOUZA, M. C.; CAMELLO, T. C.; HIRATA JUNIOR, R.; VIEIRA, V.V.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 23-9, 2013.

BARBOSA, J. C. S.; LOBATO, P. S.; MENEZES, S. A. F.; MENEZES, T. O. A. Perfil dos pacientes sob terapia intensiva com pneumonia nosocomial: principais agentes etiológicos. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 4, p. 201-206, 2010.

BARROSO, R. A.; NAVARRO, R.; TIM, C. R.; RAMOS, L. P.; OLIVEIRA, L. D.; ARAKI, A. T.; ASSIS, L., et al. Antimicrobial photodynamic therapy against *Propionibacterium acnes* biofilms using hypericin (*hypericum perforatum*) photosensitizer: in vitro study. **Lasers Med Sci**, v. 36, n. 6, p.1235-1240, 2021. doi: 10.1007/s10103-020-03163-3

BATISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. Portugal, 2013. Disponível em: <https://recil.ensinolusofona.pt/bitstream/10437/3264/1/Mecanismos%20de%20Resist%c3%aancia%20aos%20Antibi%c3%b3ticos%20%20Maria%20Galv%c3%a3o%20B>a.pdf. Acessado em : Abr, 2022.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; BELLISSIMO-RODRIGUES, W. T. Ventilator-associated pneumonia and oral health. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, p. 543–544, 2012. Doi:<https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000500001>.

BERRY, A.; DAVIDSON, P.; MASTERS, J.; ROLLS, K. Systematic literature review of oral hygiene practices for intensive care patients receiving mechanical ventilation. **American Journal of Critical Care**, v. 16, n. 16, p. 552–562, 2007.

BIEL, M. A.; SIEVERT, C.; USACHEVA, M.; TEICHERT, M.; WEDELL, E.; LOEBEL, N.; ROSE, A.; ZIMMERMANN, R. Reduction of endotracheal tube biofilms using antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers Surg Med**, v. 43, n. 7, p. 586-590, 2011. DOI: 10.1002/LSM.21103.

BLOT, S. Antiseptic mouthwash, the nitrate–nitrite–nitric oxide pathway, and hospital mortality: a hypothesis generating review. **Intensive Care Medicine**, (), – 2020. doi:10.1007/s00134-020-06276-z

BLUM, D. F.; MUNARETTO, J.; BAEDER, F.M.; GOMEZ, J.; CASTRO, C. P.; BONA, A. D. Influência da presença de profissionais em odontologia e protocolos para assistência à saúde bucal na equipe de enfermagem da unidade de terapia intensiva. Estudo de levantamento. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 391-393, 2017.

BRIGGS, T.; BLUNN, G.; HISLOP, S.; RAMALHETE, R.; BAGLEY, C.; MCKENNA, D.; COATHU, M. Antimicrobial photodynamic therapy-a promising treatment for prosthetic joint infections. **Lasers Med Sci**, v. 33, p. 523–532, 2018. doi:<https://doi.org/10.1007/s10103-017-2394-4>.

BUCK, S. T. **Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade, e propriedades modulares de corantes para a aplicação em terapia Fotodinâmica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, instituto de Química de São Carlos, 2009. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde25082009103801/publico/Su>elenTGBuck.pdf. Acesso em: Out, 2019.

CANZI, R. K.; COLACITE, J. Frequência de pneumonia associada à ventilação mecânica com base em resultados de culturas quantitativas de secreções traqueais. **RBAC**, v. 48, n. 18, p.118-22, 2016.

CARMELLO, J. C.; et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 14, n. 7, p. 1319-1328, 2015. DOI: 10.1039/c4pp00368c. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26069900>. Acesso em: Out, 2019.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002. doi: 10.11606/D.82.2002.tde-07012003-100025.

CHAVES LAMARQUE, G. C.; CUSICANQUI MÉNDEZ, D. A.; ARRUDA MATOS, A.; DIONÍSIO, T. J.; MOREIRA MACHADO, M. A.; MAGALHÃES, A. C.; CRUVINEL, T. Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 101654, 2020. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101654

CHOROST, M. S.; SMITH, N. C.; HUTTER, J. H.; ONG A. C.; J STAM, J. A.; MCGANN, P. T.; et al. Bacteraemia due to *Microbacterium paraoxydans* in a patient with chronic kidney disease, refractory hypertension and sarcoidosis. **JMM Case Rep**, v. 5, n. 11, p. e005169, 2018. DOI 10.1099/jmmcr.0.005169

COSTA, A. A. C. B. P.; RASTEIRO, V. DE C.; PEREIRA, C. C. A.; HASHIMOTO, E. DA S.; BELTRAME, M. J.; JUNQUEIRA, J. J. C.; JORGE, A. A. O. C.; et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. **Arch Oral Biol**, v. 56, p. 1299–1305, 2011.

CILLONIZ, C.; MARTIN-LOECHES, I.; GARCIA-VIDAL, C.; SAN JOSE, A.; TORRES, A. Microbial Etiology of Pneumonia: Epidemiology, Diagnosis and Resistance Patterns. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n. 12, p. 2120, 2016. doi.org/10.3390/ijms17122120.

CHITTPURNA, S. P. K.; VERMA, D.; PINNAKA, A. K.; MAYILRAJ, S.; KORPOLE, S. *Micrococcus lactis* sp. nov., isolated from dairy industry waste. **Int J Syst Evol Microbio**, v. 61, n. 12, p. 2832–2836, 2011. doi:10.1099/ijms.0.028043-0

CLSI. CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems. 1. ed. **CLSI guideline M52. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute**, 2015.

CLSI. CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories. 29. ed. **CLSI guideline M100-S29. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute**, 2019.

COLINA, G. A.; FREIRE, F.; SANTOS, T. P. C.; SOBRINHO, N. G.; AQUINO, S.; PRATES, R. A.; SILVA, D. F. T.; HORLIANA, A. C. R. T.; PAVANI, C. Controlling Methylene Blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using Photodynamic Therapy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1355-1364, 2018. DOI: 10.1039/C8PP00238J.

CRUZ, E. D. A. **Staphylococcus aureus** resistente à metilina em trabalhadores de um hospital universitário: colonização e crenças em saúde. 2008. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2008. 187 p. Disponível em: file:///D:/User/Downloads/ElaineDrehmerdeAlmeidaCruz.pdf. Acessado em: mai, 2022.

CUONG, T. V.; CHIN, K. B. Effects of annatto (*Bixa orellana* L.) seeds powder on seeds powder on physicochemical properties, antioxidant and antimicrobial activities of pork patties during refrigerated storage. **Korean J Food Sci Anim Resour**, v. 36, n. 4, p. 476-486, 2016. doi: 10.5851/kosfa.2016.36.4.476

CUTLER, C.J.; DAVIS, N. Improving oral care in patients receiving mechanical ventilation. **Am J Crit. Care**, v. 14, n. 5, p. 389-94, 2005.

DALE, C. M.; ROSE, L.; CARBONE, S.; SMITH, O. M.; BURRY, L.; FAN, E.; CUTHBERTSON, B. H.; et al. Protocol for a multi-centered, stepped wedge, cluster randomized controlled trial of the de-adoption of oral chlorhexidine prophylaxis and implementation of an oral care bundle for mechanically ventilated critically ill patients: the CHORAL study. **Trials**, v. 20, n. 1, .p. 603, 2019.doi:10.1186/s13063-019-3673-0.

DAVIES, J.; WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. **Trends Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 234-40, 1997.

DESCHEPPER, M.; WAEGEMAN, W.; EECKLOO, K.; VOGELAERS, D.; BLOT, S. Effects of chlorhexidine gluconate oral care on hospital mortality: a hospital-wide, observational cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 44, n. 7, p. 1017–1026, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5171-3>.

DHANJAL, S.; KAUR, I.; KORPOLE,S.; SCHUMANN, P.;CAMEOTRA, S. S.; PUKALL, R.; KLENK, H.P.; MAYILRAJ, S. *Agrococcus carbonis* sp. nov., isolated from soil of a coal mine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61,p. 1253–1258, 2011. DOI 10.1099/ij.s.0.024745-0.

DE ANNUNZIO, S.R.; DE FREITAS, L. M.; BLANCO, A.L.; et al. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B**, v. 178, p. 545–550, 2018. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.035

DE OLIVEIRA, A. B.; FERRISSE, T. M.; MARQUES, R. S.; DE ANNUNZIO, S. R.; BRIGHENTI, F. L.; FONTANA, C.R. Effect of Photodynamic Therapy on microorganisms responsible for dental caries: a systematic review and meta-analysis. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 14, p. 3585, 2019. DOI: 10.3390/ijms20143585.

DE SOUZA FARIAS, S. S. **Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana no controle do biofilme dental cariogênico**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

DÓRIA, J. S. **Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados de 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e de derivados de 5(6)-benzofuroxânicos frente a cepas padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus***. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 137 p.

DRESCH, F.; BIRKHEUER, C. F.; RAMPEL, C.; MACIEL, M. J. Contaminação de superfícies localizadas em unidades de terapia intensiva e salas de cirurgia: uma revisão sistemática da literatura. **Rev de Epidemiol e Control Infec**, v. 8, n.1, p. 85-91, 2018.

DOVIGO, L. N.; PAVARANI, A. C.; RIBEIRO, A. P. D.; BRUNETTI, I. L.; COSTA, C. A. S.; JACOMASSI, D. P.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. . Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895-903, 2011. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21517888>.

DUBBS SB, SOMMERKAMP SK. Evaluation and Management of Urinary Tract Infection in the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, 2019; 37(4): 707-723.

EDUARDO, C. P.; BELLO-SILVA, M. S.; RAMALHO, K. M.; LEE, E. M. R.; ARANHA, A. C. C. A. Terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, v. 69, n. 3, p. 226-35, 2015.

EDWARD, K.I.; FELSTEAD, B.; MAHONEY, A. M. Hospitalized mental health patients and oral health. **Journal of Psychiatric and Mental health Nursing** , v.19, p. 419-425, 2012.

FIGUEIRÊDO JÚNIOR, E. C.; PEREIRA, M. M.; TORRES, R. C. S. D.; MISSIAS, E. M.; PEREIRA, J. V.; SOARES DE ALBUQUERQUE, M. Terapia fotodinâmica antimicrobiana como recurso adjuvante no tratamento endodôntico em dentes infectados: análise bibliométrica e revisão de literatura. **Arch Health Invest**, v.10, n.1, p. 179-186, 2021 - ISSN 2317-3009 <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v10i1.5013>

FILIPINI, S. M. R.; CAMPAGNOLO, C. B.; DUTRA, D. A. M.; MACIEL, R. M.; DANESI, C. C.; KANTORSKI, K. Z. Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy using methylene blue/ethanol formulation in experimental periodontitis in diabetic rats: short-term results. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 6, p. 1253-1260, 2019. DOI: 10.1007/s10103-019-02733-4.

FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, K. M.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, n.1-2, p. 136–138, 2003. doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00289-7.

FONSECA, B.; BOCASSANTA, A. C. S.; BOZZA, A.; FOSQUIERA, E. C. Microrganismos bucais no desenvolvimento da pneumonia aspirativa por ventilação mecânica em pacientes de unidade de terapia intensiva- Revisão de literatura. **Rev Uningá**, v. 30, n. 2, p. 37-43, 2017.

FONSECA, A. DE S.; MENCALHA, A. L. ; PAOLI, F. Antimicrobial photodynamic therapy against acinetobacter baumannii. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.35 , P. 102430, 2021. DOI: 10.1016/J.PDPDT.2021.102430.

FONTANA, C. R.; ABERNETHY, A. D.; SOM, S.; RUGGIERO, K.; DOUCETTE, S.; MARCANTONIO, R. C.; BOUSSIOS, C. I.; KENT, R.; GOODSON, J. M.; TANNER, A. C. R.; E SOUKOS, N. S. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 6, p. 751-759, 2009.

FRANCO JB, JALES SMCP, ZAMBON CE, FUJARRA FJC, ORTEGOSA MV, GARDIEIRO, P. F. R.; MATIAS, D. T.; PERES, M. P. S. M. Higiene bucal para pacientes entubados sob ventilação mecânica assistida na unidade de terapia intensiva: proposta de protocolo. **Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa**, São Paulo, v. 59, n. 3, p.126-31, 2014.

FREITAS, L. M.; LORENZON, E. N.; CILLID, E. M.; OLIVEIRA, K. T.; FONTANA, C. R.; MANG, T. S. Photodynamic and peptide-based strategy to inhibit Gram-positive bacterial biofilm formation. **Biofouling**, v. 35, n. 7,p. 742-757, 2019. DOI:10.1080/08927014.2019.1655548.

FUMES, A. C.; TELLES, P. D. S.; CORONA, S. A. M.; BORSATTO, M. C. Effect of aPDT on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* present in the dental biofilm: Systematic review. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 21, p. 363-366, 2018. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.013.

FUNKE, G.; BERNARD, K. A. Coryneform Gram-Positive Rods. In: VERSALOVIC, J.; et al. Manual of Clinical Microbiology. 10th. Washington, United States of America: **Ed. ASM Press**, v. 1, p. 413-471, 2011.

GASPAR, M. D. R.; BUSATO, C. R.; SEVERO, E. Prevalência de infecções hospitalares em um hospital geral de alta complexidade no município de Ponta Grossa. **Acta Scientarum**, v. 34, n. 1, p. 23-9, 2012.

GARCEZ, A. S.; NETO, J. G. A.; SELLERA, D. P.; FREGNANI, E. Effects of Antimicrobial Photodynamic Therapy and Surgical Endodontic Treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 14, p. 575-580, 2015. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.06.002.

GHORBANI, J.; RAHBAN, D.; AGHAMIRI, S.; TEYMOURI, A.; BAHADOR, A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. **Laser Ther**, v. 27, n. 4, p. 293-302, 2018. doi: 10.5978/islsm.27_18-RA-01

GONÇALVES, M. L. L.; DA MOTA, A. C. C.; DEANA, A. M.; GUEDES, G. H.; CAVALCANTE, L. A. S.; PRATES, R.A.; HORLIANA, A. C. R. T.; PAVANI, C.; MOTTA, L. J.; BITENCOURT, G. B.; FERNANDES, K. P. S.; SALGUEIRO, M. D. C. C.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; DA SILVA, D. F. T.; FRANÇA, C. M.; BUSSADORI, S. K. Photodynamic therapy with Bixa orellana extract and LED for the reduction of halitosis: study protocol for a randomized, microbiological and clinical trial. **Trials**, v. 19, n. 1, p. 590, 2018 . doi: 10.1186/s13063-018-2913-z.

GRAP, M. J. Not-so-trivial pursuit: mechanical ventilation risk reduction. **Am J Crit. Care**, v. 18, p. 299-309, 2009. doi: 10.4037/ajcc2009724.

GIACOBBE, A. D.; PECETTA, S.; VIRGA, A., SCAZZOCCHIO, F.; AQUILANTI, L.; IEBBA, V.; PASSARIELL, C. Diffusion of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 strains in central Italy. **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, n. 4, p. 1-8, 2011.

GUILLON, A.; FOUQUENET, D.; MORELLO, E.; HENRY, C.; GEORGEAULT, S.; SITAHAR, M.; HERVÉA, V. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Present in Endotracheal Tubes by Poly-L-Lysine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, p. e00564-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00564-18>

HAMBLIN, M. R.; HUANG, Y.Y.; SHARMA, S. K.; CARROLL, J. Biphasic dose response in low level light therapy-an update. **Dose-Response**, v. 9, p. 602–618, 2011. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>

HOMD. HUMAN ORAL MICROBIOME DATABASE. 2018. *Página inicial*. Disponível em: <http://www.homd.org/>. Acesso em: maio, 2022.

HOSSEINI, N.; YAZDANPANA, S.; SAKI, M.; REZAZADEH, F.; GHAPANCHI, J.; ZOMORODIAN, C.; AUTHOR, C. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer. **J Dent Shiraz Univ Med Sci**, v. 17, p. 354–360, 2016.

HUA, F.; XIE, H.; WORTHINGTON, H. V.; FURNESS, S.; ZHANG, Q.; LI, C. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 25, n. 10, 10:CD008367, 2016. DOI:10.1002/14651858.CD008367.PUB3.

HUANG, L.; XUAN, Y.; KOIDE, Y.; ZHIYENTAYEV, T.; TANAKA, M.; HAMBLIN, M. R. Type i and type ii mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers Surg Med**, v. 44, n. 6, p. 490-499, 2012. doi: 10.1002/lsm.22045.

HUNTER, J. D. Ventilator associated pneumonia. **BMJ**, 344:e3325, 2012. doi: 10.1136/bmj.e3325.

JAVALI, M. A.; ALQAHTANI, N. A.; AHMAD, I.; & AHMAD, I. Antimicrobial photodynamic therapy (light source; methylene blue; titanium dioxide): Bactericidal effects analysis on oral plaque bacteria: An *in vitro* study. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 22, p. 1654-1661, 2019. DOI: 10.4103/njcp.njcp_189_19.

JORI, G.; CAMERIN, M.M.; SONCIN GUIDOLIN, L.; COPPELLOTTI, O. Antimicrobial photodynamic therapy: Basic principles. In Photodynamic inactivation of microbial pathogens, medical and environmental applications. **RSC: Cambridge**, v. 1, p. 1–18, 2011.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D.; ANTETTI, L.; CHITI, G.; RONCUCCI, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006. doi: 10.1002/lsm.20361.

KALANURIA, A.A.; ZIAI, W.; MIRSKI, M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. **Critical Care**, v.18, n. 2, p. 02-08, 2014.

KALIL, A. C.; METERSKY; M. L.; KLOMPAS, M.; et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of American and the American Thoracic Society. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 5, p. e61-e111, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27418577>.

KWIATKOWSKI, S.; KNAP, B.; PRZYSTUPSKI, D.; SACZKO, J.; KEDZIERSKA, E.; KNAP-CZOP, K.; KOTLINSKA, J.; MICHEL, O.; KOTOWSKI, K.; KULBACKA, J. Photodynamic therapy-mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomed. Pharm**, v. 106, p. 1098 – 1107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.

KIYOSHI-TEO, H.; BLEGEN, M. Influence of institutional guidelines on oral hygiene practices in intensive care units. **AJCC American journal of critical care**, v. 24, n. 4, p. 309-318, 2015.

KLOMPAS M, SPECK K, HOWELL MD, GRENE, L. R.; BERENHOLTZ, S. M. Reappraisal of routine oral care with chlorhexidine gluconate for patients receiving mechanical ventilation: systematic review and meta-analysis. **JAMA Internal Med**, v. 174, p. 751–761, 2014. doi:10.1001/jamainternmed.2014.359.

KLOMPAS, M. Oropharyngeal decontamination with antiseptics to prevent ventilator-associated pneumonia: rethinking the benefits of chlorhexidine. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 38, n. 3, p. 381–390, 2017. doi: 10.1055/s-0037-1602584.

KOBAYASHI, H.; UCHINO, S.; TAKINAMI, M.; UEZONO, S. The impact of ventilator-associated events in critically ill subjects with prolonged mechanical ventilation. **Respir Care**, v. 62, n. 11, p. 1379-1386, 2017. DOI: 10.4187/respcare.05073.

KOCHEVAR, I. E.; LYNCH, M. C.; ZHUANG, S.; LAMBERT, C. R. Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells. **Photochem Photobiol**, v. 72, n4, p. 548-553, 2000.

KOHL, G.; SANTOS, M. M.P.D.; BERTONCELO, G.; VOLPI, LM; PALAORO, JS; WINK, CM; SIQUEIRA, L.O.; ARAUJO, C.S.R. Contaminação bacteriana por *Kocuria rosea* em concentrado de plaquetas por aferese. **Hematol transfus cell ther**, v. 43, n. S1, p. S1- Page S410, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.702>.

KOLENBRANDER, P. E.; PALMER, R. J., JR.; PERIASAMY, S.; JAKUBOVICS, N. S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n.7, p. 471-480, 2010.

KOOKEN, J. M.; FOX, F. K.; FOX, A. Characterization of Micrococcus strains isolated from indoor air. **Mol Cell Probes**, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2012. DOI:10.1016/j.mcp.2011.09.003.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environ. Microbiol**, v. 46, p. 165-170, 1983.

LAMBERT, M.L.; PALOMAR, M.; AGODI, A.; HIESMAYR, M.; LEPAPE, A.; INGENBLEEK, A.; HERREJON, E.P.; BLOT, S.; FRANK, U. Prevention of ventilator-associated pneumonia in intensive care units: an International online survey. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, p. 2-9, 2013. doi:10.1186/2047-2994-2-9.

LAU, A. C.; SO, H. M.; TANG, S. L.; YEUNG, A.; LAM, S.M. ; YAN, W.W. East Cluster Task Force on Prevention of Ventilator-associated Pneumonia in Critical Care Areas. **Hong Kong Med J**, v. 21, n. 1, p. 61-68, 2015. doi: 10.12809/hkmj144367.

LANGFORD, B. J.; SO, M.; RAYBARDHAN, S.; LEUNG, V.; JEAN-PAUL R SOUCY, J. P. R.; WESTWOOD, D.; DANEMAN, N.; MACFADDEN, D. R. Antibiotic prescribing in patients with covid-19: rapid review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect**, v. 27, n. 4, p. 520-531, 2021. doi: 10.1016/j.cmi.2020.12.018

LI, R.; YUAN, L.; JIA, W.; QIN, M.; WANG, Y. Effects of Rose Bengal and Methylene Blue Mediated Potassium Iodide Potentiated Photodynamic Therapy on *Enterococcus faecalis*: A Comparative Study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 53, n. 3, p. 400-410, 2021. DOI: 10.1002/lsm.23299.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance during and beyond covid-19. **JAC Antimicrob Resist**, v.15, n.3 (Suppl 1), p. i5-i16,2021. DOI: 10.1093/jacamr/dlab052

LI Y, LIU C, XIAO W, SONG T, WANG S. Incidence, risk factors, and outcomes of ventilator-associated pneumonia in traumatic brain injury: a meta-analysis. **Neurocritical Care**, v. 32, n. 1, p. 272-85, 2020.

LIU, Y.; QIN, R.; ZAAT, S. A. J.; BREUKINK, E.; HEGER, M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, v. 1, n. 3, p. 140-167, 2015.

LOBÃO, F. R.; VIÇOSO, M. D.; GUERREIRO, L.; PALAZZO, M.; ALMEIDA, P.; VARGAS, G. O papel da Odontologia Intensiva. **Academus Revista Científica da Saúde**, SMSRIO, v. 1, n. 3, p. 1-6, 2016.

LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. **Rev Clín Pesq Odontol**, v.6, n. 3, p. 249-257, 2010.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, L.; FUSTÉ, E.; MARTÍNEZ-GARRIGA, B.; ARNABAT-DOMÍNGUEZ, J.; VINUESA, T.; M. VIÑAS, T. Effects of photodynamic therapy on

Enterococcus faecalis biofilms. **Lasers Med Sci**, v. 30, p. 1519–1526 2015. DOI 10.1007/s10103-015-1749-y

MACHADO, D.; DE MORAES, L. T. A. R.; DE OLIVEIRA, M. E.; VIANNA, I. A. Pneumonia: Tratamento e Evolução. **Cadernos UniFOA**, v. 5, n. 14, p. 65-69, 2017.

MATOSO, L. M. L.; CASTRO, C. H. A. Indissociabilidade clínica e epidemiológica da pneumonia. **Catussaba**, v. 2, n. 2, p. 11-23, 2013.

MELO, M. A. S.; ROLIM, J. M. V. F.; LIMA, R. A.; ZANIN, I. C. J.; CODES, B. M.; ROCHA, S. S.; RODRIGUES, L. K. A. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy and Ultraconservative Caries Removal Linked for Management of Deep Caries Lesions. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.12, n. 4, p. 581-586, 2015. 10.1016/j.pdpdt.2015.09.005.

MELO, W. C. M. A.; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 33, n. 3, p. 331-340, 2012.

MENDES, G. O.; PRANCHEVICIUS, M. C.; CUELLAR, P. M. G. Perfil bacteriológico das mãos de profissionais de saúde do centro cirúrgico e do pós-operatório do hospital geral de Palmas. In: **SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2012. Universidade Federal de Tocantins (UFP), Campus de Palmas. [s.p.]. Disponível em: http://eventos.uft.edu.br/files/imports/viii_cient/documentos/9ad5cb182f60d3bc1e5c8ac9f932b410/1497.pdf. Acessado em: 20 mai. 2022.

MERCKMILLIPORE: Tween® 80 (polissorbato) CAS 9005-65-6 | 817061. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/msds/MDA_CHEM817072?Origin=PD P – acessado 25/09/21)

MIRANDA, N.; VOLPATO, H.; RODRIGUES, J. H. S.; CAETANO, W.; UEDANAKAMURA, T.; SUELI DE OLIVEIRA SILVA, S. O.; NAKAMURA, C. V. The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in *Leishmania amazonenses*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 174, p. 342-354, 2017. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.08.016.

MISBA, L.; ZAIDI, S.; KHAN, A. U. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 24-33, 2017. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.177.

MISBA, L.; ZAIDI, S.; KHAN, A. U. Efficacy of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm: Role of singlet oxygen. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v.183, p. 16–21, 2018. doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.024

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biol**, v. 5, n. 11, p. e307, 2007. doi:10.1371/journal.pbio.0050307.

MORAIS, T. M. N.; SILVA, A.; AVI, A. L. R. O.; SOUZA, P. H. R.; KNOBEL, E.; CAMARGO, L. F. A. Importance of dental work in patients under intensive care unit. **Rev Bras Ter Intensiva**, v.18, p. 412–417, 2006.

NAKONIECZNA, J.; WOZNIAK, A.; PIERANKI, M.; RAPACKA-ZDONCZYK, A.; OGONOWSKA P.; GRINHOLC, M. Photoinactivation of ESKAPE pathogens: overview of novel therapeutic strategy. *Future Med Chem*, v. 11, n. 5, p. 443-461, 2019. doi: 10.4155/fmc-2018-0329.

NEMEZIO, M. A.; FARIAS, S. S. S.; BORSATTO, M. C.; AIRES, C. P.; CORONA, S. A. M. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 234–237, 2017. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.10.025.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* S multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NOGUEIRA JWS, JESUS CAC. Higiene bucal no paciente internado em unidade de terapia intensiva: revisão integrativa. **Rev Eletr Enf**, 2017. <http://doi.org/10.5216/ree.v19.41480>.

NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia**. 2 ed. Rio de Janeiro : Elsevier , 2019.

OLIVEIRA, J.; ZAGALO, C.; CAVACO-SILVA, P. Prevention of ventilator-associated pneumonia. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 20, n. 3, p. 152–161, 2014. doi:10.1016/j.rppneu.2014.01.002.

OLIVEIRA, S. C. P. S.; MONTEIRO, J. S. C.; PIRES-SANTOSA, G. M.; SAMPAIO, F. J. .; SOARES, A. P.; SOARES, L. G. P.; PINHEIRO, A. L. B . LED antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium dye against *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 175, p. 46–50, 2017. doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.08.029

PAILHORIÈS, H.; CASSISA, V.; CHENOUEARD, R.; MARIE KEMPF, M.; EVEILLARD, M.; LEMARIÉ, C. *Staphylococcus saprophyticus*: Which beta-lactam? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 65, p. 63-66, 2017. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.10.001>

PAMPLONA-ROGER, G. D. **Encyclopaedia of medicinal plants**, Editorial Safeliz, 1998. Disponível em : <https://www.cefracor.org/sites/www.cefracor.org/files/webform/documents/offre-complete/fichier/pdf-the-encyclopedia-of-medicinal-plants-andrew-chevallier-pdf-download-free-book-e34b9db.pdf>. Acesso em: out, 2019.

PAOLI, V. M. **Terapia Fotodinâmica aplicada à erradicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*: avaliação *in vitro* da eficiência de diferentes fármacos fotossensíveis**. 2005. Tese (Doutorado em ciências, área Química) - Universidade de São Paulo – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto– Departamento de Química–Programa de Pós-Graduação em Química, Ribeirão Preto, São Paulo, 2005, 162 p.

PATEL, S. J.; SAIMAN, L. Antibiotic resistance in neonatal intensive care unit pathogens: mechanisms, clinical impact and prevention including antibiotic stewardship. **Clin Perinatol**, v. 37, n. 3, p. 547-63, 2010.

PEREZ-LAGUNA, V.; GARCIA-MALINIS, A. J.; ASPIROZ, C.; REZUSTA, A.; GILABERTE, Y. Antimicrobial effects of photodynamic therapy. **G Ital Dermatol Venereol**, v. 153, n. 6, p. 833-846, 2018 doi: 10.23736/S0392-0488.18.06007-8.

PESSOA, F.; PEREIRA, P. A. M. Lisboa: Ática, 10^a ed., 1972.

PINTO, A. P.; ROSSETI, I. B.; CARVALHO, M. L.; SILVA, B. G. M.; SILVA, C. A.; COSTA, M. S. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT), using Toluidine blue O inhibits the viability of biofilm produced by *Candida albicans* at different stages of development. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 182–189, 2018. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.001

PRAZMO, E. J.; KWASNY, M.; LAPINSKI, M.; MIELCZAREK, A. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used. **Adv Clin Exp Med**, v. 25, n. 4, p. 799–807, 2016.

QUEIROGA, A. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana da terapia Fotodinâmica sobre a inativação de espécies do gênero *Candida*: estudo *in vitro***. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6687>>.

RAMPELOTO, P. H. **Caracterização Molecular do Microbioma Hospitalar por Sequenciamento de Alto Desempenho**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de biotecnologia programa de pós-graduação em biologia celular e molecular, 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/202678> .Acesso em :Maio/22.

REINIERS, M. J.; VAN GOLEN, R. F.; VAN GULIK, T. M.; HEGER, M. Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: A molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver. **Antioxid Redox Signal**, v. 21, n. 7, p. 1119-1142, 2014. doi: 10.1089/ars.2013.5486

RIBEIRO, K. M. R. A.; LIMA, M. L. S.; BRITO, A. P. M. Características dos cuidados de enfermagem aos pacientes intubados e traqueostomizados: um relato de experiência. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, 12, 2018;ISSN-1982-6451.

RIBEIRO, L. F. et al. Microbial Community Profiling in Intensive Care Units Expose Limitations in Current Sanitary Standards. **Front Public Health**, v. 7, p. 240-247, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00240>.

ROCHA NETO, O. G.; LEITE, R. F.; BALDI, B. G. Atualização em pneumonia comunitária viral. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 78-84, 2013.

ROLIM, J. P. M. L.; MELO, M. A. S.; GUEDES, S. F.; ALBUQUERQUE-FILHO, F. B.; SOUZA, J.R.; NOGUEIRA, N. A. P.; ZANIN, I. C. J.; RODRIGUES, L. K. A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 106, p. 40–46, 2012. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001.

ROOD, P. A.; HAAS, A.F.; GRAVES, P. J.; WHEELAND, R. G.; ISSEROFF, R. R. Low-energy helium neon laser irradiation does not alter human keratinocyte differentiation. **J Invest Dermatol**, v. 99, n. 4, p. 445-448, 1992. 10.1111/1523-1747.ep12616145.

RORIZ, V. B.; BOAVENTURA, V. L.; DALBELLO, D. N. G. Perfil periodontal e episódios de pneumonias nosocomiais em pacientes internados em uma UTI: estudo piloto. **Rev. Odontol Bras Central**, v. 23, n. 67, 2014.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**, v.13, n. esp, p. 64-70, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/tce/v13nspe/v13nspea07.pdf>. Acessado em: julho. 2022

SEBASTIÃO, F. DE A. **Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2015, 106 p. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/123993>>. Acessado em: dez. 2021.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (SES). **Manual de odontologia hospitalar**. – 1º ed. Grupo Técnico de Odontologia Hospitalar, São Paulo, 2012. Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/ses/perfil/profissional-da-saude/areas-tecnicas-da-sessp/saude-bucal/manual-de-odontologia-hospitalar>.

SHEN, J. J.; JEMEC, G. B. E.; ARENDRUP, M. C.; SAUNTE, D. M. L. Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: a systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101774, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101774>

SILVA, I. L. **Relação da microbiota oral em pacientes com PAV (pneumonia associada a ventilação mecânica) na UTI**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia) - Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2013.

SILVA, Z. S. JR.; FRANÇA, C. M.; ARAÚJO, P. R.; BOTTA, S. B.; FERRARI, R. A. M.; ANA, P. A.; PAVANI, C.; FERNANDES, K. P. S.; SILVA, D. F. T.; HAMBLIN, M. R.; BUSSADORI, S. K. The effects of photodynamic therapy with blue light and papain-based gel associated with Urucum, on collagen and fibroblasts: a spectroscopic and cytotoxicity analysis. **Lasers Med Sci**, v. 35, n. 3, p. 767-775, 2020. doi: 10.1007/s10103-019-02857-7.

SMITH, C. C.; YELLON, D. M. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. **J Cell Mol Med**, v.15, n. 91, p. 797-1.806, 2011.

SINGH, A. A.; SINGH, A. K.; NERURKAR, A. Bacteria associated with marine macroorganisms as potential source of quorum-sensing antagonists. **J Basic Microbiol**. 2020;1–10. DOI: 10.1002/jobm.202000231

SIVAGNANASUNDARA, M. P. et al. Assessment of airborne bacterial and fungal communities in selected areas of teaching Hospital, Kandy, Sri Lanka. **Bio Med Res Int**, v. 2019, p. 11- 22, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7393926>.

SOARES, L. G. P.; CRUGEIRA, P. J. L.; NUNES, I. P. F.; SANTOS, A. S.; CANGUSSÚ, M. C. T.; ALMEIDA, P. F.; PINHEIRO, A. L. B.; HABIB, F. A. L. Oral microbiological control by photodynamic action in orthodontic Patients. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 221–225, 2019. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.002.

SOARES, R. B.; COSTA, D. H.; MIYAKAWA, W.; DELGADO, M. G. T.; GARCEZ, A.S.; TANIA MATEUS YOSHIMURA, T. M.; RIBEIRO, M. S.; NUNEZ, S. C. Photodynamic Activity on Biofilm in Endotracheal Tubes of Patients Admitted to an Intensive Care Unit. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, p. 618–624, 2020. doi:10.1111/php.13239.

SOUZA, L. C. D.; MOTA, V. B. R. D.; CARVALHO, A. V. D. S. Z.; CORRÊA, R. D. G. C. F.; LIBÉRIO, S. A.; LOPES, F. F. Association between pathogens from tracheal aspirate and oral biofilm of patients on mechanical ventilation. **Braz Oral Res**, v. 5, p. 31:e38, 2017. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0038.

SPERANDIO, F. F. **Avaliação da reparação tecidual de excisões realizadas em dorso de ratos submetidas à terapia fotodinâmica com utilização de corante azul de metileno**. 2009. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SPERANDIO, F.F.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative bacteria. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 8, p. 108–120, 2013.

STUBER, M.; FONSECA FILHO, P. F. O. DA; ALBERTON, C. S.; SANTOS, V. C. DOS.; SILVA, B. M. DA; KAIZER, M. DA R.; WAMBIER, L. M.; TOMAZINHO, F. S. F. Does the use of photodynamic therapy compared to calcium hydroxide reduce intracanal microorganisms in teeth with pulp necrosis? A systematic review and meta-analysis. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e136101220058, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i12.20058.

TAKAHAMA JR, A.; SOUSA, V. I.; TANAKA, E. E.; ONO, E.; ITO, F. A. N.; COSTA, P. P. C.; PEDRIALI, M. B. B. P. Analysis of oral risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. **Clinical Oral Investigations**, 2020. https://doi.org/10.1007/s00784-020-03426-x.

TANG, H. M.; HAMBLIN, M. R.; YOW, C. M. A comparative *in vitro* photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens, **J. Infect. Chemother.** v. 13, p. 87–91, 2007. https://doi.org/10.1007/s10156-006-0501-8.

TIAN, F.-H., FAN, D.-Y., ZHANG, C., JIA, C.-W., GAO, W., LI, Y., & LI, C.-T. *Bhargavaea changchunensis* sp. nov. isolated from soil in China. **Archives of Microbiology**, 2018. doi:10.1007/s00203-018-1563-6.

TOEWS, G. B. Nosocomial pneumonia. **Am J Med Sci**, v. 291, p. 355-367, 1986.

TOLABI, Z.; ALIMOHAMMADI, M.; HASSANVAND, M. S. The investigation of type and concentration of bio-aerosols in the air of surgical rooms: A case study in

Shariati hospital, Karaj. **Methods X**, v. 6, p. 641-650, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.03.016>.

TROUILLET, J. Ventilator Associated Pneumonia: A Comprehensive Review. **Hospital Practice**, v. 40, n. 2, p.165–175, 2012. doi:10.3810/hp.2012.04.982.

TULIO, K. DE S. C.; STRAMANDINOLI-ZANICOTTI, R. T.; DIRSCHNABEL, A. J.; SCHUSSEL, J. L.; WASILEWSKI, H. S.; KRELLING, A.; BELTRAME, O. C.; MARTINS, C. R. W.; SASSI, L. M. Alterações no perfil da microbiota bucal durante permanência na UTI: colonização por patógenos respiratórios potenciais. **Arch Health Invest**, v. 7, n.9, p. 351-357, 2018. <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v7i9>.

ULLDEMOLINS, M.; RESTREPO, M.I.; RELLO, J. Pharmacologic measures for the prevention of mechanical ventilation-associated pneumonia. **Med Clin (barc)**, v.136, n.1, p. 21-5, 2011. doi: 10.1016/j.medcli.2009.10.012.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. **Lasers Surg Med**, v. 33, n. 5, p. 311-319, 2003. DOI:10.1002/lsm.10226

VALENZUELA-VALDERRAMA, M.; GONZÁLEZ, I. A.; PALAVECINO, C. E. Photodynamic treatment for multidrug-resistant Gram-negative bacteria: Perspectives for the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 28, p. 256–264, 2019. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.08.012

VARELLIS, M. L. Z. **Odontologia hospitalar**. 1. ed. São Paulo: Quintessense, 2018.

VATANSEVER, F.; DE MELO, W. C.; AVCI, P.; SADASIVAN, M.; GUPTA, A.; CHANDRAN, R.; KARIMA, M.; PARIZOTTO, N. A.; YIN, R. e. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS Microbiol Rev**, v. 37, p. 955–89, 2013.

VILAR, D. A.; VILAR, M. S. A.; MOURA, T. F. A. L; RAFFIN, F. N.; OLIVEIRA, M. R.; FRANCO, C. F. O.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana*: a review. **Sci World J**, v. 1, n. 11, 2014; <https://doi.org/10.1155/2014/857292>.

VILELA, S. F.; JUNQUEIRA, J. C.; BARBOSA, J. O.; MAJEWSKI, M.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. Photodynamic inactivation of staphylococcus aureus and escherichia coli biofilms by malachite green and phenothi-azine dyes: An in vitro study. **Arch Oral Biol**, v. 57, p. 704-710, 2012.

WALTER, J.; HALLER, S.; QUINTEN, C. Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European union/European economic area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012. **Eurosurveillance**, v. 23, p. 1-12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.32.1700843>.

WARRIER, A.; MAZUMDER, N.; PRABHU, S.; SATYAMOORTHY, K.; MURALI, T. S. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 102090, 2020.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102090>.

WELTE, T.; TORRES, A.; NATHWANI, D. Clinical and economic burden of community acquired pneumonia among adults in Europe. **Thorax**, v.67, n. 1, p. 71-79, 2012. doi:10.1136/thx.2009.129502.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines on core components of infection prevention and control programmes at the national and acute health care facility level, 2016. Disponível:<https://apps.who.int/iris/handle/10665/251730>. Acesso em Julho/2022.

WILLE, [I.](#); A MAYR, [A.](#); P KREIDL, P.; C BRÜHWASSER, C.; HINTERBERGER, G.; A FRITZ, A., ET AL. Cross-sectional point prevalence survey to study the environmental contamination of nosocomial pathogens in intensive care units under real-life conditions. **J Hosp Infect**, V.98, N.1, 90-95, 2018. DOI: 10.1016/J.JHIN.2017.09.019.

WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol Sci**, v. 3, n. 5, p. 412-418, 2004. doi: 10.1039/b211266c.

ZAGO, L. H. P.; ANNUNZIO, S. R.; OLIVEIRA, K. T.; BARBUGLI, P. A.; BARRETO, I. M. Q.; FERES, M.; FONTANA, C. R. Antimicrobial photodynamic therapy against metronidazol e resistant dental plaque bacterial. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 209, p. 111903, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111903>.

ZEIN, R.; SELTING, W.; HAMBLIN, M. R. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. **J Biomed**, v. 23, p.1, 2018. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.23.12.120901>

ZORITA-GARCÍA, M.; ALONSO-EZPELETA, L. Ó.; COBO, M.; DEL CAMPO, R.; RICO-ROMANO, C.; MENA-ÁLVAREZ, J.; ZUBIZARRETA-MACHO, Á. Photodynamic therapy in endodontic root canal treatment significantly increases bacterial clearance, preventing apical periodontitis. **Quintessence International**, v. 50, n.10, p. 782– 789, 2019. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a43249>.

ZUANAZZI, D.; SOUTO, R.; ACCIOLY, M. B.; TURA, B. R.; COLOMBO, A. C. Prevalence of potential bacterial respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalised individuals. **Arch Oral Biol**, v. 55, n. 1, p. 21-28, 2010. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.10.005.



UNIVERSIDADE BRASIL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) EM PACIENTES ENTUBADOS SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA ASSISTIDA

Pesquisador: LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 28700619.0.0000.5494

Instituição Proponente: INSTITUTO DE CIENCIA E EDUCACAO DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.061.701

Apresentação do Projeto:

Vide parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide parecer anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide parecer anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide parecer anterior

Recomendações:

Vide parecer anterior

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores realizaram as alterações sugeridas pelo CEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado aprovou o parecer do relator ficando o protocolo na condição de APROVADO.

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 235

Bairro: ITAQUERA

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 08.230-030

Telefone: (11)2070-0167

E-mail: comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br



UNIVERSIDADE BRASIL



Continuação do Parecer: 4.061.701

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1490206.pdf	11/05/2020 10:17:51		Aceito
Outros	REVIS.pdf	11/05/2020 10:14:53	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TC3.pdf	11/05/2020 10:14:23	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TC2.pdf	11/05/2020 10:14:12	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TC1.pdf	11/05/2020 10:13:57	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJ.docx	11/05/2020 10:13:44	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Folha de Rosto	fr.pdf	17/12/2019 21:31:57	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Outros	C.pdf	13/12/2019 18:13:11	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Outros	CV.pdf	13/12/2019 18:11:53	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Outros	EXB.pdf	13/12/2019 18:10:32	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Outros	i.pdf	13/12/2019 18:10:06	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CONF.pdf	13/12/2019 18:07:24	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	3.jpg	13/12/2019 18:07:06	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	2.jpeg	13/12/2019 18:06:54	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	1.jpeg	13/12/2019 18:06:30	LUCIENI CRISTINA TROVATI MORETI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 235

Bairro: ITAQUERA

CEP: 08.230-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2070-0167

E-mail: comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br



UNIVERSIDADE BRASIL



Continuação do Parecer: 4.061.701

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 01 de Junho de 2020

Assinado por:
DANIEL SOUZA FERREIRA MAGALHAES
(Coordenador(a))

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, sou o responsável pelo paciente _____ internado na UTI da Santa Casa de Fernandópolis que está _____ sendo convidado a participar do estudo chamado: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) EM PACIENTES ENTUBADOS SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA ASSISTIDA**. Este estudo tem como objetivo realizar um protocolo padrão de higienização bucal de pacientes internados e entubados na UTI e associar com a terapia fotodinâmica com a finalidade de diminuir a contaminação oral e conseqüentemente a redução dos riscos de pneumonia aspirativa e melhorar as condições de recuperação e cura destes pacientes internados. Assim, o estudo destina-se exclusivamente a pacientes internados e entubados na UTI. Podem participar do estudo pacientes de ambos os sexos, Idades entre 18 a 60 anos, pacientes dentados, com nível de consciência rebaixado e impossibilitados de autocuidados.

A participação no referido estudo será no sentido de permitir que realizem a coleta microbiana bucal com uso de um swab estéril (semelhante a um cotonete) antes e após a realização da higiene bucal. Para a higienização bucal será utilizado o protocolo padrão empregado na UTI que é a utilização da clorexidina associado a aplicação da terapia fotodinâmica para a complementação da higienização bucal. A terapia fotodinâmica consiste na aplicação de um corante fotossensibilizador, ou seja, é sensível a luz LED. Os fotossensibilizadores serão aplicados em solução tópica de azul de metileno e toluidina (na concentração de 1:1) que, segundo a Resolução – RDC no199/2006, é um produto farmacêutico, com finalidade profilática, curativo ou paliativo, possuindo baixo risco de que seu uso ou exposição possa causar conseqüências e ou agravos à saúde. O outro corante utilizado será Bixa orellana, popularmente conhecida como "urucum", é uma planta nativa do Brasil. Será utilizado um composto de urucum puro (1,88 g) diluído em 3 mL de água. Esse corante é um dos poucos que são aceitos pelo Organização Mundial da Saúde (OMS), devido ao fato de não ser tóxico.

Espera-se que associação do protocolo padrão (clorexidina) com a terapia fotodinâmica será mais eficiente em promover a diminuição dos microrganismos da cavidade bucal do paciente entubado quando comparado aos pacientes que receberão apenas o protocolo padrão (clorexidina).

Fui informado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar os benefícios, a melhoria na saúde bucal do paciente, pois por meio do novo procedimento de higienização bucal não invasivo, que consiste na associação da clorexidina com a PDT, poderá ser mais eficiente em reduzir as possíveis complicações bucais do doente, uma vez que tem a finalidade de diminuir a quantidade de biofilme, ou seja, a placa bacteriana bucal e por conseguinte reduzir a contaminação oral favorecendo assim a recuperação dos pacientes internados e entubados na UTI, com conseqüente prevenção e redução das pneumonias aspirativas relacionadas a infecções na UTI proporcionando boa evolução no quadro de saúde destes pacientes refletindo em melhoria na recuperação deste paciente reduzindo o tempo e na redução do seu tempo de internação.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos sobre os possíveis desconfortos e riscos

decorrentes do estudo como: um possível desconforto na realização do exame bucal do paciente internado e na coleta das amostras da flora bucal dele. Ainda, o uso prolongado da clorexidina, por mais de 15 dias (protocolo padrão utilizado em UTI) pode promover um manchamento temporário dos dentes. Para evitar este risco a pesquisa ficará restrita a um curto período de 48 horas.

Estou ciente de que minha privacidade e do paciente sob minha responsabilidade serão respeitadas, ou seja, nosso nome ou qualquer outro dado ou elemento (como imagens) que possam, de qualquer forma, nos identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar e por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo.

Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e níveis variados, sendo que esta pesquisa se dispõe a realizar uma higienização bucal (mantendo o protocolo padrão da UTI) com a complementação desta limpeza com aplicação da PDT (fotossensibilizador + LED) e com posterior coleta de placa bacteriana bucal do paciente sem envolver procedimentos invasivos, o que poderá envolver um risco mínimo ao paciente. Como esta pesquisa oferece riscos mínimos, caso algum procedimento descrito na pesquisa e realizado pelo pesquisador cause algum dano ao paciente, o paciente será indenizado. Entretanto, vale ressaltar que os pacientes em terapia intensiva são considerados críticos e estão expostos ao potencial risco de complicações, que não estão associados com a terapêutica estudada nesta pesquisa, pela elevada complexidade e forma invasiva das terapias, que correspondem a procedimentos necessários àqueles em cuidados intensivos, e pela gravidade de suas condições de saúde.

A pesquisadora envolvida com o referido projeto é Lucieni C T Moreti, CRO 49.957, RG 21.148.291-2 e CPF 962.651.916-91 e com ela poderei manter contato pessoalmente ou pelo telefone (17) 99168-1987 ou pelo endereço: Av. Estrada Projetada F-1 s/n ,Fazenda Santa Rita-Fernandópolis/SP , para esclarecimento de qualquer dúvida a qualquer momento. É assegurada a assistência às minhas dúvidas durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo.

Tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação. Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Brasil (11) 20700025 sediado a Rua Carolina Fonseca, 235, Jd Santana, SP- Capital ou mandar um *email* para comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br.

Fernandópolis, de de 2020.

Nome do sujeito da pesquisa

Assinatura do sujeito da pesquisa

Nome e assinatura do pesquisador responsável

Resultado de Sequenciamento Genético - Amostra NP (1)

Amostra	Resultado Sequenciamento	Sequência obtida
Amostra NP (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NNNNTNNNANNANNGAGTTGTAAGCNAGGGGAGG GCGGGGGGCGGGTGCTCTTGGATATGGCGGTG GCGGGNNAAGNGCCTAAGAATCTGCGTGGTA GTGGGGGATAACGGAAGGAAACGGGCGCTAATA CCGAATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATC TTCGGACCTCACGCTATCTCATGAGCCTAGGTGCG GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG GCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCA GTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG GGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGT GAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGT TGGGAGGAAGGGCAGTAAGTCATTACCTTGCTGT TTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAAC TTCGTGCCAGCAACCGCCGTAATACGAAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCG CGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCC CGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATCCAAAACCTACT GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGGTGGAATTT CCTGTGTAGCGGTGAAAATGCGTACATATAGGAA TGGAACACCAGTGGCGAAAGGCGACCACCTGGG ACTGATACTGACCCTGAGGTGCGAAAGCGGTGG GGGAGCAAACCAGGATTTATAATACCCCTGGTTA GTCCCCTCGGTAACCAATGTC
Amostra NP (1)	<i>Bhargavaea sp.</i>	GGGNNNANNATTNTACNNCCGTCATTCAATTTGGG TTAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGGACACCCCTAA CACTTAGCNCTCATCGTTTACGGCGTGGACTACC AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTGCG CGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGCCGCC TTCGCCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATT TCACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTCTCTTCT GCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCAC GGTTGAGCCGTGGGCTTTACATCAGACTTAAGA AACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCC GGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCT GCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTAAG GTACCGTCAGGGCGCCGGCAGTTAACCGGCGCT TGTTCTTCCCTTACAACAGAGCTTTACGACCCGAA GGCCTTCTTCGCTCACGCGGGCTTGGCTCCGTCAG ACTTTCTGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCA GTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCA TCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTA GCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTGTAAGTGACAG CCGAAACCGTCTTTCCGCCTTCTC CATGCGGAGGAAGGAACCATCCGGTATTAGCCCC GGTTTCCCGGAGTTATCCCGATCTTACAGGCAGG TTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTGAA TCAAGGGAGCAAGCTCCCCGTATCCGCTCGACT

		TGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCT GAGCCATGATCCAAACCTNTCNN
Amostra NP (1)	<i>Desemzia incerta</i>	GGAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACG GCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCT CCCCATGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGA CCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCA TATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTC CACTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCTCCAGTTTC CAATGACCCTCCCTGGTTGAGCCAGGGGCTTTCA CATCAGACTTAAAGAACCGCCTGCGCTCGTTTA CGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCATCTAC GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCAT GGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGACGAGCA GTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTAACAACAGAG TTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGC GTTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCATTGCGGAAGA TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC GTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC AGGTCGGCTACGCATCATCGTCTTGGTGAGCCAT TACCTACCAACTAACTAATGCGCCGCGGGTCCA TCTACAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCTTCTTT CTGCCAGGAGACAAAAAGATCTATGC GGTATTAGCATCCGTTTCCGAATGTTATCCCCCGC TTGTAGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGT CCGCCACTCTTCTTTCCCGGTGCAAGCACCCGTA GGAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAAGGCACGCC ACCAGCGTTCGTCCTGAGCCATANTCCAATTCT NNNCCGTCAATTCATTTGTAGTTCCTGAGCTAGAT TNAACTTNNATNNNN

Resultado de Sequenciamento Genético - Amostra NP (2)

Amostra	Resultado Sequenciamento	Sequência obtida
Amostra NP (2)	<i>Kocuria rosea</i>	GNNNNNNANNNTNNAANNNCCGTCAATTNATTT GTGTTTAGCTAAGGCGCGGAAAAGGTGGAATGTC CCCCACACCTAGTGAAAACGTTTACGGCATGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGC TTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAACAGCCCAGAGAC CTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGC GCATTTACCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCC CTACTGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGA CCCGGGGTTGAGCCCCGGGCTTTACAGCAGAC GCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAAT AATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACC GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTT CTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTCCCTACTG AAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTC ACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTCCGCCCATTG TGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

		<p>CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCA CCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGT GAGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGT GAGCCCATCCAAAACCAGTAAAACCCTTTCCACCA CCCACCATGCGGTAAGAGGTAGTATCCAGTATTA GACCCAGTTTTCCAGGCTTATCCCAGAGTCAAGG GCAGGTTACTCACGTATTACTCACCCGTTCCGCCAC TAATCCGCCAGCAAGCTGGGCATCATCGTTCCGA CTTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTTTCG TCCTGAGCCATGATCAAACTACTNCC</p>
Amostra NP (2)	<i>Micrococcus sp.</i>	<p>TGNNNNNNNNNNNNANNTCCGTTCAATTCATTTGA GTTTCCGGAGGCGCGGTAACCGTGGAATGGTCCC CACACCTAGNNCCCAACGTTTACGGCATGGACTA CCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTT CGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGACCTG CCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCA TTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTA CTGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACCGCAGATC CGGGGTTAAGCCCCGGACTTTACGACAGACGCG ACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATT CCGATAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGG CTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGC AGGTACCGTCACTTTTCGTTCTTCCCTACTGAAAG AGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGC GGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCA ATATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG GCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACCT CTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGC CATTACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGT CCATCCAAAACCGATAAATCTTTCCAACACCCACC ATGCGGTGGACGCTCCTATCCGGTATTAGACCCA GTTTCCCAGGCTTATCCCAGAGTTAAGGGGCAGG TACTCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTAATC CACCCAGCAAGCTGGGCTTTCATCGTTCCGACTTG CATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTTCATCCT GAGCCAATANTNGNACTACTACAAACA</p>
Amostra NP (2)	<i>Micrococcus luteus</i>	<p>GNNNNNAAAAACCTACNNNGGGGGGCNTTCAT ATTGAGTTAGCTGCGGCGCGGAAACCGTGGAATG GTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATG GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCAT GCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAG ACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCT GCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCT CCCCTACTGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACCG CAGATCCGGGGTTAAGCCCCGGACTTTACGACA GACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCC AATAATTCCGGATAACGCTCGCACCCCTACGTATTA CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTC TTCTGCAGGTACCGTCACTTTTCGTTCTTCCCTAC TGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCC TCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCAT TGTGCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGA</p>

		<p>GTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGT CACCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTGCGCCTTG GTGAGCCATTACCTACCAACAAGCTGATAGGCC GCGAGTCCATCCAAAACCGATAAATCTTTCCAACA CCCACCATGCGGTGGACGCTCCTATCCGGTATTA GACCCAGTTTCCCAGGCTTATCCCAGAGTTAAGG GCAGGTTACTCACGTGTTACTACCCGTTCCGCA CTAATCCACCCAGCAAGCTGGGCTTCATCGTTCCG ACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTTCAT CCTGAGCCATGATTCAACTNNNCNCNCC</p>
Amostra NP (2)	<i>Agrococcus carbonis</i>	<p>CGGGNNNAATNNTNNANCCGTCAATTCATTTGAG TTCCTGGGACACGGGGAGTGTGGAAAGGTCCCC ACATCTACTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACC AGGGTATCTAAGCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTCCG CTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCCAGAGATCTGCC TTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATT CCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCCCCTACC GCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAAGGGCG AGGTTGAGCCTCGGGATTTACAACCTTACGCGGC AAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCC GGACAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCT GCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAG GTACCGTCACTTTCTCTTCTTCCCTGCTAAAAGAG GTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGCTCACGCGG CGTTGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAAT ATCCCCACTGCTGCCTCCCGTANGAGTCTGGGC CGTGTCTCAGTCGCAGTGTGGCCGGTCACCCTCA CAAGCCGGCTACACGTCCTCGCCTTGGTGAGCCG TTACCTACCAACAAGCTGATACGCCGTGAGCTG ATCCTTGACATATTTTCTTTCCACCTCTATGAGATG CCTCCGATGGTCGTATCCGGTATTATACGCCATTT CCCGTGCTATTCAGGACTCTAGGNACATTGCTC ACGTGTGACTACCCGTTCCGCCCTAATCCCCAC GAACAAGCTCCTGGTTCAACGTTTCGACTTGCATGT GTTAAAGCACGCCGCCAGCGTTTCGTACCTGACCC ATAGACACAATCTCCAAACTCTTNN</p>
Amostra NP (2)	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	<p>NNNNNTCGGNCANCNANNATNCGNNAATACNTA TTGAGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGG ACCCCACTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGG ACTACCAGGGTATCTAAGCCTGTTTGCTCCCCACC CTTTGCTCCTCAGCGTCAGTAACGGCCCAGAGA TCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTG CGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCC CCTACCGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCA GACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGA CGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAA TAATTCCGGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACC GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTTTT CTGCAGGTACCGTCACTTTGCTTCTTCCCTGCTA AAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTC ACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCCGCCATTG TGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT</p>

		CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCA CCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGACGCCTTGGT GAGCCATTACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGT GAGCCCATCCCAGACCGAAAAATCTTTCCAAGT CTGACCATGCGATCGCAGCTCATATCCGGTATTA GACGCCGTTTCCAGCGCTTATCCCAGAGTCAGGG GCAGGTTGCTCACGTGTTACTACCCGTTCCGCA CTGATCCACAGAGCAAGCTCTGCTTACCCTTCG ACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCAT CCTGAGCCATGATTCAAACCTCTNN
Amostra NP (2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GCGGANNNNNAGAGCAACCAATGTTATGCTTAGA CGTGGAAGGTATGTGCGATTGGGCTCGAAGGTG GATGGAGNNNAAGGCTAAGAATCGGCCTGGTAG AGGGGGATAACGAACGGAAACGGGCGCTAATAC CGAATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTT CGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGA TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC GACGATCCGTAAGTCTGAGAGGATGATCAGT CACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG CGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA GAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGG GAGGAAGGGCAGTAAGTTAATTCCTTGCTGTTTT GACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAA GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCG TAGGTGTTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCG GGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTACTGA GCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTG TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACT GA ACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATG TCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTG GCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGG AGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTG ACGGN

Resultado de Sequenciamento Genético - Amostra P (1)

Amostra	Resultado Sequenciamento	Sequência obtida
Amostra P (1)	<i>Corynebacterium sp.</i>	GNNNTNGNTCNANTNTTTCNNNCCGGGNAATG CTTATGCGTTAGCTGCGGCACAGAAGACGTGCTA AGTCCCCTACACCTAGCGCCCACCGTTTACGGCA TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCCGCTACCC ATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACTGCCCAGA GACCTGCCTTCGCCATTGGTGTTCCTCCTGATATC

		<p>TGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCAGTCT CCCCTACAGCACTCAAGTTATGCCCGTATCGCCTG CACGCCCCGAGGTTAAGCCCCGGGATTTACAGAC GCACGCGACAACCACCTCCCAGCTCTTTATGCC AAGAAATCCGGACAACGCTCGCACCCCTAAATAT GACCGCGGCTGCTGGCACGAAATTAGCCTGTGCT TCTTCTACAGGTACCGTTTTTTTTAAAGCTGCTCCA CCTGTGCGAAAGGAGTTTATCACCCGAAAGGACGT TCATCCAGCAAACCTGGCGTCGCTGCACAAGGGTT TGCGCACAGTGGACAGAAATCCCCACAGCTGCTT CCCGTATTATTATGG</p>
Amostra P (1)	<i>Dietzia aurantiaca</i>	<p>NNNNNNNNNNNGNNCNGNTNGGTGATGTAATT TCTTGGGGTTAGGGCCTTCGGGGTACACGAGTGG CGAACGGGTGAGNAAAANNTGGGTAATCTGCCCT GCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAANTGGGTCTAA TACCGGATATGAGCTCTGGCCGCATGGTCTGGGG TTGGAAAGTTTTTCGGTGCAGGATGAGCCCGCGG CCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCA AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGA TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA TGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGG GGGATGACGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTCA GTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAG AAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACTTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATT ACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTAC GTCGTCTGTGAAATCCTCCAGCTTAACTGGGGGC GTGCAGGCGATACGGGGCAGACTTGAGTACTACA GGGGAGACTGGAATCCCTGGTGTAGCGGGTGA AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTTGGCG AAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGACGCTGAA GGAGCGAAAGCATGG</p>
Amostra P (1)	<i>Bhargavaea sp.</i>	<p>GNNNNNNAANANTTTACNTCCNGGAATTCCTTTG AGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCT AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTAC CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTT GCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGCCGC CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCAT TTCACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTCCTCTTC TGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCA CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAG AAACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTC CGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGC TGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTAA GGTACCGTCAGGGCGCCGGCAGTTAACCGGCGC TTGTTCTTCCCTTACAACAGAGCTTTACGACCCGA AGGCCTTCTTCGCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCA GACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCC AGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGC ATCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTA</p>

		GCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTGTAAGTGACAG CCGAAACCGTCTTTCCGCCTTCCTCCATGCGGAG GAAGGAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCG GAGTTATCCCGATCTTACAGGCAGGTTGCCACG TGTTACTCACCCGTCCGCCGCTGAATCAGGGAGC AAGCTCCCCGTATCCGCTCGACTTGCATGTATTA GGCACGCCGCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAATGA TTCAAACNTNTNNN
Amostra P (1)	<i>Enterococcus faecalis</i>	NNNNNNNNGTANANCTACATCCGTNATTCATTTG CGTTTGTGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCC AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTAC CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTT GAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGC CTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATATCTACGCAT TTCACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTC TGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCC CGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAG AAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCC GGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCT GCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAG ATACCGTCAGGGGACGTTTCACTTAACGTCCTT GTTCTTCTCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAA ACCTTCTTCACTCACGCGCGTTGCTCGGTCAGA CTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCTACTGCTGCC TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAG TGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCAT CGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAG CTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACC CGAAAGCGCCTTTCCTCTTATGCCATGCGGTTTA GAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGT GTTATCCCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTG TACTCACCCGTTCCGCCACTCCTTTTTATTGA GAGCAAGCACTCGGGGAAGAAAAGAAGCGTTTC GACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGGTTTC GTCCTGGAGCCATGGATCAAAACTTCTCC
Amostra P (1)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CANNGGNGTTCGAGTNCNNNNCGGNNTCAAGNC TCCNNGGTGGGCGGCGGGTGGGGTAAAGAGGAN NGGAAGGACGGGTGAGTAAGACGTGGGTAACT ACCCACTGCAGAAGGGATAACACTTGAAACAGG TGCTAATACCGCATAACATTTTATTCCGCGTGGCA TAAGAGTGATTGGCGCTTTGGGGTGTGCTGATG GATGGACCCTCGGTGGATTACCTAGTTGGGGAGG TAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCCTAGCCGAC CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCGGTAG GGAATCTTCTGCAATGGACCAACGTCTGACCGAA CAGCCCCCGTGAGTGAACAAGGTTCTCGGATCG AAAACTCTTTTGTAGAGAAGAACAAGGACGTTA GTAAGTGAACGTCCCCTGACTGTATCTAACAGAA AGCCACGGCTAACTACTTGCCAGCAGCCGCGGTA

		<p>ATACATAAGTGGCAAGCGTTGTCCTGATTTATTGG GCGTAAAAGCCAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT GATGTGAAAGCCCCGGCTCAGCCGGGGAGGGT CATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAAAGAGG ATATGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTT ACATATATGGGAAGGAACACCCGTGGCGAAGGC GGCTCC</p>
Amostra P (1)	<i>Enterococcus faecalis</i>	<p>GNNNCTANNNTNTTACCCCGTCATTCATTTGAGTT ACCTGCGGAANGTAGGGGGGAACCTCCAACACT TAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG TATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTCCAGCC TCAACGTCAGTTACAGACCAGAAAGCCGCCTTCG CCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTAC CGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCAC TCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTT GAGCCGGGGGCTTTCACATCAAACCTAAGAAACC GCCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGAC AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTG GCACGTAATTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATAACC GTCAGGGGACGTTACGTTACTAACGTCCTTGTCT TCTCTAACAAACGGAGTTTTACGATCCGAAAACCTT CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTC GTCCATTGCCGAAGATTACCTACTGCTGCCTCCC GTAAGAGTCTGGGCCGTGTCTCACTCCCAGTGTG GCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTG GCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAAT GCACCGCGGGTCCATCCATCANCACACCCGAAA GCGCCTCTCACTCTTATGCAATGCGGCATAAACTG TTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATC CCCCTCTGATGGGTAGGTTACCCACGTGT ACTCACCCGGTCCGCCACTCCTCTTTCCAATTGAG TGCAAGCACTCGGGGAGGAAAGAAGCGTTCGACT TGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCA TGAGCCATAATCAAACCTANANNN</p>

Breno Manzini

Gerente de Pesquisas

PREVET - Laboratório de Diagnóstico e Sanidade Aquícola

Av. Olga Morello de Stéfani, 260 - Colina Verde CEP: 14.887-364, Jaboticabal, São Paulo Fone: (16) 3202-6298

www.prevet.com.br

Jaboticabal, 11 de outubro de 2021.