



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENSAIOS BIOLÓGICOS**

ALANA PATRÍCIA LIMA FERREIRA

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NA CAVIDADE ORAL DE
PACIENTES INTERNADOS EM CENTRO DE TERAPIA INTENSIVA**

MACAPÁ/AP
2020

ALANA PATRÍCIA LIMA FERREIRA

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NA CAVIDADE ORAL DE
PACIENTES INTERNADOS EM CENTRO DE TERAPIA INTENSIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos, para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dr^a. Ana Rita Pinheiro Barcessat.

MACAPÁ/AP
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Ferreira, Alana Patrícia Lima.

Terapia fotodinâmica antimicrobiana na cavidade oral de pacientes internados em Centro de Terapia Intensiva. / Alana Patrícia Lima Ferreira; orientadora, Ana Rita Pinheiro Barcessat. – Macapá, 2020.

58 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Azul de metileno. 2. Infecção hospitalar. 3. Unidade formadora de colônia. 4. Micro-organismos orais. 5. Terapia fotodinâmica. I. Barcessat, Ana Rita Pinheiro, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

620.82 F397t

CDD. 22 ed.

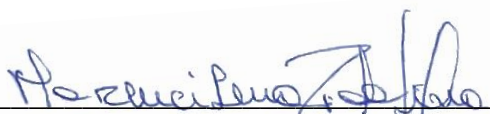
ALANA PATRÍCIA LIMA FERREIRA

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NA CAVIDADE ORAL DE
PACIENTES INTERNADOS EM CENTRO DE TERAPIA INTENSIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof Dr^a Ana Rita Pinheiro Barcessat

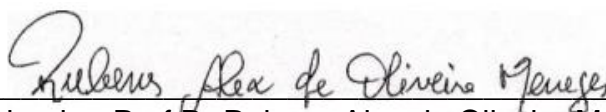
DATA DE APROVAÇÃO: 22/09/2020



Examinadora: Prof^a. Dr^a Marlucilena Pinheiro da Silva
Universidade Federal do Amapá



Examinadora: Prof^a Dr^a Natalia Camargo Rodrigues Iosimuta
Universidade Federal do Amapá



Examinador: Prof Dr Rubens Alex de Oliveira Menezes
Universidade Federal do Amapá



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Rita Pinheiro Barcessat
Universidade Federal do Amapá

À minha mãe Arlene e ao meu pai Amilcar pelo incentivo.

Ao Alessandro Magalhães pelo apoio.

Ao meu amor infinito, meu filho, Alexandre Nicolas.

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos eu pude crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente, tive muitos ganhos e também perdas imensuráveis. Passei por muitos momentos difíceis, mas, em nenhum momento eu desisti dos meus objetivos. Isso porque tem pessoas que me apoiam em todas as minhas escolhas.

À minha mãe Arlene Ferreira, que sempre esteve do meu lado e fez o impossível para me ajudar. Ao meu amor Alessandro por ser tão companheiro, amigo e paciente, sem sua ajuda seria muito mais difícil.

À minha prima Ana Paula e minha afilhada Ana Helena por sempre estarem presentes na minha vida, vocês são importantes para mim.

À Cida pelo incentivo e apoio.

Ao meu filho Alexandre Nicolas que foi o maior desafio da minha vida, fez o mestrado ser mais hard, porém, mais feliz e cheio de amor.

À minha avó (*in memoriam*) que sempre acreditou em mim.

À minha orientadora Ana Rita Pinheiro Barcessat por ser exigente e ao mesmo tempo compreensiva, por possibilitar todo esse aprendizado.

À Franci Cardoso e Prof. Aldo Proietti por todo o apoio no laboratório e pelo acolhimento sem igual.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica consiste na interação de um fotossensibilizador com uma fonte de luz de um comprimento de onda específico e oxigênio. Quando há essa interação fotoquímica ocorre destruição celular dos micro-organismos por estresse oxidativo. Pacientes em terapia intensiva apresentam grande possibilidade de desenvolver infecções que são frequentemente relacionadas à patógenos presentes na microbiota oral. O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito da terapia fotodinâmica nos micro-organismos orais em pacientes internados em centro de terapia intensiva. Três coletas de fluido oral foram realizadas na pesquisa: a primeira realizada nas primeiras 24 horas de internação do paciente. Duas amostras, antes e após intervenção, foram obtidas após 48 horas da primeira coleta. Nos participantes alocados no grupo experimental era aplicada a Terapia Fotodinâmica em sessão única na cavidade oral em região do triângulo retromolar. Nos participantes alocados no grupo controle foi aplicado azul de metileno no triângulo retromolar sem irradiação de laser. As amostras coletadas no hospital eram encaminhadas ao laboratório de microbiologia para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e identificação dos micro-organismos. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP sob nº 2.349.365 e registrado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos – ReBEC: 6VZH6P. Observou-se um aumento numérico de micro-organismos na microbiota oral dos pacientes após 48 horas de internação. Houve diferença estatisticamente significativa entre os números de UFC das amostras coletadas antes e após a TFD, sugere-se que essa intervenção atuou na redução de micro-organismos orais de pacientes internados em CTI em média aproximadamente 78,6%. O azul de metileno na concentração utilizada sem a irradiação de luz não apresentou atividade antimicrobiana. Foram identificados nas amostras de fluido oral: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp* e *Candida albicans*. A terapia fotodinâmica mostra-se capaz de reduzir os micro-organismos orais de pacientes internados em CTI, portanto, sendo possível a utilização desta terapia como meio alternativo ou auxiliar à descontaminação oral, reduzindo a possibilidade de desenvolvimento de infecções.

Palavras-chave: Azul de metileno. Infecção hospitalar. Unidade formadora de colônia. Micro-organismos orais. Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy is the interaction of a photosensitizer with a light source of a specific wavelength. With photochemical interaction, cellular destruction of microorganisms occurs by oxidative stress. Intensive care patients have a high chance of developing changes that are often related to pathogens present in the oral microbiota. The objective of this research is to evaluate the effect of photodynamic therapy on oral microorganisms in patients admitted to an intensive care unit. Three fluid collections were carried out orally in the research: the first performed in the first 24 hours of hospitalization of the patient. Two samples, before and after intervention, were 48 hours after the first collection. In the participants allocated to the experimental group, Photodynamic Therapy was applied in a single session in the oral cavity in the region of the retromolar triangle. In the participants allocated to the control group, methylene blue was applied to the retromolar triangle without laser irradiation. Those samples at the hospital were sent to the microbiology laboratory for counting Colony Forming Units (CFU) and identification of microorganisms. This research was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Amapá - UNIFAP under No. 2,349,365 and registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials - ReBEC: 6VZH6P. There was a numerical increase in microorganisms in the oral microbiota of patients after 48 hours of hospitalization. There was a statistically significant difference between the CFU numbers of those collected before and after PDT, forcing this intervention to reduce the oral microorganisms of patients admitted to the ICU by an average of approximately 78.6%. Methylene blue in the concentration used without the irradiation of light does not present antimicrobial activity. The following oral fluid brands were named: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Coagulase negative Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp* and *Candida albicans*. Photodynamic therapy is able to reduce the oral microorganisms of patients hospitalized in ICUs, therefore, it being possible to use this therapy as an alternative means or to oral decontamination, and reduce the possibility of infection development.

Keywords: Methylene blue. Hospital Infection. Colony Forming Unit. Oral microorganisms. Photodynamic Therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fórmula molecular do Azul de metileno (a) e Azul de toluidina (b)	17
Figura 2 -	Espectro de absorção do Azul de metileno	18
Figura 3 -	Reação fotoquímica da Terapia Fotodinâmica	20
Figura 4 -	Aplicação do fotossensibilizador na cavidade oral (a). Irradiação do Laser sobre o fotossensibilizador (b)	25
Figura 5 -	Aparelho LASER utilizado na pesquisa	26
Figura 6 -	Intervenção nos grupos da pesquisa	27
Figura 7 -	Processo de pesquisa no laboratório para a contagem das UFC	28
Figura 8 -	Teste da catalase à esquerda negativo (<i>Streptococcus spp</i>) e à direita positivo (<i>Staphylococcus spp</i>)	29
Figura 9 -	Fluxograma de identificação dos cocos Gram Positivos	29
Figura 10 -	Meios TSI após serem semeados com BGN e incubados em estufa por 24 horas	30
Figura 11 -	Série Bioquímica. (1) Glicose, (2) Sacarose, (3) Lactose, (4) meio SIM, (5) Citrato, (6) Arginina, (7) Ornitina	30
Figura 12 -	Colônias de <i>Candida albicans</i> em meio Hicrome™ <i>Candida</i> Differential Agar	31
Figura 13 -	Prevalência de aumento numérico de UFC em 48h da primeira coleta de fluido oral	34
Figura 14 -	Meios de cultura c1 e c2 após 24 horas de incubação	35
Figura 15 -	Médias de UFC/ml das amostras antes e após a TFD do grupo experimental	35
Figura 16 -	Médias de UFC/ml.10 ⁻⁵ antes e após aplicação do azul de metileno em pacientes do grupo controle	36
Figura 17 -	Gráfico das quantidades de UFC/mL das amostras antes e após a intervenção referente ao grupo de pesquisa.	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - % de Micro-organismos isolados das amostras de fluido oral em coletas até 24 horas de internação do paciente (c0) e em coletas após 48 horas de internação (c1 e c2) 33
- Tabela 2 - Tabela descritiva dos dados (nº de UFC) das amostras c0 (até 24 horas de admissão) e c1 (após 48 horas de admissão) 33
- Tabela 3 - Tabela descritiva dos dados (nº de UFC) antes e após aplicação de TFD no grupo Experimental 35
- Tabela 4 - Tabela descritiva dos dados (nº de UFC) antes e após aplicação do azul de metileno sem irradiação no grupo Controle 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IRAS:	Infecções relacionadas a assistência à saúde
PAVM:	Pneumonia associada a ventilação mecânica
UTI:	Unidade de Terapia Intensiva
TFD:	Terapia Fotodinâmica
CTI:	Centro de Terapia Intensiva
AM:	Azul de Metileno
EROS:	Espécies Reativas de oxigênio
FS:	Fotossensibilizador
HCAL:	Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima
LED:	Luz Emissora de Diodo
LASER:	Light amplification by stimulated emission of radiation
UFC:	Unidades Formadoras de Colônia
BGN:	Bacilos Gram negativos
CGP:	Cocos Gram positivos
TCLE:	Termo de Consentimento livre e esclarecido
ReBEC:	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
AMH:	Ágar Mueller Hinton
SCN:	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μl	Microlitros
nm	Nanômetro
Mw	Miliwatt
J	Joule
J/cm²	Joule por centímetro quadrado
min	Minuto
Mw/cm²	Miliwatt por centímetro quadrado
O₂⁻	Ânion superóxido
OH⁻	Radical hidroxila
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
λ	Comprimento de onda
μg/L	Micrograma por litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	PACIENTES SOB CUIDADOS INTENSIVOS DE SAÚDE	15
2.1.1	Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde	15
2.2	TERAPIA FOTODINÂMICA	16
2.2.1	Histórico	16
2.2.2	Fotossensibilizadores	16
2.2.3	Fontes de luz na TFD	18
2.2.4	Mecanismo de ação da Terapia fotodinâmica	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	DESENHO DE ESTUDO	22
4.1.1	Participantes da pesquisa e critérios de elegibilidade	22
4.2	GERAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE ALOCAÇÃO	23
4.3	RECRUTAMENTO DA EQUIPE DE PESQUISA E CEGAMENTO	23
4.4	INTERVENÇÕES	24
4.4.1	Coleta de fluído oral	24
4.4.2	Intervenção realizada no Grupo Experimental (G1)	25
4.4.3	Intervenção realizada no Grupo Controle (G2)	26
4.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	27
4.5.1	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias	27
4.5.2	Identificação de Cocos Gram Positivos	28
4.5.3	Identificação de Bacilos Gram Negativos	30
4.5.4	Identificação de leveduras	31
4.6	MÉTODOS ESTATÍSTICOS	31
5	RESULTADOS	32
5.1	PERFIL MICROBIOLÓGICO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA	32
5.2	COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DE UFC DAS AMOSTRAS C0 E C1	33

5.3	COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DE UFC DAS AMOSTRAS C1 E C2 DO GRUPO EXPERIMENTAL	34
5.4	COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DE UFC DAS AMOSTRAS C1 E C2 DO GRUPO CONTROLE	36
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	42
8	OUTRAS INFORMAÇÕES	43
8.1	FINANCIAMENTO	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ	51
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	52
	APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO À ESTAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIFAP	55

1 INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) são eventos adversos que persistem nos serviços de saúde. Estes aumentam os custos dos cuidados aos pacientes, o tempo de internação e apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade nos serviços de saúde. A pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM) é uma das mais frequentes infecções relacionadas a assistência à saúde dentro das Unidades de Terapia Intensiva do Brasil (ANVISA, 2017).

Diversos fatores de riscos estão associados a ocorrência de pneumonia associada a ventilação mecânica, são exemplos: o tempo de permanência hospitalar, o uso de ventilação mecânica e reintubação. A incidência apresenta-se entre 23% e 40% dos pacientes internados (MOTA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018; RESENDE *et al.*, 2013).

A cavidade oral pode ser local de reserva de patógenos respiratórios em pacientes que estão submetidos a ventilação mecânica. Portanto, compreende-se o importante papel da microbiota oral no desenvolvimento do processo de pneumonia associada a ventilação mecânica e a necessidade da higiene oral em pacientes internados em Terapia Intensiva como forma de prevenção dessa condição (SOUZA *et al.*, 2017; VIDAL *et al.*, 2017). Visto isso, é importante buscar novas formas de desinfecção e prevenção de infecções hospitalares com menor risco de resistência bacteriana e efeitos colaterais aos pacientes.

A Terapia Fotodinâmica (TFD), além de outras modalidades, também tem se mostrado efetiva contra bactérias e fungos, mesmo os micro-organismos resistentes aos fármacos, sem ocasionar danos aos tecidos saudáveis. Portanto, esta técnica pode ser utilizada de forma alternativa ou complementar nas terapias antimicrobianas já existentes (LEITE; PIVA; MARTINS-FILHO, 2015). A técnica consiste em gerar altos níveis de estresse oxidativo por meio da tríade da TFD – luz, oxigênio e fotossensibilizador (FS), dessa forma inviabilizando células e micro-organismos (BARCESSAT *et al.*, 2013; CIEPLIK, 2014; PARASURAMAN *et al.*, 2019).

Diante da relevância sobre o que fora exposto, verifica-se a necessidade de busca por métodos que sejam eficazes no auxílio do protocolo terapêutico de descontaminação oral reduzindo micro-organismos que são responsáveis pelas infecções hospitalares em pacientes que apresentem o mínimo de efeitos adversos e efetividade contra esses agentes patogênicos em questão.

O presente estudo objetiva avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica nos microorganismos orais de pacientes internados em CTI.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PACIENTES SOB CUIDADOS INTENSIVOS DE SAÚDE

A sobrevivência dos pacientes críticos é assegurada com a tecnologia utilizada nas Unidades de Terapia intensiva, no entanto, há um aumento dos fatores de riscos que levam ao desenvolvimento de infecções, principalmente a pneumonia associada a ventilação mecânica, 25% das Infecções relacionadas a assistência à saúde – IRAS, ocorrem em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva, este ambiente é considerado como epicentro das infecções oportunistas (MOTA *et al.*, 2017; JOHANI *et al.*, 2017).

Durante a intubação orotraqueal os pacientes permanecem com a boca aberta, em consequência a isso há redução do fluxo salivar e aumento de placa bacteriana, além de procedimentos invasivos aos quais são submetidos esses pacientes. A imunidade prejudicada, o uso indiscriminado de antimicrobiano prévio, o tempo de permanência de internação e a gravidade da condição que o levou a internação, estes são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de infecções dentro do hospital (DA COLLINA *et al.*, 2017; PARASURAMAN *et al.*, 2019; MOTA *et al.*, 2017).

2.1.1 Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC) conceitua infecções relacionadas a ventilação mecânica como infecção adquirida durante o tratamento em serviço de saúde manifestando-se de maneira local ou sistêmica (CDC, 2015) ainda são eventos adversos persistentes nos serviços de saúde. Estes aumentam os custos da assistência ao paciente, o tempo de internação, e morbidade e mortalidade (ANVISA, 2017).

Dentre as IRAS a Pneumonia associada à ventilação mecânica é uma das mais frequentes e se desenvolve a partir de 48 horas de intubação endotraqueal. Esta condição promove impacto na morbidade, mortalidade, além de aumento dos custos nos serviços de saúde, sendo importante priorizar métodos preventivos para esta condição. A higiene oral é essencial nas estratégias de prevenção a PAVM (LOURENÇONE *et al.*, 2019; DA COLLINA *et al.*, 2017).

2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

2.2.1 Histórico

A Fototerapia era utilizada desde a antiguidade na Grécia, Egito e Índia como tratamento médico alternativo (MAHMOUDI *et al.*, 2018). No entanto, a origem da Terapia Fotodinâmica deu-se no século XX, em Munique, na Alemanha. Oscar Raab e seu professor Herman Von Tappeiner observaram que o *Paramecium caudatum* morria rapidamente após ser exposto à luz solar na presença do corante laranja de acridina. Ampliando as pesquisas sobre o evento observado, Herman Von Tappeiner descobriu a necessidade do oxigênio para a reação. Em 1907, foi publicado um livro sobre essa terapia no tratamento de tumor cutâneo e partículas infecciosas (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; SELLERA; NASCIMENTO; RIBEIRO, 2016; SABINO *et al.*, 2016).

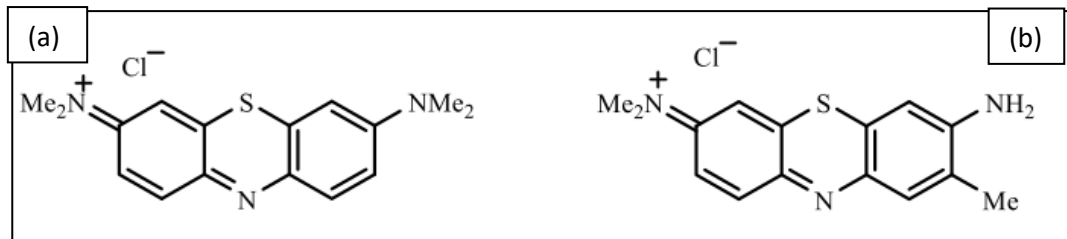
A TFD começou a ser utilizada clinicamente entre os anos 70 e 80. Nesse período iniciaram os estudos do mecanismo e utilização clínica dos fotossensibilizadores derivados da hematoporfirina para tratamento de tumores (DOUGHERTY, 1993).

Vários tipos de fotossensibilizadores (FS) foram desenvolvidos e aplicados em ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos nas últimas três décadas. A terapia fotodinâmica é aplicada com sucesso em diversas áreas: dermatologia, odontologia, oftalmologia, entre outros (ZHANG *et al.*, 2018).

A TFD antimicrobiana tem se mostrado como um bom tratamento coadjuvante na redução de micro-organismos patogênicos, mesmo os que apresentam resistência a drogas utilizadas (SOUSA *et al.*, 2016). Esta representa uma opção de terapia para inativar células de micro-organismos através de luz e fotossensibilizador não-tóxico aos tecidos biológicos (SANTI *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2018).

2.2.2 Fotossensibilizadores

Estudos que envolvem a TFD antimicrobiana vêm utilizando como fotossensibilizador moléculas derivadas principalmente dos fenotiazínicos como o azul de toluidina e o azul de metileno (Figura 1), e produtos naturais como hipericina, riboflavina e curcumina (ABRAHAMSE; MICHAEL, 2016).

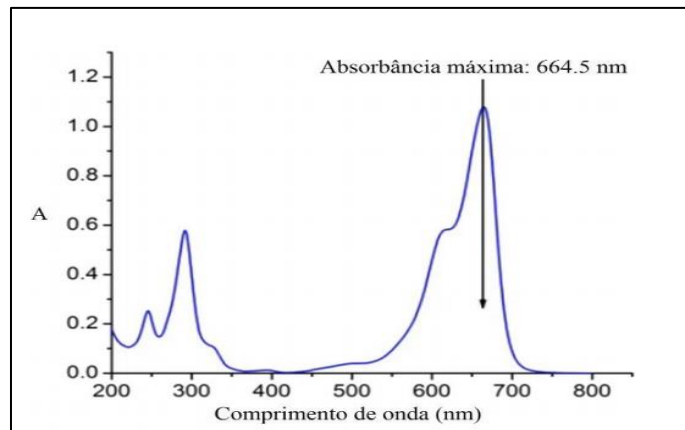
Figura 1 – Fórmula molecular do Azul de metileno (a) e Azul de toluidina (b)

Fonte: Ormond (2013)

Para ser considerado ideal o fotossensibilizador deve apresentar as seguintes características: ter composição conhecida e ser uma substância pura, estável à temperatura ambiente, não apresentar toxicidade aos tecidos do indivíduo, obter alto rendimento de geração de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio, apresentar bandas de absorção intensas com mínima concentração de FS e menor dose luminosa estas capazes de atingir o efeito fotoquímico (ORMOND; FREEMAN, 2013; SABINO *et al.*, 2016).

O fotossensibilizador mais utilizado na terapia fotodinâmica antimicrobiana é o azul de metileno e sua concentração e PH são fatores importantes para a aplicação antimicrobiana. O azul de metileno é um corante pertencente da família das fenotiazinas, e induz formação de radicais da reação do tipo I ou a formação de oxigênio singlete na reação tipo II (HUANG *et al.*, 2019; TOKUBO *et al.*, 2018).

A absorção da luz se dá entre 500-700nm, sendo que o espectro de absorção tem picos na região ultravioleta entre 245nm e 290nm e máxima absorção em torno de 665nm (Figura 2). Este fotossensibilizador na TFD apresenta habilidades antimicrobianas contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e também contra fungos (SORIA-LOZANO *et al.*, 2015; DOS SANTOS, 2018).

Figura 2 – Espectro de absorção do Azul de metileno

Fonte: Adaptado de DOS SANTOS, 2018.

2.2.3 Fontes de luz na TFD

Para que o efeito terapêutico seja obtido durante a aplicação da Terapia fotodinâmica é necessário que haja uma combinação ideal entre fotossensibilizador e parâmetros de irradiação (SANTI *et al.*, 2018). Os estudos clínicos, em sua maioria, utilizam luz de comprimento de onda entre 625 e 633nm, estes comprimentos conseguem permitir maior penetração nos tecidos biológicos. Portanto, as fontes de luz disponíveis para proceder a terapia fotodinâmica são: as lâmpadas de amplo espectro, LED e Lasers (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

As fontes de luz LED compreendem um chip semicondutor localizado em uma superfície reflexiva. Quando há execução da eletricidade pelo semicondutor há produção da luz. O que determina o comprimento de onda da luz produzida é a composição do chip semicondutor. Portanto, a profundidade de penetração do tecido e o alvo da luz são fatores dependentes desse comprimento de onda (OPEL *et al.*, 2015). Comparados aos Lasers, são portáteis e mais baratos, além de sua irradiação ser menos prejudicial para os olhos dos pacientes e profissionais, permitindo assim maior tempo de irradiação (VALLE *et al.*, 2019).

A luz LED azul apresenta comprimentos de onda de 400nm a 470nm e tem penetração máxima de 1mm. Devido a esse fator, a aplicabilidade é adequada para tratamentos de condições mais superficiais (OPEL *et al.*, 2015). Outra limitação é o longo tempo de ativação do FS. Como observado no estudo de Valle *et al.* (2019), o tempo de aplicação do laser foi bem maior em comparação a aplicação da luz LED, a aplicação do LASER diodo foi feita com duas potências (12 e 18 segundos) e a

aplicação de LED em uma (2 minutos e 23 segundos) (BANSAL *et al.*, 2019; CHAVES *et al.*, 2014).

A palavra LASER vem do acrônimo em inglês de “*light amplification by stimulated emission of radiation*”, e consiste em um dispositivo de luz, cuja cavidade óptica ressonante é capaz de gerar luz por meio da passagem de uma corrente elétrica. (BANSAL *et al.*, 2019). Eles são classificados quanto a intensidade e capacidade de interação com tecidos biológicos: lasers de alta intensidade e os lasers terapêuticos de baixa intensidade de energia (NEVES *et al.*, 2005).

O laser de baixa potência atua com dosagem baixa de energia e comprimentos de onda apropriados aos tecidos biológicos (entre 600nm e 1000nm), dessa forma não causa aumento de temperatura e efeitos adversos (ANDERS *et al.*, 1993; POSTEN *et al.*, 2005). A terapia com laser de baixa potência é indolor e não invasiva podendo ser indicada mesmo para pacientes que são impedidos de usarem medicamentos (ABDULJABBAR *et al.*, 2017).

Os efeitos biológicos resultantes de terapia com laser de baixa potência são de estímulo a atividade celular, como redução de células inflamatórias, aumento da proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e estímulo da angiogênese. Com isso há uma aceleração no processo de cicatrização de feridas (CHAVES *et al.*, 2014; BRASSOLATTI *et al.*, 2016).

2.2.4 Mecanismo de ação da Terapia fotodinâmica

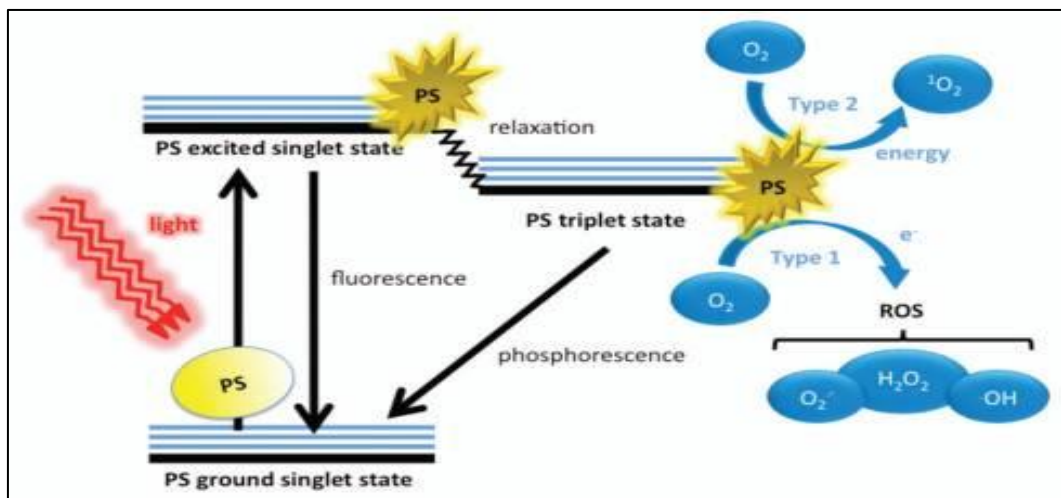
A Terapia Fotodinâmica constitui-se da interação entre três elementos principais: o fotossensibilizador, a luz visível de comprimento de onda específico e o oxigênio. Quando o fotossensibilizador no estado fundamental é irradiado pela luz ocorre absorção de fótons, além disso, elétrons das moléculas são elevados para um nível de maior energia e atingem o estado singleto excitado (MIRANDA; COLOMBO 2017; CARMELLO *et al.*, 2015; VOLPE, 2018).

Este estado é instável e de curta duração, ou seja, tende a retornar ao estado fundamental liberando fluorescência. Nesta tentativa de retorno ao estado fundamental as moléculas do FS passam para o estado tripleto excitado, de menor nível energético. As moléculas do FS tripleto passam por dois tipos de reações: Reação tipo I e reação tipo II (DENIS *et al.*, 2011; MAJEWSKI; JORGE; JUNQUEIRA, 2014).

Na reação tipo I, as moléculas do estado ativado do FS atuam na transferência de elétrons em um substrato (ex.: moléculas orgânicas, membrana celular) resultando na produção de radicais livres que, ao reagir com o oxigênio, geram espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido, peróxido de oxigênio e radical hidroxila. Na reação tipo II, as moléculas excitadas do fotossensibilizador transferem energia para o oxigênio molecular no estado tripleto fundamental, gerando oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que por sua vez é altamente reativo (HU *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2019). Esta reação fotoquímica é representada na Figura 3.

Qualquer macromolécula orgânica apresenta-se como potencial alvo para a TFD, pois as EROs não apresentam especificidade de reação com moléculas orgânicas. Os radicais livres gerados na reação tipo I e oxigênio singleto proveniente da reação tipo II são citotóxicos (DENIS *et al.*, 2011; CARMELLO *et al.*, 2015; HSIEH, 2018).

Figura 3 – Reação fotoquímica da Terapia Fotodinâmica



Fonte: DENIS *et al.* (2011)

Portanto, a TFD antimicrobiana pode ser um tratamento alternativo para doenças relacionadas a micro-organismos formadores de biofilme. A combinação do fotossensibilizador - que é absorvido pelas células microbianas, e a irradiação de luz - resultam na morte celular desses micro-organismos (LEAL *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica nos micro-organismos orais de pacientes internados em Centro de Terapia Intensiva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil microbiológico da saliva dos pacientes incluídos na pesquisa
- Investigar alterações da microbiota oral após 48 horas de internação em CTI
- Avaliar o efeito antimicrobiano do Azul de metileno sem a irradiação do laser
- Identificar os micro-organismos presentes nas amostras de fluido oral coletados

4 MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (parecer nº2.349.365; ANEXO A) e registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC número: RBR-6VZH6P).

Participaram da pesquisa os pacientes que tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (APÊNDICE A) assinado por eles ou pelo responsável.

4.1 DESENHO DE ESTUDO

A presente pesquisa é um estudo descritivo de abordagem quantitativa, exploratória, experimental, com amostra de conveniência, realizada no Centro de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima e no Laboratório Especial de Microbiologia Aplicada (LEMA) da Universidade Federal do Amapá entre 11 de dezembro de 2018 a 14 de dezembro de 2019.

A pesquisa se deu pela coleta de amostra de fluido oral dos pacientes em até 24 horas de admissão em CTI. Após 48 horas da primeira coleta duas novas foram realizadas, sendo uma antes e outra após a aplicação intraoral da terapia fotodinâmica ou aplicação do azul de metileno sem irradiação, a depender do grupo de pesquisa em que o participante fora alocado. As amostras seguiram para análise microbiológica.

O CTI do Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima recebe pacientes com procedências diversas tanto das clínicas do hospital quanto de transferências de unidades externas, e diferentes motivos de internação. Devido a essa característica de abranger todos os pacientes que necessitam de acompanhamento intensivo de saúde que caracteriza o local como centro de terapia intensiva.

4.1.1 Participantes da pesquisa e critérios de elegibilidade

Para a inclusão dos participantes da pesquisa era necessário que estes estivessem internados em Centro de terapia intensiva com menos de 24 horas da admissão, ambos os gêneros e quaisquer condição de saúde.

Nos critérios de exclusão entram os pacientes que foram submetidos à higiene oral no dia da coleta, abertura de boca insuficiente para a visualização do local de

aplicação da TFD, contaminação da amostra c2 por fluido oral que não seja do local padronizado para a pesquisa e o impedimento de realização de uma das coletas. No laboratório os meios que apresentassem quantidade de UFC menor que 30 e maior que 300 eram excluídos da análise, exceto os meios referentes às coletas c2 de ambos os grupos de pesquisa não eram excluídos se apresentassem quantidade de UFC menor que 30.

Os participantes da pesquisa foram selecionados durante a admissão em CTI. Foram recrutados 34 pacientes, sendo 14 pacientes excluídos (6 pacientes não completaram as coletas por motivo de alta ou óbito, 1 paciente com abertura insuficiente de boca para fazer os procedimentos da pesquisa, 2 pacientes foram excluídos por contaminação da amostra c2 em fluido oral proveniente de fora do local padrão de coleta e 5 pacientes tiveram amostras com crescimento de UFC <30 ou >300).

4.2 GERAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE ALOCAÇÃO

Inicialmente, os grupos experimentais e de controle foram sorteados em sequência única aleatória em randomização simples. Assim, na medida em que havia admissão dos pacientes na UTI eles eram tratados de acordo com a sequência pré-definida. Foi utilizado o aplicativo online Research Randomizer (URBANIÁK; PLOUS, 2013). Foram sorteados números de 1 a 2, sendo que o número 1 representou o Grupo G1 (experimental) e o 2 representou o Grupo G2 (controle). A sequência gerada continha 20 números (gerando uma sequência de alocação para 20 pacientes, ou seja, 10 pacientes por grupo).

4.3 RECRUTAMENTO DA EQUIPE DE PESQUISA E CEGAMENTO

A equipe da pesquisa era composta por profissionais da saúde que incluía cirurgiões dentistas (3), técnico em saúde bucal (1), enfermeiro (1), Graduandos em enfermagem (2), Farmacêutico (1) e bioquímico (1).

A equipe responsável pelo procedimento com os pacientes no hospital foi recrutada de forma que profissionais, cirurgiões-dentistas e o técnico em saúde bucal fossem responsáveis pela etapa de intervenção com TFD. Dois pesquisadores já trabalhavam no hospital em que foi desenvolvida a pesquisa. No laboratório de

microbiologia a equipe foi composta pelos demais pesquisadores para garantir o cegamento do estudo e eram responsáveis pelo processamento das amostras obtidas no hospital desde contagem de UFC até a identificação dos micro-organismos.

A equipe atuante na pesquisa foi composta de pesquisadores com as seguintes responsabilidades: alocação numérica dos grupos e indivíduos de forma aleatória, transporte das amostras salivares coletadas entre o hospital e o laboratório de microbiologia, e o processamento das amostras obtidas no hospital em laboratório para gerar os dados.

A geração de sequência de alocação foi elaborada por uma primeira equipe, essa mesma equipe teve a responsabilidade de transportar as amostras obtidas no hospital para o laboratório de microbiologia e revelar a intervenção alocada no momento da intervenção para a equipe responsável pela execução da TFD.

A TFD e coletas foram realizadas por outra equipe de pesquisadores, estes não tinham acesso à correspondência numérica da alocação de pacientes, por isso, o pesquisador da primeira equipe que detinha a sequência de alocação participou do processo de pesquisa no hospital.

Foram feitos procedimentos laboratoriais como semeio em meio de cultura, contagem e identificação de micro-organismos por uma terceira equipe de pesquisadores. Faziam parte dessa equipe os profissionais atuantes no laboratório de microbiologia. Estes receberam as amostras salivares do hospital identificadas por um número que representa o paciente, porém, não revela a qual grupo o paciente foi alocado. Mesmo que o fotossensibilizador azul de metileno confira à amostra uma coloração azulada, visivelmente não há possibilidade de saber se foi ou não feita incidência de luz.

O terceiro nível de cegamento do estudo foi garantido pelos pacientes, durante o procedimento eles utilizaram óculos de proteção com bloqueio total de passagem luminosa caso estivessem conscientes no momento da aplicação, muitos pacientes se encontravam inconscientes durante o período da pesquisa.

4.4 INTERVENÇÕES

4.4.1 Coleta de fluído oral

As coletas de fluido oral foram obtidas por meio da umidificação prévia da cavidade oral com água destilada seguida de aspiração com uma pipeta descartável na região posterior ao último molar denominada trígono retromolar, este foi definido como local padrão de coleta.

O material coletado foi acondicionado imediatamente em tubos de ensaios estéreis e identificados pelo número correspondente ao leito em que se encontrava os pacientes. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia.

As amostras c0 foram obtidas nas primeiras 24 horas de internação em CTI do paciente, após 48 horas desse procedimento, duas novas amostras de fluido oral eram obtidas; a primeira, c1 era feita antes da intervenção e a segunda, c2, após a intervenção.

4.4.2 Intervenção realizada no Grupo Experimental (G1)

Entre as coletas das amostras salivares c1 e c2 dos pacientes alocados no Grupo experimental aplicou-se a Terapia fotodinâmica (TFD). A técnica escolhida para a presente pesquisa foi selecionada de acordo com estudo prévio do mesmo grupo de pesquisa (APÊNDICE B).

Foram aplicadas cinco gotas do fotossensibilizador azul de metileno a 0,5% no trígono retromolar, esperou-se 1 minuto (tempo denominado de pré-irradiação) e em seguida procedeu-se a irradiação com laser vermelho no local onde foi aplicado o FS (Figura 4). Durante as aplicações da TFD, pacientes e profissionais utilizaram óculos de proteção específicos.

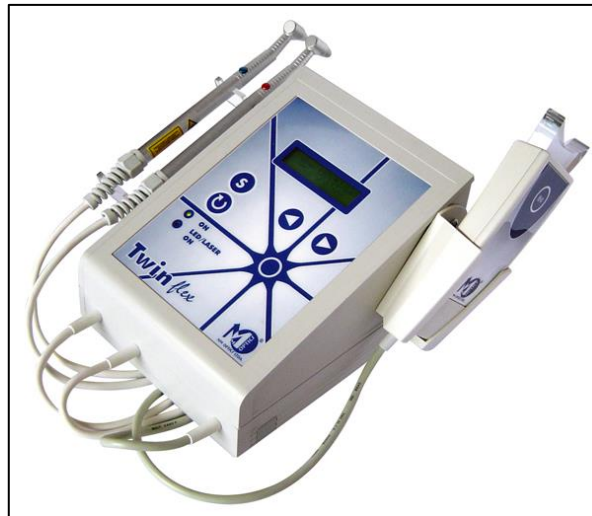
Figura 4 – Aplicação do fotossensibilizador (Azul de metileno) na cavidade oral (a). Irradiação do LASER sobre o fotossensibilizador – TFD (b).



Fonte: acervo da pesquisa.

O equipamento utilizado para realizar a irradiação do laser foi o Twin Flex MM Optics (São Carlos – Brasil). Os parâmetros da fonte de luz utilizados na pesquisa foram: comprimento de onda de 600nm, potência de 40mW, energia de 3,6J, densidade de energia de 90J/cm², densidade de potência de 1000mW/cm², 1 minuto e 30 segundos de irradiação pontual no local padrão de coleta e irradiação única.

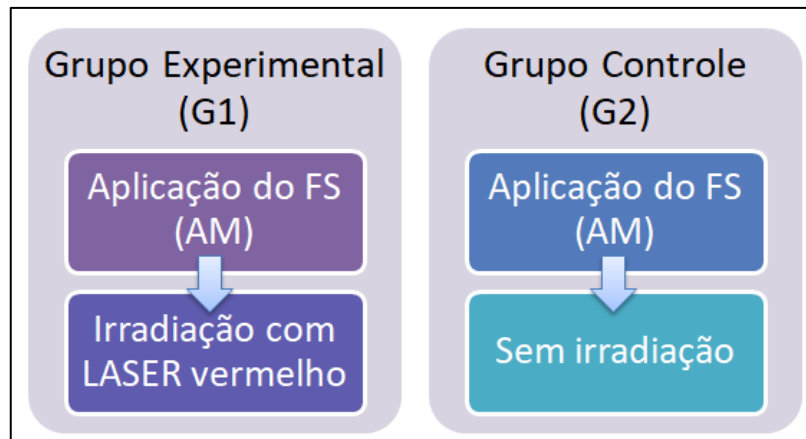
Figura 5 – Aparelho LASER utilizado na pesquisa



Fonte: Disponível em <<http://www.laser.odontologia.ufba.br/equipamentos.html>>

4.4.3 Intervenção realizada no Grupo Controle (G2)

Os pacientes alocados no grupo controle receberam somente a aplicação de 5 gotas de fotossensibilizador Azul de Metileno a 0,5% sem irradiação, aguardou-se 1 minuto. O aparelho foi posicionado no local da aplicação permanecendo com a fonte de luz desligada. Depois de 1,5 minutos a coleta de fluido oral foi realizada. A admissão do grupo controle neste estudo com o fotossensibilizador azul de metileno visou o cegamento da equipe da análise microbiológica em função da pigmentação característica do fotossensibilizador utilizado e também para avaliar o potencial antimicrobiano do FS na ausência da fonte de luz. A Figura 6 representa as intervenções realizadas nos dois Grupos da pesquisa.

Figura 6 – Intervenção nos grupos da pesquisa

Fonte: autoria própria

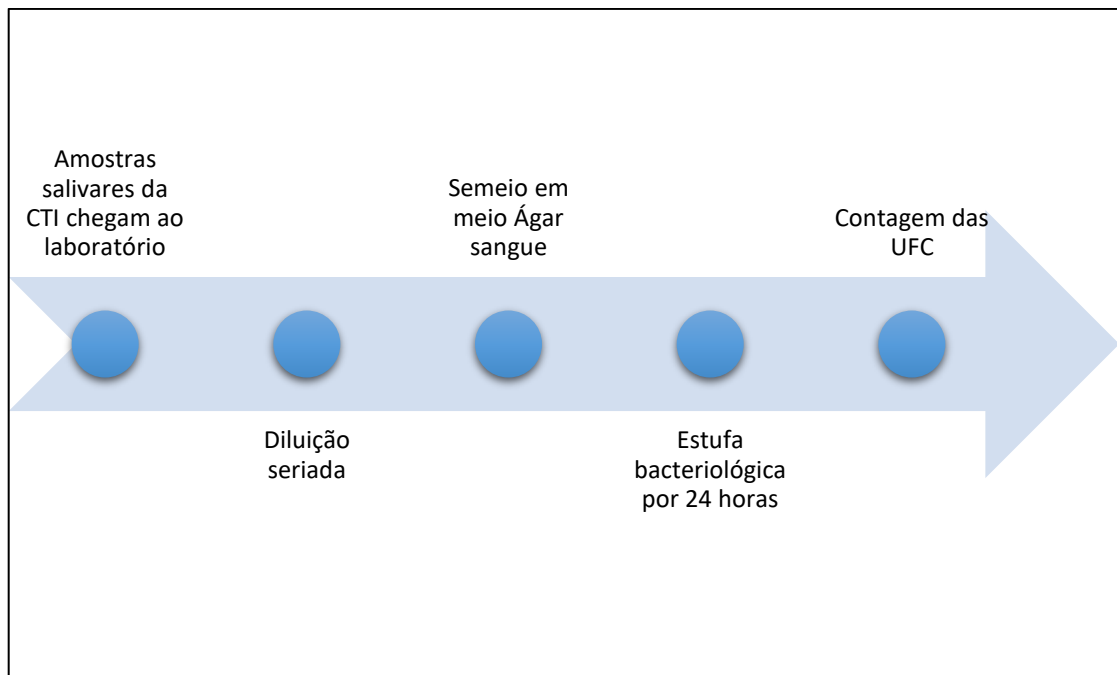
4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.5.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

As amostras foram diluídas e homogêneas em agitador tipo Vortex para semeio no meio de cultura Ágar Sangue. As diluições ocorreram de forma seriada em tubos previamente preenchidos com 9 ml de solução salina estéril nas proporções de 1:10 a 1:100.000, das quais foram semeadas pelo método de espalhamento 100 µl de cada diluição escolhendo-se a diluição que possibilitasse a contagem de UFC que apresentasse entre 30 e 300, a delimitação deste intervalo de UFC reduz a possibilidade de imprecisões na contagem (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017, p. 167) para as amostras desse trabalho a diluição de escolha foi 10^{-5} .

Os meios semeados foram incubados em 5% de tensão de CO_2 (método da vela) a 37°C em estufa bacteriológica pelo período de 24 horas. Então as UFC foram contadas caso o número de UFC corresponda entre 30 e 300 unidades. Por sua vez, a contagem e a caracterização macroscópica das UFC foram feitas com o auxílio de lupa sob luz emergente no contador de colônias CP600 Plus – Phoenix. O processo da chegada das amostras ao laboratório até a contagem é expresso resumidamente na Figura 7.

Figura 7 – Processo de pesquisa no laboratório para a contagem das UFC



Fonte: Autoria própria

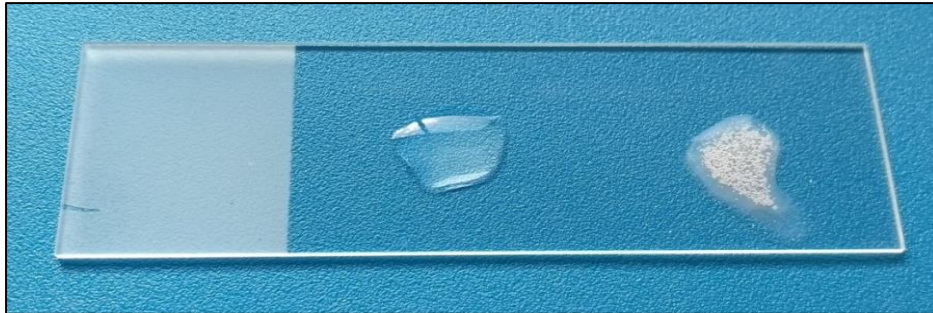
4.5.2 Identificação de Cocos Gram Positivos

Após a contagem, cada colônia de morfotipo macroscópico diferente do meio de cultura passa pelo processo de coloração de Gram para haver a classificação morfológica dos micro-organismos. Após a coloração, os micro-organismos foram observados com microscópio óptico em aumento de 1000x.

Foram feitos repiques do meio Ágar sangue para o meio Ágar Mueller Hinton (AMH) isolando colônias pela técnica de estrias por esgotamento. Após a incubação em estufa bacteriológica por 24 horas fez-se o teste da catalase para a distinção desses cocos em *Staphylococcus spp* ou *Streptococcus spp*.

Neste teste a colônia a ser identificada foi removida com a alça bacteriológica e posta em lâmina de vidro, colocou-se sobre o esfregaço uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Quando há formação de “bolhas” de O₂, entende-se que há a presença da enzima Catalase, portanto, tais micro-organismos são *Staphylococcus spp*. Quando não ocorre a formação de bolhas, os micro-organismos são identificados como *Streptococcus spp* (Figura 8).

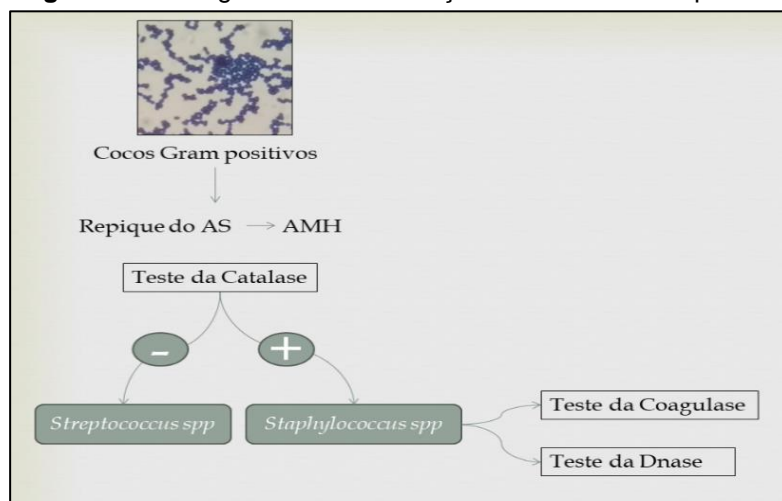
Figura 8 – Teste da catalase à esquerda negativo (*Streptococcus spp*) e à direita positivo (*Staphylococcus spp*).



Fonte: Acervo da pesquisa.

Colônias de *Staphylococcus spp* passaram ainda pelo teste da Coagulase e Dnase para as identificações de possíveis *Staphylococcus aureus*. A figura 9 mostra o fluxo para identificação dos CGP.

Figura 9 – Fluxograma de identificação dos cocos Gram positivos



Fonte: Adaptado de ANVISA, 2008.

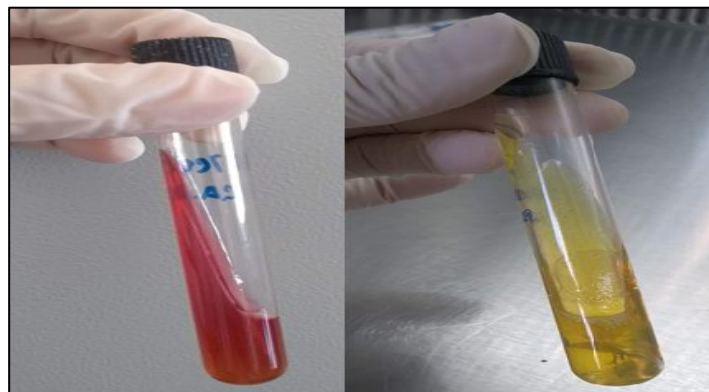
O teste da coagulase consiste na verificação de formação ou não de coágulos nos tubos com plasma sanguíneo semeados com a colônia em questão após um período de 4 horas em estufa a 35°C ou 24 horas caso não haja formação de coágulo. Coagulase positiva refere-se à formação de coágulo após esse período em estufa bacteriológica, e coagulase negativa a não formação desse coágulo. As colônias que foram selecionadas nesse teste são *Staphylococcus spp*. Após, são classificadas como *Staphylococcus coagulase negativa* caso o teste seja negativo, e *Staphylococcus aureus* caso haja formação de coágulo total ou parcial no tubo (ANVISA, 2008).

O teste da Dnase consiste na observação de um halo rosado/ púrpura no local onde fora inoculada a colônia em questão em meio Agar Dnase – Azul de toluidina. O *Staphylococcus aureus* apresenta-se positivo nesse teste (LABORCLIN, 2018).

4.5.3 Identificação de Bacilos Gram Negativos

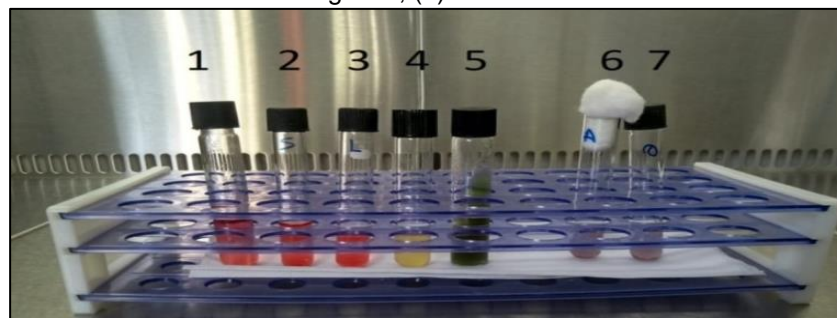
Os Bacilos Gram negativos foram repicados em Meio Ágar EMB (Ágar Eosine methylene Blue), este promove o crescimento de BGN e dificulta o crescimento de CGP. A semeadura neste meio foi realizada pela técnica do esgotamento para haver o isolamento de colônias, estas após incubação em estufa bacteriológica por 24 horas foram semeadas em meio TSI (Triple sugar Iron) e incubadas novamente por 24 horas em estufa (Figura 10). A série bioquímica foi realizada e também é uma técnica para identificar Bacilos Gram negativos pela análise do comportamento bioquímico que esses micro-organismos apresentam (Figura 11).

Figura 10 – Meios TSI após serem semeados com BGN e incubados em estufa por 24 horas



Fonte: Acervo da pesquisa.

Figura 11 – Série Bioquímica. (1) Glicose, (2) Sacarose, (3) Lactose, (4) meio SIM, (5) Citrato, (6) Arginina, (7) Ornitina.

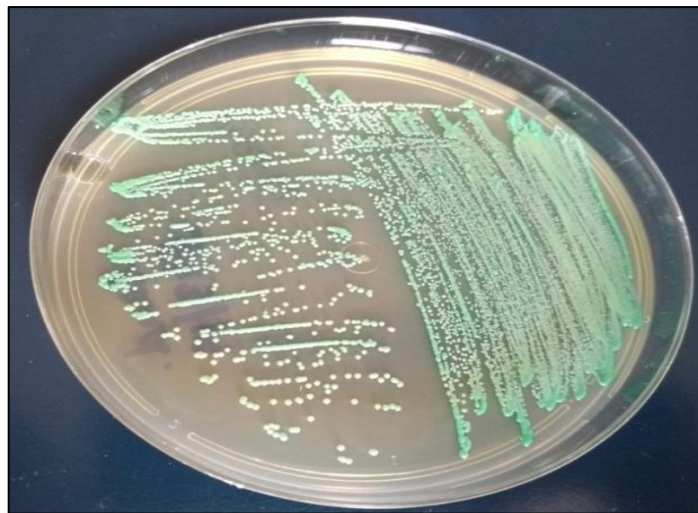


Fonte: Acervo da pesquisa.

4.5.4 Identificação de leveduras

As colônias de leveduras foram semeadas em meio Cromogênico Hicrome™ *Candida Differential Agar* para identificação das espécies de *Candida sp.* As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C durante 48. Tais identificações são realizadas seguindo as instruções do fabricante do meio pela coloração que as colônias apresentavam. A figura 12 apresenta o Meio Hicrome™ *Candida Differential Agar* com colônias de leveduras apresentando coloração verde-claro, identificadas como colônias de *Candida albicans*.

Figura 12 – Colônias de *Candida albicans* em meio Hicrome™ *Candida Differential Agar*



Fonte: Acervo da pesquisa

4.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os dados foram organizados na planilha eletrônica Microsoft Excel, na versão do Microsoft Office Professional Plus 2010 e analisados por meio do software estatístico GraphPad Prism 8.

A variável quantitativa foi obtida por meio de contagem de UFC/mL das amostras salivares, sendo utilizadas as seguintes fórmulas:

- $$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{número de UFC} \times \text{Fator de diluição}) \times 100}{\text{volume salivar pipetado na placa (ml)}}$$
- $$\text{Porcentagem de redução} = \frac{(\text{UFC antes} - \text{UFC depois}) \times 100}{\text{UFC antes}}$$

Utilizou-se estatística descritiva com: média, mediana (medida de tendência central) e desvio padrão (medida de dispersão). As análises foram realizadas com nível de significância de 5%. Foi calculada a média da variação percentual nos grupos controle e experimental. Como os dados apresentaram-se não paramétricos foi realizada a análise da diferença entre as médias de contagem de UFC antes e após intervenção em cada grupo experimental pelo Teste U de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL MICROBIOLÓGICO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Foram coletados 34 pacientes entre 11 de dezembro de 2018 e 14 de dezembro de 2019. Destes, 20 pacientes foram alocados nos grupos de pesquisa, 10 foram alocados no grupo experimental (G1) e 10 alocados no grupo controle (G2). Os 20 pacientes apresentavam idades entre 18 e 81 anos (média 54,05), sendo 13 do sexo masculino (65%) e 7 do sexo feminino (35%).

Dentre os CGP foram identificados *Staphylococcus Coagulase negativa* (SCN), *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* Os BGN identificados nas amostras foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*. As leveduras foram identificadas como *Candida albicans*. Os micro-organismos mais frequentes nas amostras da pesquisa foram os *Streptococcus spp.*

As amostras da coleta c0 apresentaram micro-organismos distintos das amostras das coletas c1 e c2. A TFD não erradicou nenhum micro-organismo com a redução de UFC, portanto, as amostras das coletas c1 e c2 possuem os mesmos. Dessa forma, a ocorrência destes foi organizada em dois momentos: no dia da internação (c0) e após 48 horas de internação (c1/c2).

Staphylococcus coagulase negativa, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp* e *Escherichia coli* foram os micro-organismos que se apresentaram mais frequentemente nas amostras da coleta c1 e c2, ou seja, a colonização microbiana ocorreu após 48 horas de internação. A ocorrência dos micro-organismos isolados na pesquisa por amostras no dia da admissão e após 48 horas de internação e por pacientes está discriminada na Tabela 1.

Tabela 1 –% de Micro-organismos isolados das amostras de fluido oral em coletas até 24 horas de internação do paciente (c0) e em coletas após 48 horas de internação (c1 e c2)

Micro-organismos	amostras c0	amostras c1	n pacientes
<i>Streptococcus spp</i>	15 (75%)	9 (45%)	16 (80%)
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	7 (35%)	11 (55%)	12 (60%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (15%)	4 (20%)	5 (25%)
<i>Klebsiella spp</i>	1 (5%)	3 (15%)	3 (15%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (10%)	1 (5%)	3 (15%)
<i>Candida albicans</i>	2 (10%)	1 (5%)	3 (15%)
<i>Proteus spp</i>	1 (5%)	2 (10%)	2 (10%)
<i>Escherichia coli</i>	1 (5%)	2 (10%)	2 (10%)

Fonte: Dados da pesquisa

5.2 COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DE UFC DAS AMOSTRAS C0 E C1

Esta análise foi realizada independente do grupo de pesquisa alocado, já que as coletas c0 e c1 foram feitas da mesma forma para todos os pacientes da pesquisa. A média da contagem de UFC das amostras c1 foi maior que a média de contagem de UFC das amostras c0, ou seja, a alteração da microbiota oral detectada nesta população é numérica, ocorrendo um aumento de UFC após 48 horas de internação em CTI. A Tabela 2 mostra os valores da estatística descritiva dos dados referentes as amostras c0 e c1:

Tabela 2 – Tabela descritiva dos dados (n° de UFC) das amostras c0 (até 24 horas de admissão) e c1 (após 48 horas de admissão)

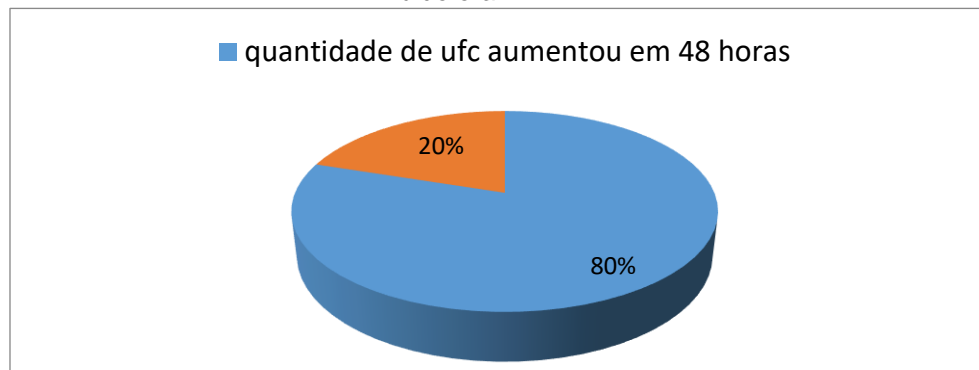
Momento de observação	Até 24 horas de admissão em CTI (c0)	Após 48 horas de admissão em CTI (c1)
N		20
Média	78,30	151,50
Desvio Padrão	72,60	83,77
Mediana	49,50	170,50
Mínimo	0	32
Máximo	258	289
Teste Mann-Whitney U (p)		0,0033

Fonte: Dados da pesquisa

Foi realizado o teste de Mann-Whitney para análise de diferença entre os grupos. Verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,0033$) entre as amostras das coletas c0 e c1. Todos os valores da estatística descritiva são superiores nos dados referentes após 48 horas de internação.

Verificou-se que 80% dos pacientes apresentaram mais UFC nas amostras coletadas após 48 horas de internação se comparados com as amostras coletadas nas primeiras 24 horas de internação (Figura 13). Apenas 20% dos pacientes tiveram amostra da coleta inicial c0 superior à amostra da coleta c1.

Figura 13 – Prevalência de aumento numérico de UFC em 48 horas da primeira coleta de fluido oral.



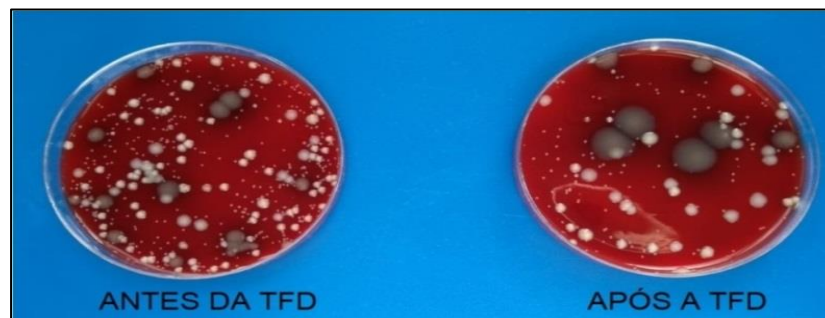
Fonte: Dados da pesquisa

5.3 COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DE UFC DAS AMOSTRAS C1 E C2 DO GRUPO EXPERIMENTAL

Na análise dos dados da contagem de UFC encontrada nas amostras das coletas c1 e c2 (respectivamente antes e após a TFD) observou-se que a terapia fotodinâmica aplicada em cavidade oral atuou na redução estatisticamente significativa ($p=0,004$) do número total de UFC.

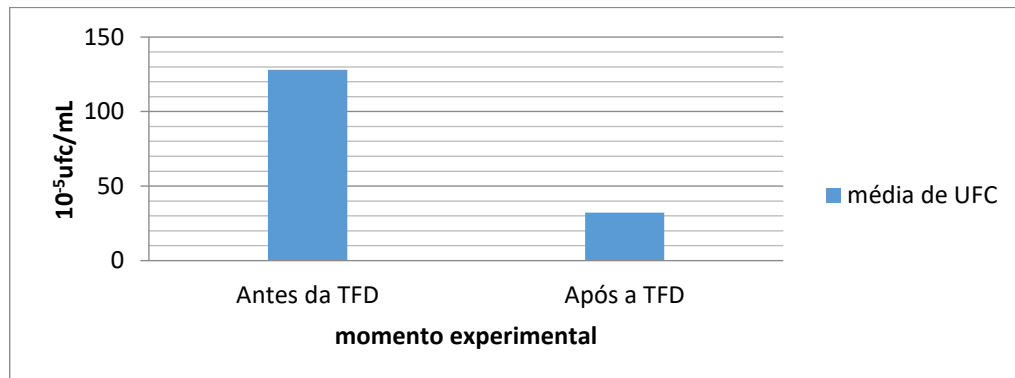
Os meios de culturas semeados com as amostras salivares c2 apresentam menor número de UFC em comparação a c1 do mesmo paciente, essa diferença quantitativa pode ser observada macroscopicamente nos meios de cultura semeados (Figura 14). Em média a redução de micro-organismos no grupo experimental foi de 78,6%, a Figura 15 apresenta as médias das contagens realizadas antes e após a TFD no grupo experimental.

Figura 14 – Meios de cultura c1 e c2 após 24 horas de incubação.



Fonte: Acervo da pesquisa

Figura 15 – Médias de UFC/mL das amostras antes e após a TFD do grupo experimental



Fonte: Dados da pesquisa.

A diferença entre os tempos experimentais antes e após a intervenção com terapia fotodinâmica mostrou-se significativa, pois $p < 0,05$. Os dados do grupo controle apresentam-se numericamente superiores nos dados referentes à antes da TFD e a média da variação percentual de redução dos UFC foi de 78,6%, tais análises estatísticas descritivas foram expressas na Tabela 3.

Tabela 3 – Tabela descritiva dos dados (n° de UFC) antes e após aplicação da TFD no grupo experimental

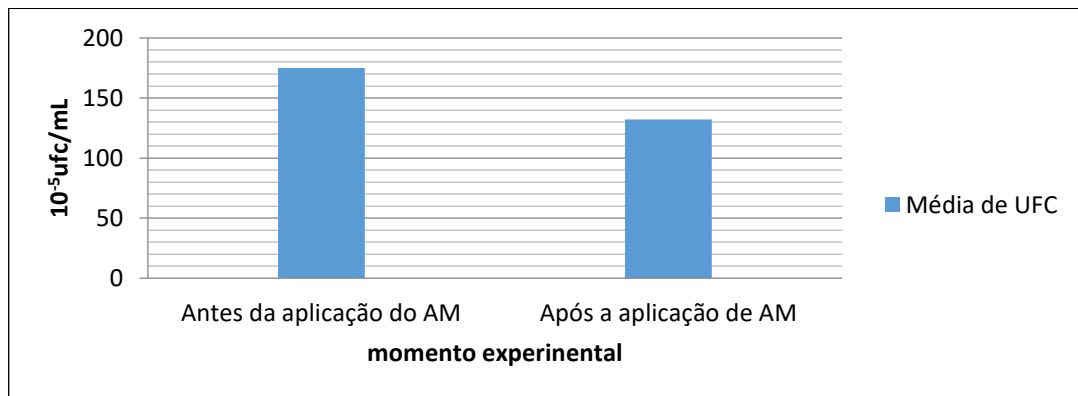
Terapia fotodinâmica (TFD)	Antes (10 ⁻⁵ ufc/mL)	Depois (10 ⁻⁵ ufc/mL)
n		10
Média	128,00	32,10
Desvio padrão	89,50	28,43
Mediana	99,00	17,00
Mínimo	32,00	5,00
Máximo	289,00	80,00
Varição percentual média		78,6%
Teste Mann-Whitney U (p)		0,0021

Fonte: Dados da pesquisa

5.4 COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DE UFC DAS AMOSTRAS C1 E C2 DO GRUPO CONTROLE

No grupo em que foi aplicado apenas o fotossensibilizador Azul de metileno sem a irradiação do laser vermelho obteve um percentual de redução média microbiana de 24,4%, observa-se a diferença das médias de contagens de UFC antes e após intervenção na figura 16. Essa taxa de redução não é estatisticamente significativa, já que o $p > 0,05$ no Teste Mann-Whitney U (Tabela 4).

Figura 16 – Médias de UFC/ml. 10^{-5} antes e após aplicação do Azul de metileno em pacientes do grupo controle



Fonte: Dados da pesquisa

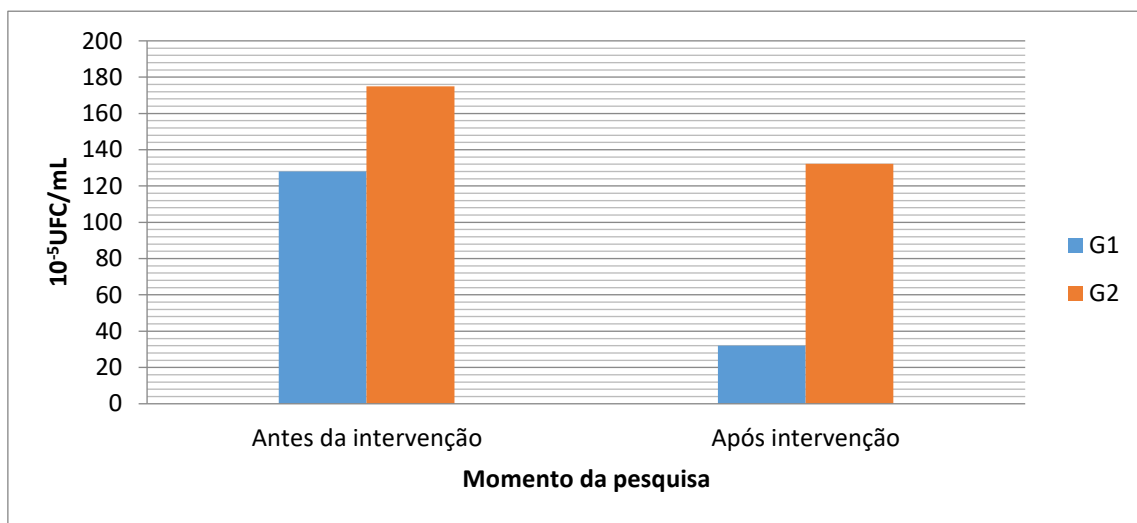
Tabela 4 – Tabela descritiva dos dados (n° de UFC) antes e após aplicação do azul de metileno sem irradiação no grupo Controle

Aplicação do Azul de metileno	Antes (10 ⁻⁵ ufc/mL)	Depois (10 ⁻⁵ ufc/mL)
N		10
Média	175,00	132,2
Desvio padrão	74,69	57,87
Mediana	185,00	136,50
Mínimo	49	35
Máximo	288	205
Variação percentual média		24,4%
Teste Mann-Whitney U (p)		0,0892

Fonte: Dados da pesquisa

O grupo experimental G1 apresentou quantidades de UFC estatisticamente distintas entre as amostras coletadas antes e após a aplicação da Terapia Fotodinâmica ($p=0,0021$), por outro lado, o grupo controle G2 ($p=0,0892$) não apresentou diferença entre as quantidades das amostras coletadas antes e após a aplicação de Azul de metileno. As quantidades de UFC/mL dos grupos de pesquisa antes e após intervenção estão discriminadas na Figura 17.

Figura 17 – Gráfico das quantidades de UFC/mL das amostras antes e após a intervenção referente ao grupo de pesquisa.



Fonte: Dados da pesquisa

6 DISCUSSÃO

Streptococcus spp foram isolados mais frequentemente nas amostras da pesquisa ocorrendo em 80% dos participantes. Isso ocorreu devido ao fato de que esses micro-organismos representam a maioria da constituição microbiana da cavidade oral (PEDERSEN; BELSTROM, 2019). Dentro desse gênero, os *Streptococcus mutans* apresentam importância clínica por serem considerados micro-organismos de alto poder cariogênico (NEMEZIO *et al.*, 2017).

No estudo de Vilefort *et al.* (2016) a maioria dos *Staphylococcus* isolados eram *Staphylococcus coagulase negativa* e em menor quantidade os da espécie *Staphylococcus aureus*, esse achado concorda com o presente estudo onde *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus aureus* ocorreram em respectivamente 60% e 15% dos participantes da pesquisa.

A ocorrência de bactérias resistentes foi detectada por Hirose *et al.* (2019) na cavidade bucal de crianças saudáveis, mais especificamente *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa*, ambas resistentes a meticiclina, segundo os autores os SCN são representados em sua maioria pelo *Staphylococcus epidermidis*, e são patógenos frequentemente associados a infecções oportunistas e PAVM. A presença desses micro-organismos na cavidade bucal de pacientes internados em CTI torna esses pacientes mais suscetíveis às infecções.

Candida albicans foram espécies fúngicas identificadas em amostras de fluido oral nas coletas c0 e c1 e c2. Esses micro-organismos estão presentes naturalmente em simbiose na microbiota oral, no entanto, em pacientes imunossuprimidos pode haver um crescimento excessivo e estes se tornam patogênicos. O presente estudo discorda do estudo de Watkins *et al.* (2017) que afirma uma mudança na microbiota oral de pacientes após internação em UTI principalmente na ocorrência de micro-organismos do gênero *Candida*. Apesar de ser observado um aumento numérico de UFC da microbiota oral pós 48 horas de internação, a presença de espécies fúngicas não foram o principal impacto.

Resende *et al.* (2013) desenvolveu uma pesquisa na mesma unidade federativa da presente pesquisa em Unidade de terapia intensiva, com o objetivo de identificar aspectos clínicos e epidemiológicos associados a PAVM. Foram identificados *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* e *Staphylococcus aureus*, a maioria desses micro-organismos foram identificados no presente estudo. Estes mesmos micro-organismos foram frequentemente isolados no estudo de Johani *et al.* (2017) que objetivava caracterizar as bactérias que colonizavam superfícies em ambiente de UTI, sugere-se então que ocorra influência ambiental na mudança da microbiota do paciente após um período de internação.

Segundo Tuon *et al.* (2017), o tempo de internação do paciente em unidade de terapia intensiva é proporcional a quantidade e composição do biofilme dental, e isso é constatado no presente estudo com a observação de que a maioria dos participantes da pesquisa apresentaram quantidades de UFC das amostras da coleta c1 maiores que as amostras da coleta c0, portanto, as amostras coletadas antes de se completar 24 horas de admissão em CTI apresentavam menos micro-organismos que as amostras coletadas após 48 horas da primeira coleta de fluido oral. Este autor ainda

afirma que o perfil microbiológico de pacientes internados em UTI depende do uso de antimicrobianos, do tempo de internação e a microbiota que compõe o ambiente.

O uso de antimicrobianos resulta numa redução de micro-organismos inclusive na microbiota oral, e isso pode ter acarretado uma média reduzida de UFC nas amostras coletadas nas primeiras horas de admissão do paciente em CTI. Em muitos casos é extremamente necessário o uso de antimicrobiano prévio nesses pacientes, no entanto, se esse uso for feito de forma indiscriminada o risco ao desenvolvimento da PAVM aumenta. Não há estudos registrando o uso anual de antibióticos e qual o diagnóstico que motivou a prescrição médica do fármaco, este seria o primeiro passo para adequar uma intervenção contra a prescrição inadequada de antibióticos (PILTCHER *et al.*, 2018).

Estratégias como implementação de protocolos racionais para uso de antimicrobianos baseados no padrão microbiológico do local, além de rápida entrega dos resultados de cultura e suscetibilidade, ajudam a diminuir as taxas de PAMV e óbito devido a infecções causadas por bactérias multirresistentes em terapia intensiva (RESENDE *et al.*, 2013).

Sands *et al.* (2017) elucida que pacientes sob ventilação mecânica apresentam mudança microbiana na placa dental com inclusão de colonização por patógenos respiratórios, aumentando os riscos de desenvolvimento de PAVM. No presente estudo, houve colonização de micro-organismos nas coletas realizadas após 48 horas de internação que não estavam presentes na coleta inicial c0 realizada no dia da admissão do paciente, são eles *Staphylococcus coagulase negativa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp* e *Escherichia coli*. Estes micro-organismos estão relacionados com a ocorrência de infecções respiratórias durante internação, esse resultado está de acordo com os autores supracitados.

As amostras das coletas c1 e c2 do grupo experimental são estatisticamente diferentes, as amostras das coletas c2 apresentaram quantidade média de ufc/mL menor que as amostras das coletas c1. A TFD atuou na redução do número de ufc no local de aplicação da terapia. A reação fotoquímica realizada por meio da terapia fotodinâmica promoveu redução na contagem total de UFC de micro-organismos orais diversos. Esse resultado concorda com estudo de caso de Nunes *et al.* (2018), que realizou descontaminação por meio de duas modalidades de terapia fotodinâmica em alvéolos pós extração dentária. No caso em que se procedeu a terapia fotodinâmica com o azul de metileno como fotossensibilizador e laser vermelho nos mesmos

parâmetros deste estudo, o percentual de redução de micro-organismos foi de 51%. O mesmo estudo alcança percentuais de redução da ordem de 54% em modalidade de TFD utilizando a combinação da curcumina como fotossensibilizador e o LED azul como fonte de luz.

Outro estudo que constata a eficácia antimicrobiana da terapia fotodinâmica, em condições clínicas, é dos autores Miranda e Colombo (2017), no qual foi feito no grupo controle o tratamento endodôntico convencional e no grupo experimental o tratamento endodôntico convencional adjunto da TFD. Concluiu-se que as duas técnicas promovem sucesso clínico, no entanto, o grupo em que foi aplicada a TFD apresentou melhor reparo periapical no seguimento de 6 meses. A TFD pode promover maior descontaminação do local e assim atuar como coadjuvante na cura mais rápida.

A diferença dos parâmetros de luz, concentração e o tipo do fotossensibilizador, assim como o tempo de pré-irradiação, mostram-se variados mesmo em estudos de mesmo delineamento. Tavares et al. (2017) mostrou a importância da seleção do micro-organismo, propriedades do fotossensibilizador, comprimento de onda e fonte de luz para a eficácia clínica da TFD.

No estudo de Sousa *et al.* (2016), a TFD associando o azul de metileno como FS e fonte de luz LED ($\lambda=660\text{nm}$) reduziu significativamente a contagem de UFC após 10 minutos de irradiação de biofilmes de *Candida*. Não houve redução significativa dos micro-organismos quando se utilizou a Protoporfirina como fotossensibilizador, e isso se deve ao fato desse ser carregado negativamente. A matriz extracelular do biofilme também possui mesma carga fazendo com que esse fotossensibilizador seja repellido, reduzindo a difusão nas células e a efetividade da terapia. Como o azul de metileno é carregado positivamente, há melhor difusão deste FS nas células dos micro-organismos, este FS é mais adequado para a redução de micro-organismos neste caso (MAHMOUDI *et al.*, 2018).

A pré-irradiação é um fator importante para a difusão do FS em biofilmes cariogênicos segundo Fumes *et al.* (2018), no entanto não há protocolo definido. No presente estudo foi adotado o tempo de pré-irradiação de 1 minuto, a variação do tempo de pré-irradiação em outros estudos é de 1 a 5 minutos e o mecanismo de inativação celular dos micro-organismos é dependente desse tempo (VALLE *et al.*, 2019). No grupo controle do presente estudo a média das UFC das amostras antes e após a aplicação do azul de metileno sem irradiação da luz LASER mostraram-se

estatisticamente semelhantes ($p>0,05$), ou seja, o azul de metileno sem a fotoativação com LASER vermelho não teve potencial de reduzir os micro-organismos nesta concentração de FS.

Nemezio *et al.* (2017) não utiliza em seu estudo grupos experimentais, somente luz e somente fotossensibilizador. O autor justifica que em estudos prévios não houve diferença significativa desses grupos para o controle negativo, concordado com o grupo controle do presente estudo que não teve diferença significativa em relação ao tempo experimental antes da intervenção.

Por outro lado, Valle *et al.* (2019) observou no grupo controle negativo que o fotossensibilizador azul de metileno em alta concentração tem efeito antimicrobiano sobre espécies de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Este efeito antimicrobiano deste fotossensibilizador na ausência de luz não foi observado no presente estudo, porém, o autor utilizou uma concentração elevada de Azul de metileno (10mg/mL), no presente estudo fora utilizado apenas o FS a 0,5% ou 5mg/mL.

A TFD mostrou-se efetiva na redução de micro-organismos no estudo *in vitro* de Tunccan *et al.* (2018) em que a combinação de LED vermelho e azul de metileno promoveu redução de biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* em, respectivamente, 75% e 60%. As variações percentuais estão semelhantes ao presente estudo, este apresentou uma variação percentual de redução microbiana de 78,6%. Em condições clínicas os fluidos orais, os tecidos da cavidade bucal e a variedade de apresentação dos micro-organismos constituinte da microbiota oral podem promover alguma limitação da técnica de aplicação da terapia fotodinâmica, porém, ao alcançar níveis de redução semelhante a estudos *in vitro* é uma evidência de que a Terapia fotodinâmica apresenta resultados satisfatórios na redução da carga de micro-organismos orais de pacientes internados em Centro de Terapia Intensiva.

7 CONCLUSÃO

A Terapia fotodinâmica antimicrobiana que associou o azul de metileno ao LASER vermelho, aplicada na cavidade oral de pacientes internados em CTI apresentou uma redução média no número de UFC de 78,6%, sendo eficaz para descontaminação oral em pacientes internados em CTI.

Em pacientes que não receberam a irradiação do LASER vermelho após a aplicação do fotossensibilizador não foi observado efeito antimicrobiano do azul de metileno sem a irradiação da luz.

Foi observado um aumento numérico de Unidades Formadoras de Colônias da saliva dos pacientes após 48 horas de internação em CTI.

Foram identificados nas amostras salivares: *Streptococos spp*, *Staphylococos coagulase negativa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Esses micro-organismos apresentam importância clínica para pacientes internados em terapia intensiva.

Observamos a eficácia da Terapia Fotodinâmica em reduzir bactérias orais de pacientes internados. Portanto, a Terapia Fotodinâmica pode ser uma grande aliada para a prevenção de infecções hospitalares de micro-organismos provenientes da cavidade oral, sendo utilizada como meio alternativo ou auxiliar a descontaminação oral.

É relevante desenvolver novos estudos com o intuito de sistematizar o uso do aparelho LASER em ambiente hospitalar para descontaminação oral em pacientes que apresentam risco de desenvolver infecções graves.

8 OUTRAS INFORMAÇÕES

8.1 FINANCIAMENTO

Este estudo foi apoiado financeiramente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá-FAPEAP por meio do programa de núcleos emergentes (PRONEM). Processo 092/2018.

REFERÊNCIAS

ABDULJABBAR, T. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy adjuvant to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: A meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **National Library of Medicine**. v. 17, p. 138-146, Mar 2017.

ABRAHAMSE, H; MICHAEL, R.H. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem J**. v.473, n.4. p.347-364, 2016.

ANDERS, J.J. *et al.* Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. **Lasers In Surgery and medicine**, v.13, n1, p.72-82, 1993.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) - BRASIL. **Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasília: Anvisa, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Noções gerais para boas práticas em microbiologia clínica**, 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/fluxo_sta.htm> Acesso em: 23/02/2020.

BANSAL, V. *et al.* A clinico-microbiologic study comparing the efficacy of locally delivered chlorhexidine chip and diode LASER as an adjunct to non-surgical periodontal therapy. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**. v.9, p. 67–72, 2019.

BARCESSAT, A.R. *et al.* Effect of topical 5-ALA mediated photodynamic therapy on proliferation index of keratinocytes in 4-NQO-induced potentially malignant oral lesions. **Journal of Photochemistry Photobiology B Biology**, USA, v. 5, n.126, p.33-41, 2013.

BRASSOLATTI, P. *et al.* Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microsc Res Tech**, v. 79, n. 4, p. 313- 320, Apr 2016.

CARMELLO, J.C. *et al.* Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research Advance**, v. 15, n.4, p. 01-09, 2015.

CHAVES, M.E.A. *et al.* Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **An Bras Dermatol**; v.89, n.4, p.616-23, 2014.

CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. **Front Microbiol**; v.5, n.40, p.01-17, 2014.

DA COLLINA, G.A. *et al.* oral hygiene in intensive care unit patients with photodynamic therapy: study protocol for randomized controlled trial. **Trials**, v.18, n.385, p.18-385, 2017.

DENIS, T.G.S. *et al.* Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**; v.2, n.6, p.509–520, Nov-Dec , 2011.

DOS SANTOS, A.M. **Atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores clorina e6 e azul de metileno associados a nanopartículas de ouro sintetizadas por ablação a laser.** Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ), Rio de Janeiro, 2018.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* **National Library of Medicine.** v.58, n.6, p. 895-900, 1993.

FUMES, A.C. *et al.* Effect of aPDT on Streptococcus mutans and Candida albicans presente in the dental biofilm: Systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 363-366, 2018.

HIROSE, M. *et al.* Prevalence and Genetic Characteristics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Oral Cavity of Healthy Children in Japan. **Microbial drug resistanc.** v.25, n. 3, p. 400-407, 2019.

HSIEH, Y.H. *et al.* An in vitro study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on Candida albicans. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.2, p. 01-11, 2018.

HU, X. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p. 01-24, 2018.

HUANG, T.C. *et al*, Antimicrobial efficacy of methylene blue-mediated photodynamic therapy on titanium alloy surfaces in vitro, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2018. **National Library of Medicine**. v.25, n.7, p. 7-16, 2019.

ISSA, M.C.A; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.

JOHANI, K. *et al*. Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces, **J. Infect. Public Health.**, v.11, n.3, p.418–424, 2017.

LABORCLÍN. **DNASE ÁGAR-C/ AZUL DE TOLUIDINA-20mL-PL90X15-10PL**.

Laborclin Rev 4/2018. Disponível em:

https://www.laborclin.com.br/wpcontent/uploads/2019/06/Agar_DNASE_540219.pdf.

Acesso em 02 de out 2020.

LEAL, C.R.L. *et al*. Antimicrobial photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. **National Library of Medicine**, v.19, p.01-04, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.04.004>. Acesso 12 ago 2020

LEITE, D.P; PIVA, M.R; MARTINS-FILHO, P.R.S. Identification of candida species in patients with denture stomatitis and evaluation of susceptibility to miconazole and photodynamic therapy. **Rev Odontol. UNESP**; v.44, n.1, p. 12-17, jan-fev, 2015.

LOURENÇONE, E.M.S. *et al*. Adesão às medidas preventivas versus incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica. **Rev. Epidemiol. Controle Infec**, v.9. n.2, p. 142-148, 2019.

MAHMOUDI, H. *et al*. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. **J Lasers Med Sci**; v.9, n.3, p.154–160, 2018.

MAJEWSKI, M; JORGE, A.O.C; JUNQUEIRA, J.C. Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana em leveduras do gênero *Candida*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v.35, n.4, p.663-669, 2014.

MATOS, R.P.A. *et al*. Effect of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in cervical carcinoma cell lines. **BioMed Research International**, v.2018, p. 01-11, 2018.

MIRANDA, R.G; COLOMBO, A.P.V. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. **Clin Oral Invest**, v.22, n.4, p.1751-1761, 2017.

MOTA, E.C. *et al.* Incidência da pneumonia associada a ventilação mecânica em unidade de terapia intensiva. **Medicina (Ribeirão Preto, Online)**; v.50, n.1, p.39-46, 2017.

NEMEZIO, M.A, *et al.* Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.20, p.234–237, 2017.

NEVES, L.S. *et al.* Utilização do laser em Ortodontia. **Rev Dental Press Ortod Ortop Facial**. v.10, n.5, p.149-56, 2005.

NUNES, C.S.R. *et al.* Descontaminação fotoquímica de alvéolos dentários em técnicas distintas de Terapia Fotodinâmica: relato de dois casos clínicos. **Estação Científica (UNIFAP) Macapá**, v. 8, n. 2, p. 129-137, maio/ago. 2018.

OPEL, D.R. *et al.* Light-emitting Diodes A Brief Review and Clinical Experience. **The Journal of Clinical and Aesthetic dermatology**. v.8, n.6, p.36-44, 2015.

ORMOND, A.B; FREEMAN, H.S. Dye Sensitizers for photodynamic therapy. **Materials. Ortodon Ortop Facial.**, v.6, p. 817-840, 2013.

PARASURAMAN, P. *et al.* Synthesis and antimicrobial photodynamic effect of methylene blue conjugated carbon nanotubes on *E. coli* and *S. aureus*. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v.18, n.2, p.563-576, 2019.

PEDERSEN, A.M.L; BELSTROM, D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. **J Dent**; v.80(Suppl 1):S3-S12, 2019.

PILTCHER, O.B. *et al.* How to avoid the inappropriate use of antibiotics in upper respiratory tract infections? A position statement from an expert panel. **Braz J Otorhinolaryngol**. v.84, p.265-79, 2018.

POSTEN, W. *et al.* Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol Surg**, v. 31, n. 3, p. 334-340, Mar 2005.

RESENDE, M.M. *et al.* Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in northern Brazil: an analytical descriptive prospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v.13, n.119, p. 01-06, 2013.

SABINO, C. P. *et al.* The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 72– 78, 2016.

SANDS, K.M. *et al.* Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotraqueal tube biofilms during mechanical ventilation. **Journal of critical care**. v.37, p. 30-37, 2017.

SANTI, M.Ê.S. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach for the treatment of vulvovaginal candidiasis: preliminary results. **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 1925-1931, 2018.

SELLERA, F. P.; NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S. **Photodynamic therapy in veterinary 97 medicine: From basics to clinical practice**. Springer International Publishing, Ed 1, 228 p., 2016.

SORIA-LOZANO, P. *et al.* In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. **BMC Microbiology**, v.15, n.187, 2015.

SOUSA, A.S. *et al.* Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.14. p. 111-114, 2016.

SOUZA, L.C.D. *et al.* Infecção oral por pseudomonas aeruginosa em paciente com doença renal crônica – Um relato de caso. **Braz. J. Nephrol**; v.40, n.1, p.82-85, 2018.

SOUZA, L.C.D. *et al.* Association between pathogens from tracheal aspirate and oral biofilm of patients on mechanical ventilation. **Braz. Oral Res**. v.31:e38, p. 01-09, 2017.

TOKUBO, L.M. *et al.* Antimicrobial effect of the photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.23, p.94-98, 2018.

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiologia**: 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TUNCCAN, O.J. *et al.* The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on Candida and Staphylococcus biofilms. **Turk J Med Sci**, v.48, p.873-879, 2018.

TUON, F.F. *et al.* Prospective, randomised, controlled study evaluating early modification of oral microbiota following admission to the intensive care unit and oral hygiene with chlorhexidine. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v.8 p.159–163, 2017.

URBANIAK, G.C; PLOUS, S. Research Randomizer. **(Version 4.0) [computer software]**. Retrieved on June 22, 2013. Disponível em: <http://www.randomizer.org/>. Acesso em 15 abr 2018.

VALLE, L.A. *et al.* Blue photosensitizers for aPDT eliminate *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in the absence of light: An in vitro study. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v.196, p. 56-60, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.03.005>. Acesso 12 abr 2020.

VIDAL, C.F. *et al.* Impact of Oral Hygiene Involving Toothbrushing versus Chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia: a randomized study. **BMC Infectious Diseases**. v.17, n.112, 2017.

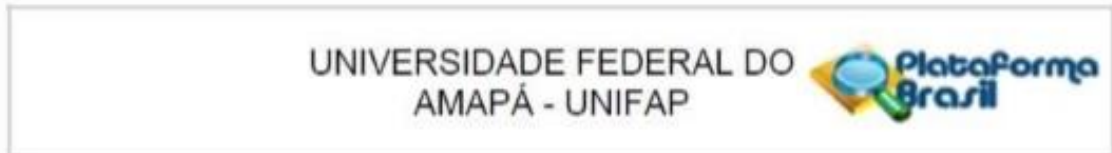
VILEFORT, L.O.R. *et al.* Colonização de trabalhadores de áreas de apoio hospitalar por *Staphylococcus* sp.: aspectos epidemiológicos e microbiológicos. **Rev. Eletr. Enf. [Internet]**.; v.18, n.e1146, p.01-09, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5216/ree.v18.29766>. acesso em: 21 de jan 2020.

VOLPE, R.A.F.N. *et al.* Photodynamic therapy for the treatment of American tegumentary leishmaniasis: evaluation of therapies association in experimentally infected mice with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J Lasers Med Sci**.;v.9, n.4, p.274-282, 2018.

WATKINS, R.R. *et al.* Admission to the Intensive Care Unit is associated with changes in the oral microbiome. **Journal of Intensive Care Medicine**, v.32, n.4, p.278-282, 2017.

ZHANG, J. *et al.* Na updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta pharmaceutica sinica**; v.8, n.2, p.137-146, 2018.

**ANEXO - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**



Continuação do Parecer: 2.349.365

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_957878.pdf	13/10/2017 13:01:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	11/10/2017 15:36:57	Ana Rita Pinheiro Barcessat	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.docx	11/10/2017 15:27:12	Ana Rita Pinheiro Barcessat	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	11/10/2017 15:26:18	Ana Rita Pinheiro Barcessat	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_de_anuencia.PDF	25/09/2017 11:34:42	Ana Rita Pinheiro Barcessat	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	23/09/2017 18:01:40	Ana Rita Pinheiro Barcessat	Aceito
Orçamento	CRONOGRAMA_FINANCEIRO.docx	23/09/2017 17:12:20	Ana Rita Pinheiro Barcessat	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MACAPA, 25 de Outubro de 2017

Assinado por:
RAPHAELLE SOUSA BORGES
(Coordenador)

APÊNDICE A– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Resolução 466/2012 CNS/CONEP)

Eu estou sendo convidado a participar de um estudo intitulado “Eficácia da Terapia Fotodinâmica na redução de micro-organismos da cavidade oral de pacientes internados em unidade de terapia intensiva: Ensaio clínico randomizado”, com objetivo de demonstrar a eficácia da terapia fotodinâmica (TFD) com laser e azul de metileno na prevenção de infecções hospitalares em Unidade de Terapia Intensiva. A minha participação no referido estudo será participar de uma sessão de Terapia fotodinâmica – será colocado na cavidade oral corante não tóxico, e irradiado luz para promover a redução dos micro-organismos, serão utilizados material de sucção e óculos de proteção para a segurança do procedimento, além do acompanhamento de um cirurgião dentista. Assim como a coleta de material da cavidade oral para análise para que tal pesquisa seja realizada com uso de materiais estéreis. Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como redução microbiana da cavidade oral diminuindo a possibilidade de ocorrer infecção hospitalar proveniente de micro-organismos com acesso a cavidade oral e sem promover resistência bacteriana. Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, o corante utilizado não apresenta sabor agradável, contudo é atóxico e não causa efeitos colaterais e nem interações medicamentosas. Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me 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 de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo. Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Adriana Verônica Gato da Silva, Cirurgiã-dentista da UTI do Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima; Alana Patrícia Lima

Ferreira, Cirurgiã-dentista Mestranda no Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá; Lucas dos Santos Nunes, Graduando em Enfermagem pela Universidade Federal do Amapá; Carla Emmanuela Xavier da Silva, Graduanda em enfermagem pela Universidade Federal do Amapá; Ana Rita Pinheiro Barcessat, Cirurgiã-dentista Professora Titular da Universidade Federal do Amapá. E com eles poderei manter contato pelos telefones: Alana Ferreira: (96)99193-8709; Lucas Nunes (96)98115-1319; Carla Xavier (96) 99180-8524; Ana Rita Barcessat (96) 98133-4223. É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido 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.

Alana Patrícia Lima Ferreira

Adriana Verônica Gato da Silva

Carla Emanuela Xavier Silva

Lucas dos Santos Nunes

Ana Rita Pinheiro Barcessat
Orientadora

Comitê de Ética em Pes:
Bairro Marco Zero

Amapá Rodovia JK, s/n –
(96) 4009-2804/2805

Macapá-AP, ____ de _____ de 201__.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO e estou de acordo em autorizar a participação no estudo proposto, sabendo que dele poderei desistir a qualquer momento, sem sofrer qualquer punição ou constrangimento.

Assinatura do voluntário

Caso o paciente esteja impossibilitado de assinar:

Eu _____, abaixo assinado, confirmo a leitura do presente termo na íntegra para o (a) paciente _____, o (a) qual declarou na minha presença a compreensão plena em participar desta pesquisa, o qual utilizou a sua impressão digital (abaixo) para confirmar a participação.



Polegar direito (caso não assine)

Testemunha nº 1: _____

Testemunha nº 2: _____

APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO À ESTAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIFAP**EXEQUIBILIDADE CLÍNICA DE DUAS TÉCNICAS DE TERAPIA FOTODINÂMICA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: ESTUDO COMPARATIVO IN VIVO***CLINICAL EXEQUIBILITY OF TWO PHOTODYNAMIC THERAPY TECHNIQUES IN INTENSIVE THERAPY UNIT: COMPARATIVE STUDY IN VIVO***Resumo:**

Os ambientes de terapia intensiva nos hospitais respondem por altos índices de infecções relacionadas à assistência, de forma que a redução microbiana por estresse oxidativo, proporcionada pelo efeito fotodinâmico, surge como uma possibilidade para a descontaminação de superfícies com destaque para a cavidade oral, porta de entrada conhecida de microrganismos patogênicos. Este estudo propõe-se a comparar a viabilidade de duas técnicas de terapia fotodinâmica- TFD, em ambiente de UTI. Vinte pacientes de um Hospital público da cidade de Macapá-AP receberam duas técnicas de TFD uma utilizando o azul de metileno 0,05% e o laser vermelho - G1 e a outra a curcumina com um LED azul- G2. Os aspectos avaliados foram o tempo da técnica, a aderência do fotossensibilizador à mucosa, a facilidade de aplicação, o custo do fotossensibilizador, o custo da fonte de luz e o conforto do paciente. A TFD mediada pelo azul de metileno e laser foi mais eficaz quanto ao tempo da técnica, à aderência à mucosa e ao custo do FS. As técnicas foram equivalentes no aspecto de facilidade de aplicação. Concluindo-se que para protocolos realizados em ambiente como UTI a técnica que associa AM ao Laser mostrou-se mais exequível.

Palavras-chave: Azul de Metileno, Curcumina, LED Azul