Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2020

**SENSIBILIDADE BACTERIANA À
ANTIBIÓTICOS APÓS IRRADIAÇÃO COM LED
(*LIGHT EMITTING DIODE*): *IN VITRO***

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

Flávia Fernanda de Oliveira Assunção

**Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Roberto
de Jesus Guirro**

Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FLÁVIA FERNANDA DE OLIVEIRA ASSUNÇÃO

**SENSIBILIDADE BACTERIANA À ANTIBIÓTICOS APÓS IRRADIAÇÃO
COM LED (*LIGHT EMITTING DIODE*): *IN VITRO***

Ribeirão Preto
2020

FLÁVIA FERNANDA DE OLIVEIRA ASSUNÇÃO

VERSÃO CORRIGIDA

**SENSIBILIDADE BACTERIANA À ANTIBIÓTICOS APÓS IRRADIAÇÃO
COM LED (*LIGHT EMITTING DIODE*): *in vitro***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisioterapia

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Assunção, Flávia Fernanda de Oliveira.

Sensibilidade bacteriana à antibióticos após irradiação com LED (*Light Emitting Diode*): *in vitro*/ Flávia Fernanda de Oliveira Assunção; orientador Rinaldo Roberto de Jesus Guirro - Ribeirão Preto, 2020.

f: 98 p.: Il.; 30cm

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

1. Fotobiomodulação 2. Inativação Bacteriana 3. Queimaduras

I. Sensibilidade bacteriana à antibióticos após irradiação com LED (*Light Emitting Diode*): *in vitro*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Assunção, Flávia Fernanda de Oliveira

Título: SENSIBILIDADE BACTERIANA À ANTIBIÓTICOS APÓS IRRADIAÇÃO
COM LED (*LIGHT EMITTING DIODE*): *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai José por todo amor, suporte e incentivo em toda minha vida e a minha Mãe Maria por ser minha melhor amiga e minha fortaleza em todos os momentos. A vocês meus pais minha eterna gratidão pela generosidade e oportunidade em realizar meus sonhos e atingir minhas grandes conquistas, por ensinarem os valores da vida, por me incentivarem a não ter medo no novo, e não ter vergonha de mostrar quem eu sou

Ao meu irmão Fernando, meu amigo fiel e sincero. Hoje, meu maior incentivador, meu orgulho. Com suas palavras sempre certas e positivas, nunca me deixou desanimar

A minha eterna professora Adriana Clemente Mendonça, há tantos anos minha amiga. Pra você é muito difícil encontrar palavras, mas tenho eterna gratidão em te dizer que a oportunidade que um dia você me deu, transformou a minha vida

Aos meus amados alunos e ex-alunos que sempre me incentivaram, torceram e se alegraram com cada etapa vencida, com um sorriso, uma palavra e mesmo de longe se mantiveram presentes

E a todos aqueles que confiam no meu trabalho

Foi por todos vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

O meu agradecimento mais difícil, pois tantas são suas qualidades. Ao querido Prof. Dr. Rinaldo Roberto de Jesus Guirro que do início ao fim desta jornada esteve presente, me oferecendo não apenas orientação e respeito, mas cedendo a mim em tantos momentos, um, de seus tantos valores, que é o seu conhecimento. Sempre humilde, encontrava de forma tão rápida e simples, soluções para tantos problemas que esta pesquisa enfrentou. Sua inteligência de fato primorosa só me fez admirá-lo a cada dia, aumentando em mim a responsabilidade em realizar um trabalho que estivesse à altura da magnitude que sua presença representa para a profissão e a pesquisa na Fisioterapia. Não há como não dizer que todo esse período foi de admiração, e principalmente um privilégio, ser sua aluna. Eternamente grata professor!

AGRADECIMENTOS

Deus não tenho nada a pedir, apenas agradecer

A Profa. Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro pelo acolhimento desde o início desta jornada, por me guiar em tantas atividades profissionais e pessoais, sempre enriquecendo com seu valioso conhecimento e autenticidade. Agradeço também pelas oportunidades e pela confiança. É privilégio em conviver com você

Aos Profs. Drs. Roberto Martinez do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e Luciano Bachmann do Laboratório de Fotobiofísica da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pelo amparo e ensinamentos transmitidos nesta jornada, bem como por disponibilizar seus técnicos de laboratório para me ajudar em todos os momentos em que precisei. E também ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pinfildi e Prof. Dr. Almir Dibai no processo de qualificação

Ao Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Júnior Chefe da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pela colaboração e ensinamentos a mim transmitidos

A minha amiga Rosana Gomes Caetano, por toda sua atenção e disponibilidade em me ensinar algo tão desconhecido, para que eu pudesse caminhar sozinha. Agradeço ainda pela amizade que construímos ao longo desses anos, e minha amiga Nathália Cristina de Souza Borges, por todo apoio e carinho no início desta etapa, e hoje, minha amiga, parceira e confidente. Vocês sempre deixaram os momentos difíceis mais fáceis e mais alegres, e daqui, pra sempre.

A Giovana Dutra por toda sua disponibilidade e responsabilidade em me ajudar

A querida amiga Carla Perez pela ajuda, incentivo amizade e companhia que serei sempre grata

Aos amigos do LARF Aline Gobbi, Gabriela Carvalho Rotoly, Damião Miranda Ngonga, Filipe Ramos Carlos, Carlos Girassol, por toda ajuda que recebi sempre que pedi, pelas conversas, pela companhia e pelos momentos de descontração

A Adriana da Costa Gonçalves por não medir esforços e toda dedicação em me ajudar durante as coletas, amizade e por tudo que me ensinou

A incrível e querida Erika do Nascimento meu eterno agradecimento por todo ensinamento, ajuda, colaboração, amizade e alegria que sempre me recebeu. Você foi fundamental para que eu conseguisse

A Lucas Chaves por todo ensinamento, paciência, companhia e ajuda com o preparo dos meus materiais

A Rachel Gerardi por toda atenção e ajuda no manuseio e preparo dos meus materiais

A Renata Pocente Chefe do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clinicas de Ribeirão Preto, por toda colaboração e ajuda durante este processo

Ao técnico do Núcleo de Apoio a Pesquisa (NAP) Tenysson Will de Lemos pela imensa colaboração no início desta jornada

A perfeita Denissani Ferrari que com toda sua humildade me concedeu amparo, apoio e companhia nos momentos de coleta. Por sua perspicácia, destreza, carinho e atenção no preparo dos meus materiais e principalmente por tudo que me ensinou

A Alessandro Márcio Hakme da Silva por toda amizade e paciência em tudo que me ensinou e me ajudou

Aos voluntários e equipe de enfermagem da Unidade de Queimados do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional Samuel Ribeiro Filipini e Marília dos Reis Pereira Viana Priolli obrigada pelos esclarecimentos em muitos momentos de dúvidas

A Capes pelo apoio

A Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA) por todo apoio financeiro

“cognitionis”

A intensa e desafiadora busca na construção do conhecimento é alvo nesta saga que chamo de texto. Muito além da profunda pesquisa no tema proposto, segui meu coração e realizei uma imersão no meu eu enquanto profissional e tive uma nova conexão com a Fisioterapia e sua especialidade. Eu vivi nessa pesquisa um crescimento que transcendeu a doutrina, a técnica, os ensaios ou a prática, eu vivi uma co-criação com pessoas, profissionais, com experiências de superação, frustração, evolução, vivência e amor. Assim, como uma alavanca de inspiração, fui inspirada e desejo, profetizo, que você também se inspire e siga partilhando o conhecimento, assim como eu o recebi, lapidei e o faço neste ciclo

RESUMO

ASSUNÇÃO, F. F. O. Sensibilidade bacteriana à antibióticos após irradiação com LED (*Light Emitting Diode*): *in vitro*. 2020. 98p. Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

A fotobiomodulação (FBM) tem sido utilizada em diferentes especialidades da área da saúde, com destaque para a interação da luz com a microbiologia nos últimos anos. Representadas por Laser e LED (*Light Emitting Diode*), as pesquisas no contexto de inibição do crescimento bacteriano têm sido exploradas, uma vez que são conhecidas espécies bacterianas que comumente colonizam a pele, podendo gerar infecções. Para o tratamento de infecções é preconizado o uso terapêutico de antibióticos que, ao longo dos anos, tem tornado a população resistente a muitos deles. Em contrapartida tem aumentado o uso da FBM no tratamento de lesões cutâneas, e pouco é investigado sobre os efeitos na interação da FBM por LED com o uso de antibióticos em culturas bacterianas. Assim, este estudo tem como objetivos verificar a inibição bacteriana e o perfil de sensibilidade a antibióticos com o uso de LED no comprimento de onda 465nm com energias de 4, 5 e 6J e 630nm com energias de 3, 4 e 5J, nas bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC®BAA-977), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e bactérias coletadas em de pacientes queimados. Foram irradiados com LED, 300µl de solução salina com suspensão de bactérias em concentração entre 0,5-0,63 pela escala de McFarland, após cinco diluições seriadas, e distribuídas em microtubos transparentes de fundo chato. Antes e após as irradiações foram controladas as variáveis pH e temperatura. As culturas foram acondicionadas em estufa a 37°C por 24 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Para verificação do perfil de sensibilidade foram adotados um método quantitativo (VITEK®2 *Compact*) e um método qualitativo (Disco-difusão). Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e comparações entre grupos pelo teste ANOVA fator único, com *post hoc* de Tukey com intervalo de confiança de 95%. A sensibilidade dos antibióticos apresentou mudança para as bactérias ATCC *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e nas bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) coletadas de queimaduras cutâneas nos dois métodos de avaliação, porém, não houve uma conformidade nos achados quando comparados os métodos. Com aumento e diminuição do pH para algumas bactérias conforme o grupo controle, todos os comprimentos de onda e energias testadas apresentaram inibição do crescimento bacteriano, em ambos tipos de bactérias, com prevalência do comprimento de onda 465nm. Conclui-se que há mudanças geradas no perfil de sensibilidade aos antibióticos, mas que estas alterações precisam ser melhor investigadas, em virtude de possíveis danos na membrana, produção de espécies reativas de oxigênio ou reações enzimáticas.

Palavras-Chave: Fotobiomodulação, *Light Emitting Diode*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, resistência bacteriana a antibióticos.

ABSTRACT

ASSUNÇÃO, F. F. O. *Bacterial sensitivity to antibiotics after LED radiation (Light Emitting Diode): in vitro*. 2020. 98p. Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Photobiomodulation (FBM) has been used in different specialties in the health field, with an emphasis on the interaction of light with microbiology in recent years. Represented by Laser and LED (Light Emitting Diode), research in the context of inhibiting bacterial growth has been explored, since they are bacterial species that commonly colonize the skin, and can generate occurrences. For the treatment of infections, the therapeutic use of antibiotics is recommended, which, over the years, has made the population resistant to many of them. On the other hand, the use of FBM in the treatment of skin lesions has increased, and little is investigated about the effects on the interaction of FBM by LED with the use of antibiotics in bacterial cultures. Thus, this study aims to verify bacterial inhibition and the profile of sensitivity to antibiotics with the use of LEDs at different wavelengths being 465nm to 4, 5 and 6J, and 630nm to 3, 4 and 5J, in *Staphylococcus aureus* (ATCC®BAA-977), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Escherichia coli* (ATCC 25922), 45and bacteria collected from burn patients. 300µl of saline with bacterial suspension in concentrations between 0.5-0.63 were irradiated with LEDs using the McFarland scale, after five serial dilutions, and distributed in transparent flat-bottomed microtubes. Before and after irradiation, pH and temperature variables were controlled. The cultures were placed in an oven at 37°C for 24 hours for later counting of colony forming units (CFU). To check the sensitivity profile, a quantitative method (VITEK®2 Compact) and a qualitative method (Disc-diffusion) were adopted. All data were discovered using the Shapiro-Wilk normality test and comparisons between groups using the single-factor ANOVA test, with Tukey's post hoc with a 95% confidence interval. The sensitivity of the antibiotics presented for change such as ATCC bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and the bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) extracted from skin burns in the two assessment methods, however, we will not have to make the findings when compared to others. With an increase and decrease in pH for some bacteria according to the control group, all wavelengths and energies tested, they showed inhibition of bacterial growth in both types of bacteria, with a prevalence of wavelength 465nm. It is concluded that it is not possible to affirm changes in the profile of sensitivity to antibiotics, but that there are changes that still need to be further investigated, due to possible damage to the membrane, production of reactive oxygen species or enzymatic reactions.

Keywords: *Photobiomodulation, Light Emitting Diode, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Drug Resistance, Bacterial.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A.	Dispositivo de LED	40
Figura 1B.	Régua com seis LEDs	40
Figura 2.	Aferição do LED	40
Figura 3.	Representação da verificação por Spectrofotômetro	41
Figura 4A.	Posicionamento do LED para irradiação	42
Figura 4B.	Espaçamento entre LED e microtubo	41
Figura 5.	Medida do crescimento do halo de inibição	45
Figura 6.	Fluxograma do experimento ATCC	46
Figura 7.	Fluxograma do experimento Pacientes	47
Figura 8.	Alça de Drigalski	48
Figura 9.	Distribuição de UFC entre as bactérias ATCC	56
Figura 10.	Dispersão de UFC entre as bactérias ATCC	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Caracterização dos Diodos de LED	41
Tabela 2.	Energia e tempo de irradiação	47
Tabela 3.	Perfil de sensibilidade (VITEK®2 <i>Compact</i>), média e desvio padrão das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para bactéria <i>S. aureus</i> (ATCC®BAA-977)	50
Tabela 4.	Valores médios das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para os dois casos da bactéria <i>S. aureus</i> comparando grupos irradiados e controle (C1)	51
Tabela 5.	Valores médios das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para os dois casos da bactéria <i>S. aureus</i> comparando grupos irradiados e controle (C2)	51
Tabela 6.	Perfil de sensibilidade (VITEK®2 <i>Compact</i>), média e desvio padrão das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para bactéria <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	52
Tabela 7:	Valores médios das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para a bactéria <i>P. aeruginosa</i> do paciente queimado (C3) comparando grupo controle (G-C) e grupos irradiados (G-LED)	53
Tabela 8.	Perfil de sensibilidade (VITEK®2 <i>Compact</i>), média e desvio padrão das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para bactéria <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	54
Tabela 9:	Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) de UFC para os dois casos da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> comparando grupos controles e grupos irradiados, para ambos os casos (C1 e C2)	57
Tabela 10:	Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) de UFC da bactéria <i>P. aeruginosa</i> comparando grupos irradiados e controle	58
Tabela 11.	Valores médios, desvio padrão e limites (IC 95%) de pH pré e pós irradiação das bactérias <i>S. aureus</i> (ATCC®BAA-977), <i>E. coli</i> (ATCC 25922) e <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	59
Tabela 12:	Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) do pH pré (controle) e pós irradiação para os dois casos da bactéria <i>S. aureus</i> comparando grupos controles e grupos irradiados	59

Tabela 13:	Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior de pH (IC 95%) pré e pós irradiação da bactéria <i>P. aeruginosa</i> , comparando grupos irradiados e controle	60
Tabela 14:	Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) da temperatura (°C) pré e pós irradiação pós irradiação das bactérias <i>S. aureus</i> (ATCC®BAA-977), <i>E. coli</i> (ATCC 25922) e <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	61
Tabela 15:	Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) da temperatura (°C) pré (controle) e pós irradiação para os dois casos da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> comparando grupos controles e grupos irradiados, para ambos os casos (C1 e C2)	62
Tabela 16:	Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) da temperatura (°C) pré (controle) e pós irradiação da bactéria <i>P. aeruginosa</i> , comparando grupos irradiados e controle	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
DE	Densidade de energia
DP	Desvio padrão
ERO	Espécie reativa de oxigênio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBM	Fotobiomodulação
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
J/cm ²	<i>Joules</i> por centímetros quadrados
J	<i>Joules</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
mcg/mL	Micrograma por litro
mm	Milímetro
min	Minutos
µl	Microlitro
MSRA	<i>Staphylococcus Aureus</i> Resistente a Ampicilina
MSSA	<i>Staphylococcus Aureus</i> Sensível a Ampicilina
mW	miliwatts
nm	Nanômetros
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
R	Resistente
S	Sensível
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLBI	Terapia por Laser de Baixa Intensidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UST	Ultrassom Terapêutico
W	<i>Watts</i>
°C	Graus <i>Celsius</i>
®	Marca Registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Revisão de Literatura	23
2.1. Aspectos microbiológicos	24
2.2. Recursos eletrofísicos na inibição do crescimento bacteriano e antibióticos	25
3. Justificativa	31
4. Objetivos	34
4.1. Objetivo Geral	35
4.2. Objetivos Específicos	35
5. Material e Métodos	36
5.1. Linhagens utilizadas – obtenção das amostras	36
5.2. Autorização de coleta de material biológico	38
5.3. Procedimentos de preparo das amostras para irradiação	39
5.3.1. Diluição	39
5.4. Irradiação por diodos de LED	39
5.4.1. Dispositivo de LED	39
5.4.2. Antibiograma	42
5.4.3. Descrição dos grupos	44
5.4.4. Avaliação do pH e temperatura	47
5.5. Análise Estatística	48
6. Resultados	49
8.1. Irradiações das bactérias ATCC e pacientes queimados	50
7. Discussão	63
7.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	64
7.2. <i>Escherichia coli</i>	68
7.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
7.4. Aspectos gerais dos experimentos	71
8. Conclusões	76
9. Referências	78
Anexos	87
Apêndices	89

1. Introdução

1. Introdução

Alvo de frequentes investigações, a infecção por bactérias é uma complicação advinda por inúmeros fatores, e que contribui fortemente para a piora do prognóstico de pacientes internados, pois estes estão diariamente expostos a agentes contaminantes.

A infecção bacteriana ocorre na forma de biofilmes em feridas, que são agregados de bactérias incorporadas na matriz extracelular ^[1]. Pode ser superficial, profunda ou atingir uma incisão cirúrgica. Nas feridas cirúrgicas pode haver infecção pela microbiota, como também podem ser decorrentes dos instrumentos e das condições ambientais não estéreis durante ou após a cirurgia ^[2]. Além disso as infecções são fatores que retardam a cicatrização da ferida levando a um processo de cronicidade ^[3].

Considerando o ambiente hospitalar podemos citar, pacientes queimados e pacientes com longo tempo de internação que desenvolvem lesão por pressão. De acordo com *National Pressure Ulcer Advisory Panel* (NPUAP), a faixa de incidência de úlceras pode variar de 0,4 a 38% em hospitais ^[4], o que aumenta risco de infecção e dor, além de contribuir para a mortalidade ^[5,6].

As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são as que frequentemente colonizam lesões cutâneas podendo se apresentar multirresistentes ^[7,8].

Considerando o paciente queimado, a *P. aeruginosa* é apontada como o principal agente etiológico de infecções ^[9,10]. Para essa população a própria queimadura pode ser o desencadeador da infecção na corrente sanguínea, piorando seu prognóstico, com risco de perda do enxerto ^[11]. As infecções em queimaduras cutâneas podem ser causadas tanto por Gram-negativas quanto por Gram-positivas ^[12,13,14].

As infecções neste momento de pandemia também chamam a atenção não somente para pessoas hospitalizadas, mas também aos profissionais de saúde, que pelo uso de EPI's (Equipamentos de Proteção Individual) por longos períodos, também, vem apresentando lesões susceptíveis a infecções.

A pele facial saudável é mais resistente à compressão e forças de atrito aplicadas durante o uso prolongado e intensivo de EPI. A perda da integridade da pele facial, mesmo em escala microscópica, cria um portal de entrada para patógenos, incluindo o coronavírus, mas isso também se aplica a outros vírus, como também a outros agentes como bactérias e fungos ^[15].

A fotobiomodulação por meio do LED (*Light Emitting Diode*) tem apresentando resultados promissores na inibição do crescimento bacteriano das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* ^[16].

Pesquisa sobre a fotobiomodulação por meio do LED em diferentes espécies bacterianas tem sido realizada nos últimos anos ^[17,18,19,20,21], no entanto, pouco se investiga sobre o uso de recursos eletrofísicos associados aos antibióticos.

Uma vez que na prática clínica lesões cutâneas podem evoluir com infecção e no tratamento para esta doença é necessário tratamento medicamentoso a base de antibióticos, o mecanismo de desenvolvimento de resistência deve ser mencionado.

Os antibióticos apresentam mecanismos de resistência que não são desenvolvidos unicamente no ambiente hospitalar, se tratando de uma ameaça a saúde pública em todo o mundo. As bactérias tem uma capacidade de adaptação mutacional a medicações por uma plasticidade genética destes patógenos ^[22].

São apontados como os principais fatores para desenvolvimento de resistência as mutações genéticas, aquisição de codificação de DNA estranho por transferência de genes, modificação do alvo microbiano (diminuindo a afinidade pela droga), diminuição

da absorção do medicamento, ativação de efluxo e ainda mudanças metabólicas como, por exemplo, a produção de enzimas capazes de destruírem o medicamento [23,22].

A exemplo, Jass Lappin-Scott [24] avaliaram esta associação com corrente elétrica, e Guirro et al. [25] com o ultrassom terapêutico (UST), todavia, outras pesquisas que exploraram os efeitos do LED em culturas bacterianas, fizeram uso da terapia fotoativada [26,27,28,29,30,31].

Portanto, a ação do LED sem o uso de fotossensibilizadores é discutida e informações sobre sua interação com antibióticos ainda é insatisfatória. Frente a estas informações, os objetivos desta pesquisa foram avaliar a inativação bacteriana e comparar o perfil de sensibilidade a antibióticos, após a irradiação com LED no comprimento de onda de 465nm com energias de 0 (controle, sem irradiação), 4, 5 e 6J e a 630nm nas energias 0 (controle, sem irradiação), 3, 4 e 5J, nas culturas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, espécies ATCC e de pacientes queimados.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Microbiológicos

A diversidade de bactérias que podem contaminar feridas cutâneas e ou dispositivos hospitalares é ampla, o que favorece o desenvolvimento de quadros infecciosos. Na literatura são descritas algumas dessas espécies que mais frequentemente atingem pacientes hospitalizados, sendo elas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Escherichia coli* (*E. coli*).

A *S. aureus* é uma bactéria esférica, do grupo Gram-positiva, comumente encontrada na pele, garganta, intestino e fossas nasais. É capaz provocar simples infecções como espinhas e furúnculos, até infecções graves como pneumonia, meningite, endocardite, septicemia entre outras. A resistência dessa bactéria a quimioterápicos é descrita desde o fim da década de 1930 ^[32] e traz riscos para pacientes em diálise, queimados, diabéticos e HIV-positivos, uma vez que o seu processo infeccioso pode ser fatal ^[33].

Noskin et al. ^[34] destacam que a *S. aureus* tem forte relação com a mortalidade de pacientes internados. Macedo e Santos ^[35] acrescentam que esta espécie codifica várias proteínas capazes de interagir especificamente com moléculas adesivas da matriz celular humana, possibilitando uma colonização comum nas lesões por queimaduras. Esta bactéria libera ainda produtos nocivos como proteinases, collagenases e hialuronidases, que destroem a matriz extracelular, cuja integridade é essencial para cicatrização da ferida ^[36].

Outra espécie que geralmente coloniza feridas cutâneas gerando infecção é a *P. aeruginosa* ^[37]. Esta bactéria é do grupo Gram-negativa, e por sua baixa exigência nutricional, é encontrada no ambiente hospitalar, colonizando equipamentos e acessórios

instalados nos pacientes ^[38]. Outra característica importante desta espécie é a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta de uma co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência em um único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos ^[39,40]. Edwards-Jones e Greenwood ^[36] descrevem que esta espécie produz um pigmento característico de coloração azul-esverdeado (piocianina) que é tóxico, no entanto, outras estirpes também produzem exotoxina A, que causa inibição da síntese proteica, necrose local e morte celular.

Mais frequente no trato urinário, mas que também pode ser encontrada em infecções cutâneas é a espécie *E. coli*, do grupo Gram-negativa, que pode contaminar úlceras cutâneas, uma vez que essas lesões possibilitam a entrada de microrganismos patogênicos ^[41].

As investigações sobre culturas bacterianas no âmbito de suas caracterizações bem como possíveis métodos de tratamento para infecções são conduzidos em sua grande maioria *in vitro*.

2.2. Recursos eletrofísicos na inibição do crescimento bacteriano

A possibilidade do uso de recursos fisioterapêuticos, considerando os agentes eletrofísicos na inibição de culturas bacterianas *in vitro*, tem sido estudado em nosso laboratório com o uso de correntes polarizadas ^[42], ultrassom terapêutico ^[25] e laser de baixa potência ^[43,44].

Recentes publicações do nosso grupo de pesquisa utilizando lasers no espectro de luz visível e infravermelho, nos comprimentos de onda de 450, 660, 830, 904nm, nas bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* observaram diferentes graus de inibição das unidades formadoras de colônias (UFC). Considerando o comprimento de onda de 450nm

e fluências de 0, 3, 6, 12, 18 e 24J/cm², Sousa et al. ^[43] investigaram as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) com irradiação única em 300μl de solução salina com concentração de 1,5x10³ em placa de microtitulação, mantidas em estufa a 37° C, para posterior contagem de UFC em 24 e 48 horas. O laser azul inibiu o crescimento da *S. aureus* e da *P. aeruginosa* em fluência igual ou superior a 12J/cm², já a bactéria *E. coli* foi inibida em todas fluências testadas, exceto em 24J/cm².

Na mesma linha de pesquisa Sousa et al. ^[44] investigaram as bactérias de mesma linhagem, com mesmo preparo das cepas e irradiação do estudo de Sousa et al. ^[43], porém, com comprimentos de onda de 660, 830 e 904nm nas mesmas fluências. As bactérias foram acondicionadas em estufa a 37° C, sendo avaliada UFC nos períodos de 24, 48 e 72 horas pós irradiação. A irradiação de laser inibiu o crescimento da *S. aureus* em todos os tempos e comprimentos de onda e fluências superiores a 12J/cm², mostrando uma forte correlação entre o aumento na fluência e inibição bacteriana. No entanto, para *P. aeruginosa* o laser inibiu o crescimento em todos os comprimentos de onda apenas na fluência de 24J/cm², e a inibição da bactéria *E. coli* foi semelhante no comprimento de onda de 830nm e fluências de 3, 6, 12 e 24J/cm², nos comprimentos de onda de 660 e 904nm, a inibição do crescimento bacteriano foi observada nas fluências de 12 e 18J/cm², respectivamente. Quanto ao período de avaliação da UFC após 72 horas foi verificado inibição do crescimento bacteriano indicando uma correlação entre espécies bacterianas do tipo ATCC (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*), nas fluências e comprimentos de onda testados.

Quando se considerada, o uso de recursos eletrofísicos associados a antibióticos *in vitro*, poucos estudos são relatados na literatura. Jass e Lappin-Scott ^[24] avaliaram a atividade da corrente elétrica associada aos antibióticos Ciprofloxacino, Polimixina B e

Piperacilina em biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e verificaram que os antibióticos diminuíram a população do biofilme, no entanto, na presença da corrente elétrica o crescimento da população bacteriana foi ainda menor em dois (Ciprofloxacina, Polimixina B), dos três antibióticos testados.

O uso de ultrassom terapêutico (UST) associado a antibióticos é descrito por Guirro et al. ^[25] em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro*, com intuito de verificar a ação do antibiótico associado ou não ao UST na proliferação bacteriana. As linhagens foram suspensas em solução fisiológica e diluídas (10^4 UFC/mL) para irradiação em 1 e 3 MHz, intensidades médias de 0,5 e 0,8W/cm², nos tempos 0 (Sham), 5 e 15 minutos. A associação com o antibiótico - ácido nalidíxico (*S. aureus*) e tetraciclina (*E. coli*) foi em concentração equivalente a 50% da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados demonstraram que a ação do UST de 1 MHz inibiu o crescimento bacteriano, entretanto, em 3MHz foi observado o aumento do crescimento em ambas as espécies. Todavia com a associação do antibiótico foi possível verificar inibição do crescimento bacteriano após 15 minutos em todas as frequências e intensidades, em ambas as espécies, até o limite de 100%.

Em particular, a tecnologia LED (*Light Emitting Diode*) vem sendo estudada quanto ao seu efeito antibacteriano ^[16], dentre as quais a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* tem sido investigadas.

O LED (*Light Emitting Diode*) é uma modalidade da fotobiomodulação que envolve os espectros de luz visível e invisível, sendo a luz emitida por um diodo semicondutor por meio da eletroluminescência. Este recurso tem sido estudado nos últimos anos sobre sua interação biológica em diferentes áreas como em desinfecção de salas para tratamento de queimaduras ^[45], desinfecção de material hospitalar ^[46] e na inativação de diversas bactérias ^[16,17,18,19,20,21,28,47,48,49].

O LED quando aplicado em comprimento de onda de luz visível a 405nm tem sido eficaz na inativação de bactérias e esporos ^[17,19]. Maclean et al. ^[45] demonstraram que o *S. aureus* resistente a Meticilina (MRSA), isolados a partir da coleta de bactérias em superfícies no interior de uma sala de isolamento hospitalar para tratamento de queimaduras, reduziu os níveis bacterianos em 90%. Com base no efeito antibacteriano da luz azul o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou uma série de dispositivos para o tratamento antiinflamatório da acne vulgar ^[50].

A inativação da *E. coli* é descrita por Ghate et al. ^[51], que relataram a inativação com LED de 460nm. Os achados de Guffey e Wilborn ^[52] também indicam a inibição da *P. aeruginosa* (93%) e do *S. aureus* (72%) quando combinaram o efeito do LED (405 e 808nm) em diferentes fluências (1, 3, 5, 10 e 20J/cm²), sendo a de 20J/cm² a mais eficaz para ambas as bactérias.

Em estudo apresentado por Petrini et al. ^[20] com uso do LED em *P. aeruginosa* (*in vitro*) adicionou a irradiação da luz o corante azul de metileno e clorexidina, apontando os melhores resultados na redução de UFC após cinco minutos de irradiação, no grupo LED associado a clorexidina. Em pesquisa com *S. aureus*, Maclean et al. ^[17] mostraram que o sistema de LED de 405nm *in vitro* apresentou redução na população de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as Gram-positivas mais susceptíveis.

O aumento de bactérias resistentes aos antibióticos pode ser decorrente do seu mau uso, e tem levado à necessidade de novos tratamentos como a terapia fotodinâmica (TFD) ^[53,54], modalidade que associa o LED com fotossensibilizantes. Quando o fotossensibilizador é ativado interage com o oxigênio ambiente para produzir reações que podem levar à morte celular por ativação de vias apoptóticas ^[55]. A inativação fotodinâmica envolve a interação de fatores não tóxicos, fotossensibilizantes e luz visível, na presença de oxigênio. Os fotossensibilizantes são moléculas fotoativas que podem

produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), após a absorção da luz em um comprimento de onda específico, que corresponde à energia necessária para excitar o fotossensibilizador.

As EROs geradas resultam em um número de reações citotóxicas que causam danos aos componentes celulares ^[16], o que eventualmente pode ser o mecanismo responsável pelo controle bacteriano ^[56,57].

A aplicação da energia LED vem sendo estudada com associação de fotossensibilizantes na tentativa de potencializar os seus efeitos. Chengcheng et al. ^[28] investigando o LED (400 a 780nm) com fluência de 72J/cm² associado ao fotossensibilizante éter monometílico de hematoporfirina (HMME) em cultura de *E. coli* e *P. aeruginosa*, obtiveram as melhores respostas na *P. aeruginosa*. Na mesma linha, Carvalho et al. ^[47] utilizaram LED de 630nm associado ao corante azul de metileno em culturas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, aplicando 50J/cm² durante 33 minutos. Seus resultados apontam que não houve crescimento de bactérias após três, cinco e 24 horas de irradiação, sendo o melhor resultado para inativação da *S. aureus*.

Já a aplicação *in vitro* do corante Rosa Bengal associado ao LED verde (518nm) e ao ultravioleta (375nm) a 5,4J/cm² mostrou a eficácia do corante e da riboflavina (vitamina B2) para inibição de *S. aureus* resistente à Meticilina, com completa inibição na concentração de 0,1% de Rosa Bengal e mínima inibição nas cepas expostas ao escuro e luz ambiente quando associadas a riboflavina ^[27].

Já, Miftahul et al. ^[26] utilizaram LED de 630nm associado a um fotossensibilizador derivado de porfirina (TONS 504) em *S. aureus* sensível a Meticilina (MSSA), e as resistentes a Meticilina (MSRA), com irradiações de 10, 20 e 30J/cm². A irradiação foi realizada com várias concentrações do fotossensibilizador com inibição bacteriana

observada após 30 minutos e 24 horas de irradiação com LED, avaliando as UFC sobre o ágar com aplicações que associaram o fotossensibilizador (TONS 504) em concentrações (mg/L) e densidade de energia (J/cm^2) específicas de: 1 mg/L e $\geq 10\text{J}/\text{cm}^2$; 0,5 mg/L e $\geq 20\text{J}/\text{cm}^2$ para MSSA; 10 mg/L e $\geq 10\text{J}/\text{cm}^2$; 1 mg/L e $\geq 20\text{J}/\text{cm}^2$ para MRSA.

Em síntese, no que concerne a fotobiomodulação, a literatura apresenta um maior volume da aplicação do laser de forma isolada, sem associação de outros recursos e do LED comumente associado a fotossensibilizantes (corantes), não sendo encontrado até o momento, nenhum estudo que analisa a interação do LED ao uso de antibióticos na cultura de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Essas considerações justificam a execução da presente proposta, por considerar os protocolos do LED utilizados – dois comprimentos de onda e quatro energias, associadas a antibióticos, em culturas primárias de ATCC e coletadas de queimaduras cutâneas.

3. Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

As lesões cutâneas podem ser contaminadas por bactérias que colonizam a região afetada, sendo a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, as mais comuns.

A fisioterapia tem utilizado agentes eletrofísicos como a terapia laser de baixa intensidade (TLBI) no processo de cicatrização, a fim de reduzir os custos dos tratamentos das lesões cutâneas. No entanto, não há um real consenso em relação ao tipo de luz emitida, fluência, tempo de exposição da irradiação, comprimento de onda a serem utilizados e o seu efeito nas bactérias que comumente as colonizam, bem como a possibilidade de agir em conjunto aos antibióticos. Essas incertezas também envolvem os estudos que utilizam o LED como emissor de luz.

Na literatura científica existem trabalhos relatando a eficiência da terapia por LED na inibição bacteriana, todavia, dentre estes há uma distinção entre as metodologias utilizadas, uma vez que cada trabalho utilizou comprimentos de onda e fluências distintas, e em sua grande maioria realizam aplicação do LED associado ao uso de corantes, técnica conhecida como terapia fotodinâmica.

A aplicação do LED em associação ao antibiótico, como forma de terapia, ainda é inédita na literatura. No entanto, a possibilidade de utilizar diferentes comprimentos de onda, fluências e tipos de bactérias é ampla não havendo, portanto, consenso de qual comprimento de onda seria o mais eficaz para as diferentes linhagens de bactérias, ou mesmo qual a energia mínima a ser aplicada para resultados satisfatórios, e tão pouco, a associação de antibióticos, a fim de verificar a influência da luz emitida por LED sobre sua ação.

Portanto, há a necessidade de se buscar novos recursos que possam atender a essa lacuna, visando elucidar a aplicação de dispositivos que sejam eficazes, de baixo custo operacional e que possam contribuir com essa temática.

Diante da ausência de pesquisa que verifique o efeito de inibição bacteriana da luz emitida por LED, em seus diferentes comprimentos de onda, associado ao uso de antibióticos nos patógenos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, este estudo se torna inédito em modelo *in vitro*.

Esta indagação visa elucidar as possíveis alterações no perfil de sensibilidade e busca contribuir com um novo método terapêutico na inibição bacteriana, pois o conhecimento destes resultados pode vir a contribuir com melhor compreensão sobre estas interações e prováveis mudanças de perfil, vislumbrando possibilidades de pesquisas clínicas, pois, uma vez que sejam conhecidas tais mudanças a aplicação do LED poderá ser um recurso adjuvante no controle das infecções cutâneas.

A pesquisa foi conduzida por experimentos *in vitro*, desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia e Sorologia do Departamento de Clínica Médica – Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e no Laboratório de Patologia Clínica setor Microbiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Unidade de Emergência.

Sustenta-se a hipótese de que a terapia por diodos de LED em diferentes comprimentos de onda e energias podem controlar o crescimento bacteriano e alterar o grau de sensibilidade das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* a determinados antibióticos, potencializando a sua eficácia.

4. Objetivos

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a terapia por LED na inativação de culturas de bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* seguidas ou não da aplicação de antibióticos.

4.2. Objetivos Específicos

- Relacionar a inibição bacteriana com o espectro de luz visível (465 e 630nm);
- Relacionar a inibição bacteriana com energias de 4, 5 e 6J (465nm) e 3, 4 e 5J (630nm)
- Comparar os resultados da inibição entre as bactérias do tipo ATCC e bactérias coletadas de queimaduras cutâneas, originadas de cultura primária;
- Comparar o perfil de antibióticos utilizados para as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* após irradiação com LED nos comprimentos de onda 465 e 630nm e nas diferentes energias.

5. Material e Método

5. Material e Método

5.1. Linhagens utilizadas - Obtenção das amostras

Foram investigadas bactérias padrões ATCC (*American Type Culture Collection*) e bactérias coletadas de pacientes com queimaduras cutâneas. As bactérias *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC®BAA-977) e *E. coli* (ATCC 25922) eram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Sorologia do Departamento de Clínica Médica – Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP pela pesquisadora com o auxílio, supervisão e colaboração do responsável Prof. Dr. Roberto Martinez. Para a obtenção das amostras provenientes de queimaduras cutâneas, foram realizadas coletas nos pacientes internados na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (UE-HCFMRP/USP) – Unidade de Queimados.

As bactérias ATCC eram mantidas em freezer a -90°C sendo retiradas previamente para a adaptação e crescimento em placa de Petri de plástico (90x15mm) no meio de cultura ágar Sangue (BioMérieux®, Durham, NC, EUA), mantida em estufa por 24 horas a 37°C. Este processo foi realizado duas vezes conforme a rotina do laboratório a fim de garantir melhor viabilidade das bactérias.

Para obtenção das amostras primárias de bactérias de queimaduras cutâneas foram coletados na área cruenta da queimadura, em seis pacientes queimados, por meio de BAC swab (150mm com ponta de *Rayon*), estéril e descartável, específico para coleta e transporte das amostras, umedecido em solução salina 0,9%. Em seguida foi realizada semeadura em placa de Petri (90x15mm) em meios de cultura Manitol e Maconkey (Kasvi, Brasil) para primeira identificação do gênero bacteriano no Laboratório de Patologia Clínica setor Microbiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto –

Unidade de Emergência, sob a responsabilidade e colaboração do Prof. Dr. Roberto Martinez. As amostras permaneceram armazenadas em estufa por 24 horas a 37°C, para exame de detecção do tipo de bactéria presente.

Quanto as amostras que foram identificadas como sendo de outras espécies não incluídas nesta pesquisa foram descartadas nos recipientes específicos para descarte presentes no próprio laboratório, para posterior coleta especializada em lixo hospitalar, sendo esta, a rotina adotada no laboratório.

Sendo identificadas as bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *E. coli* para as amostras ATCC e as coletadas nas queimaduras, seguiu-se o preparo de uma segunda avaliação, a de perfil de antibióticos no equipamento VITEK®2 Compact (BioMérieux®, Durham, NC, EUA). Esta etapa de identificação foi conduzida por profissional, técnico do laboratório, sendo todo o processo acompanhado pela pesquisadora. Estando as bactérias viáveis, foi realizado novo crescimento em placas de Petri (90x15mm) com meio de cultura Muller-Hinton (BD®, New Jersey, PA, EUA) e incubadas por um período de 24 horas, à temperatura de 37°C para início da irradiação *in vitro*.

Todos os procedimentos de crescimento, armazenamento, preparação das bactérias, irradiação por LED e antibiograma foram realizados no mesmo laboratório

5.2. Autorização de coleta de material biológico

Para realização da coleta de material biológico (bactérias) nos pacientes queimados foi concedida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob o parecer nº. 2.554.371 (Anexo 1) e os pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE- Apêndice 1).

5.3. Procedimento de preparo das amostras para irradiação

5.3.1. Diluição

Inicialmente as amostras cresceram em placas de Petri (90x15mm) contendo meio de cultura Muller-Hinton (BD[®], New Jersey, PA, EUA), incubadas por um período de 24 horas, à temperatura de 37°C. Após o crescimento bacteriano, as bactérias foram suspensas com *swab* estéril em solução fisiológica estéril (0,9% de NaCl e água destilada) em tubo de ensaio, para aferição da densidade óptica pelo equipamento DensiCHECK[™] Plus (BioMérieux, Durham, NC, EUA).

A concentração ideal necessita estar entre 0,5 – 0,63, correspondendo a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL na Escala de McFarland. Em seguida foram realizadas cinco diluições seriadas para obtenção da concentração $1,5 \times 10^3$ UFC/mL.

5.4. Irradiação por Diodos de LED

5.4.1. Dispositivo de LED

Para aplicação da luz de LED foi desenvolvido um dispositivo especialmente para esta pesquisa, o qual foi composto por uma placa rígida com LEDs (Figura 1A) acoplados a um dissipador de calor, fixados a distância de 2,0cm entre eles, afim de minimizar a influência de um feixe sobre o outro, e ligados a uma fonte de alimentação de 18v para 465nm e 12v para 630nm. Os LEDs foram fixados de forma retilínea, sendo seis LEDs no comprimento de onda 465nm (azul) e seis de 630nm (vermelho) (Figura 1B). As características físicas dos LEDs estão descritas na tabela 1.

Figura 1: LED utilizado na confecção do dispositivo (A) para irradiação dos microtubos contendo as soluções com bactérias com seis LEDs vermelhos, e seis azuis (B) (seta).

Justifica-se o desenvolvimento deste dispositivo em razão dos equipamentos disponíveis de forma comercial não atenderem as necessidades específicas do método aqui proposto.

Os diodos foram testados e aferidos no Laboratório de Fotobiofísica da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto, sob colaboração do Prof. Dr. Luciano Bachmann, nos quais foram confirmados comprimento de onda, potência nominal e divergência do feixe a fim de se garantir as características físicas de cada LED. O equipamento de aferição utilizado foi modelo UBS 2000 Spectrometer (Ocean Optics, Largo, Florida, USA) acoplado a uma sonda de correção de cosseno, alinhada ao eixo central do LED (Figura 2). Os dados foram processados no OriginPro 8.5 *software*. SR1 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).

Figura 2: Aferição do LED 465nm, com destaque para a distância entre o LED e a sonda de medição.

Figura 3: Representação da verificação das variáveis físicas do LED pelo Spectrofotômetro e análise de irradiância pelo software OriginPro 8.5

Tabela 1. Caracterização dos LEDs utilizados no dispositivo para o estudo *in vitro*.

Váriáveis	Azul	Vermelho
Comprimento de onda	465nm	630nm
Número de LEDs	6	6
Área do diodo	$0,125\text{cm}^2$	$0,125\text{cm}^2$
Diâmetro do microtubo	0,8cm	0,8cm
Densidade de Potência (2cm)	$36,22\text{mW/cm}^2$	$10,11\text{mW/cm}^2$
Potência LED (2cm)	0,0045W	0,001W

Testes pilotos foram realizados para verificar possíveis intercorrências ou ajustes necessários. Foi verificado que os diodos no comprimento de onda 465nm apresentaram

aquecimento excessivo da solução salina, possivelmente em virtude de sua potência, influência esta que deveria ser corrigida. Para tal, novos testes foram realizados aumentando a distância entre o diodo, a solução salina e o tempo de irradiação. Foram testadas distâncias de 0.5, 1, 2 e 3cm por 60 minutos com monitoração por termômetro infravermelho (Happy Sheep® - Italy). O controle de temperatura foi encontrado a distância de 2 e 3cm, sendo adotado para esta pesquisa a distância de 2cm para controle da interferência térmica.

Os LEDs foram aplicados de forma direta e perpendicular (90°) sobre os microtubos transparentes e de fundo chato, adaptados para esta pesquisa. A distância de 2cm entre o diodo e o microtubo foi garantida por meio de um espaçador rígido acoplado a placa de LEDs. O suporte que acondicionou os microtubos foi confeccionado em material isopor com orifícios para encaixe dos mesmos, devidamente descontaminado durante todo o processo e adequados a placa rígida de diodos (Figura 3). Todos os testes foram realizados com três repetições em delineamento por blocos casualizados por dois comprimentos de onda, quatro energias e três bactérias (2 comprimentos de onda x 2 blocos x 3 repetições), totalizando seis amostras de cada teste.

Figura 4: A) LED posicionado a 90° em relação ao microtubo e B) Espaçador transparente entre o diodo e o microtubo.

5.4.2. Antibiógrama

Esta etapa foi realizada nas bactérias coletadas dos pacientes queimados e nas bactérias do tipo ATCC. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo Método de Kirby Bauer ou Método do Disco-difusão. Este método é qualitativo e permite a determinação da sensibilidade antimicrobiana ^[58], e é capaz de orientar o uso terapêutico de antibióticos, sendo adequado para testar a maioria dos patógenos bacterianos, versátil em relação a gama de agentes antimicrobianos que podem ser testados e não requer equipamento especial ^[59].

O perfil de sensibilidade aos antibióticos foi avaliado pelo equipamento VITEK®2 *Compact* (BioMérieux®, Durham, NC, EUA), método quantitativo e seus devidos cartões de identificação para Gram-positivo e Gram-negativo. As determinações da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), que é um manual de padronização para técnicas de pesquisa e análise ^[60], foram determinantes para escolha dos Discos-difusão (antibióticos) a serem investigados para as bactérias coletadas dos pacientes queimados.

A avaliação das amostras por este equipamento foi repetida em triplicata para as bactérias ATCC, com intervalo mínimo de 24 horas, crescidas a cada processo a fim de manter-se a viabilidade das amostras. As repetições foram realizadas a fim de serem observadas possíveis alterações no perfil de sensibilidade, bem como para se verificar a presença de alterações temporárias ou definitivas.

As amostras irradiadas para realização do antibiógrama seguiram o mesmo protocolo de tempo de aplicação para ambos os comprimentos de onda e nas quatro energias, porém, preparadas em concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL na escala de McFarland, conforme determinação da CLSI. Após a irradiação 100µl da solução salina foram transferidos para placa de Petri (140x15mm) com meio de cultura Muller-Hinton,

semeada com *swab* estéril e descartável e posterior acomodação dos respectivos discos de difusão para cada espécie.

Após aplicação dos discos de difusão as placas devidamente identificadas foram acondicionadas em estufa por 24 horas a 37°C para posterior leitura do halo de inibição.

Todos os testes foram realizados com três repetições em delineamento por blocos casualizados por dois comprimentos de onda, quatro energias e três bactérias (2 comprimentos de onda x 2 blocos x 3 repetições), totalizando seis amostras de cada teste. Estes testes foram realizados em dias independentes a fim de minimizar riscos de contaminação cruzada ou outras intercorrências para todas as repetições.

O resultado desta análise considerou as medidas do diâmetro dos halos de inibição, que são mensurados em milímetros ao redor do disco. O diâmetro é relacionado à sensibilidade da amostra bacteriana e a velocidade de difusão do antimicrobiano na placa de Petri com meio Muller-Hinton.

Quando os halos de inibição são correlacionados aos valores logarítmicos da CIM (concentração inibitória mínima) em mcg/mL, pela análise de regressão linear, encontra-se uma relação linear consistente demonstrando que o halo de inibição é inversamente proporcional à CIM do antimicrobiano testado ^[60]. A leitura do halo de inibição foi realizada após 24 horas por meio de paquímetro digital modelo Digimess (China) com resolução de 0,01mm (Figura 4).

Figura 5: Medida do halo de inibição com paquímetro digital.

5.4.3. Descrição dos grupos

Os grupos testados foram divididos em: **1) Grupo controle;** **2) Grupo LED;** **3) Grupo LED + Antibiótico** (Figura 5).

1 - Grupo Controle (G-C): as bactérias não foram irradiadas pela luz do LED, estando somente em solução salina, e não receberam aplicação dos antibióticos.

2 - Grupo LED (G-LED): foi realizada a irradiação nos microtubos, com as diferentes energias e comprimentos de onda do LED, para as três bactérias.

- Grupo LED 465nm: G-LED- 4J, G-LED-5J e G-LED-6J
- Grupo LED 630nm: G-LED- 3J, G-LED-4J e G-LED-5J

3 - Grupo LED+Antibiótico (G-LED+A): cada grupo de bactérias após a irradiação do LED recebeu a aplicação do antibiótico por meio do Disco-difusão.

A irradiação foi aplicada com energias de 4, 5 e 6J (465nm) e 3, 4 e 5J (630nm), sobre o microtubo com 300µl de solução salina adicionadas a suspensão de bactérias em

concentração já descrita no processo de diluição. Considerando as potências de 0,0045W e 0,001W para os LEDs azul e vermelho, respectivamente, os tempos de irradiação para as diferentes energias são apresentadas na Tabela 2.

Figura 6: Fluxograma do experimento com as bactérias ATCC

Figura 7: Fluxograma do experimento com bactérias extraídas das queimaduras cutâneas de pacientes.

Tabela 2: Energia, densidade de energia e tempo de irradiação (segundos), considerando os dois comprimentos de onda.

$\lambda = 465\text{nm}$		
Energia (J)	Densidade de Energia (J/cm^2)	Tempo (s)
4	8	834
5	10	1110
6	12	1388

$\lambda = 630\text{nm}$		
Energia (J)	Densidade de Energia (J/cm^2)	Tempo (s)
3	6	3000
4	8	3960
5	10	4999

Após a irradiação 100 μl da solução foram transferidos para placa de Petri (90x15mm), devidamente identificadas, com meio de cultura Muller-Hinton e semeados com Alça de Drigalski (Figura 8) e posterior armazenamento em estufa a 37°C por 24 horas. Transcorrido este período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) de forma manual, conforme rotina adotada no laboratório.

Figura 8: Alça de Drigalski para semeadura das bactérias.

5.4.4 Avaliação do pH e temperatura

Para exploração de possíveis alterações de pH e temperatura nas amostras irradiadas, os valores de pH e temperatura foram coletados pré irradiação (controle) e imediatamente após a irradiação com LED em todas as amostras (comprimentos de onda

e energias). A avaliação do pH foi coletado pelo pHmetro portátil (HANNA® - Woonsocket, EUA). Este avaliador de pH foi devidamente calibrado no início de cada experimento com as soluções de pH 4,0 e 7,0 (Dinâmica Química Contemporânea – Ltda), com variação de 0,02.

A temperatura foi medida pré irradiação (controle) e imediatamente após a irradiação por meio de termômetro digital infravermelho (Happy Sheep® - Italy) em todas as amostras, a 20cm de distância.

5.5. Análise estatística

Para a análise estatística, os dados foram submetidos a análise exploratória por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilk, e para verificação da distribuição dos dados foi aplicado fator único do teste ANOVA entre os grupos com *post hoc* de Tukey, sendo considerados dois fatores nas comparações, comprimento de onda e energia entre as espécies bacterianas. O processamento foi realizado no *software* SPSS® 17.0 (IBM Corporation® - Chicago, IL - United States), com intervalo de confiança de 95%.

6. Resultados

6. Resultados

6.1. Irradiações das bactérias ATCC e dos pacientes queimados

As amostras coletadas nas queimaduras cutâneas possibilitaram a identificação de bactérias em três pacientes (dos seis coletados) sendo em dois pacientes (C1 e C2) *S. aureus* e no terceiro (C3), a *P. aeruginosa*.

As análises quantitativas transmitem os resultados do perfil de sensibilidade quanto a Resistente (R), Sensível (S) ou Intermediário (I). Já o resultado do método qualitativo necessita de comparação por meio da CIM, que é fixa neste método.

São demonstradas a seguir, as comparações quanto ao perfil de antibiótico entre os grupos controle (G-C) e irradiados (G-LED), pelo método quantitativo (VITEK®2 *Compact*) e pelo método qualitativo (Disco-difusão).

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados da *S. aureus* (ATCC®BAA-977) e *S. aureus* extraída da queimadura cutânea dos dois pacientes queimados (C1 e C2) comparando os grupos controle (G-C) e irradiados (G-LED).

Tabela 3. Perfil de sensibilidade (VITEK®2 *Compact*), média e desvio padrão das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para bactéria *S. aureus* (ATCC®BAA-977).

ATB	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
CLI							
VITEK®	S	R	R	R	R	R	R
DD	35,0 (0,4)	37,8 (1,4)	36,6 (0,7)	37,0 (0,6)	33,6 (0,9)	35,0 (0,4)	35,4 (0,8)
ERI							
VITEK®	S	R	R	R	R	R	R
DD	11,7 (0,5)	14,9 (0,4)	15,3 (1,3)	15,4 (0,5)	11,6 (0,7)	11,1 (0,6)	11,6 (0,6)
PEN							
VITEK®	R	R	R	R	R	R	R
DD	21,0 (0,9)	24,2 (0,3)	23,9 (0,3)	24,5 (1,5)	21,6 (0,6)	19,9 (4,4)	21,7 (0,8)
VAN							
VITEK®	R	R	R	R	R	R	R
DD	22,3 (0,3)	24,8 (0,5)	23,0 (0,5)	23,9 (0,2)	21,7 (0,2)	22,3 (0,2)	22,5 (0,8)

ATB: Antibiótico, G-C: Grupo controle, CLI: Clindamicina, ERI: Eritromicina, PEN: Penicilina, VAN: Vancomicina. Considerando $p < 0,05$ para comprimento de onda e energia comparando ao controle: $p = 0,995$.

Tabela 4. Valores médios das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para a bactéria *S. aureus* extraída da queimadura cutânea do caso 1 (C1) comparando grupos irradiados e controle.

ATB	Método	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
		C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
CLI	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
ERI	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	36,7	35,0 [§]	37,5 [§]	29,0 ^{*#£}	26,0 ^{*#£}	29,3 ^{*£}	29,3 ^{*£}
PEN	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	28,2	20,1 [*]	21,3 [*]	20,3 [*]	18,6 ^{*#£§}	18,6 ^{*£}	18,3 ^{*#£§}
GEN	VITEK®2	S	S	S	S	S	S	S
	DD	39,1	28,1 [*]	23,8 ^{*#}	23,3 ^{*#}	21,2 ^{*#}	21,6 ^{*#}	22,6 ^{*#}
OXA	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	30,7	20,0 [*]	21,7 [*]	20,6 [*]	18,6 [*]	18,3 [*]	18,6 [*]
VAN	VITEK®2	S	S	S	S	S	S	S
	DD	33,8	26,7 ^{*£§}	22,2 ^{*#}	20,6 ^{*#}	20,6 ^{*#£}	20,6 ^{*#£}	20,6 ^{*#£}

ATB: antibiótico, G-C: Grupo controle, DD: Disco-difusão, SH: sem halo; C1: Caso 1; CLI: Clindamicina, ERI: Eritromicina, PEN: Penicilina, GEN: Gentamicina, OXA: Oxacilina, VAN: Vancomicina. Considerando p<0,05: *controle, #465nm 4J, £465nm 5J, §465nm 6J.

Tabela 5. Valores médios das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para a bactéria *S. aureus* extraída da queimadura cutânea do caso 2 (C2) comparando grupos irradiados e controle.

ATB	Método	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
		C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
CLI	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
ERI	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
PEN	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
GEN	VITEK®2	S	S	S	S	S	S	S
	DD	20,4	20,4	20,5	20,6 [#]	20,4	20,3 [#]	20,4
OXA	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
VAN	VITEK®2	S	S	R	S	S	S	S
	DD	32,9	20,1	20,1	20,2 [*]	20,0	20,1	10,9 [§]

ATB: antibiótico, SH: sem halo, G-C: Grupo controle, C2: Caso 2, R: Resistente, S: Sensível, CLI: Clindamicina, ERI: Eritromicina, PEN: Penicilina, GEN: Gentamicina, OXA: Oxacilina, VAN: Vancomicina. Considerando p<0,05: *controle, #465nm 4J, £465nm 5J, §465nm 6J.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os resultados da bactéria *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *P. aeruginosa* extraída da queimadura cutânea do paciente queimado (C3), respectivamente, comparando os grupos controle (G-C) e irradiados (G-LED).

As amostras coletadas nas queimaduras cutâneas dos pacientes queimados indicaram que nenhuma lesão estava contaminada com *Escherichia coli*.

Tabela 6. Perfil de sensibilidade (VITEK®2 Compact), média e desvio padrão das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para bactéria *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

ATB	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
CEF							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	30,5 (1,2)	35,2 (0,7)	32,9 (0,5)	29,9 (0,4)	31,5 (1,0)	29,4 (1,9)	31,3 (0,7)
CIP							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	40,0 (1,4)	43,4 (0,4)	37,1 (1,6)	35,7 (0,9)	39,2 (0,7)	37,2 (1,4)	36,9 (0,9)
GEN							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	28,2 (0,5)	31,1 (0,3)	22,7 (0,5)	23,7 (0,4)	20,4 (0,5)	21,4 (0,2)	22,6 (0,3)
MER							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	32,5 (0,9)	40,6 (1,1)	43,9 (1,6)	37,8 (1,7)	34,9 (0,8)	34,6 (1,0)	35,0 (1,0)
PI-TZ							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	31,8 (0,5)	36,1 (1,4)	34,9 (0,9)	34,7 (1,0)	31,3 (0,7)	31,4 (0,3)	32,1 (0,1)
POL							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	18,5 (0,4)	19,9 (1,1)	21,3 (1,0)	20,2 (0,4)	18,0 (0,6)	18,5 (0,7)	19,3 (0,1)

ATB: Antibiótico, G-C: Grupo controle, CEF: Ceftazidima, CIP: Ciprofloxacino, GEN: Gentamicina, MER: Meropenem, PI-TZ: Piperaciclina-Tazobactam, POL: Polimixina. Considerando $p < 0,05$ para comprimento de onda e energia comparando ao controle: $p = 0,880$.

Tabela 7: Valores médios das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para a bactéria *P. aeruginosa* extraída da queimadura cutânea do caso 3 (C3) comparando grupo controle (G-C) e grupos irradiados (G-LED).

ATB	Método	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
			C3	C3	C3	C3	C3	C3
AMI	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
CTZ	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	21,2	19,6	21,8	21,7	21,9	21,8	22,2
CEF	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
CIP	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
GEN	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH
IMI	VITEK®2	S	S	S	S	S	S	S
	DD	23,8	29,4*	31,9*	32,2*	31,5*	31,3*	26,4 ^{£§¥}
MER	VITEK®2	S	S	S	S	S	S	S
	DD	20,3	18,8	20,5	20,8	20,2	20,0	20,5
PI-TZ	VITEK®2	R	R	R	R	R	R	R
	DD	13,2	17,9*	20,8* [#]	21,4* [#]	18,7*	19,3*	18,8*

ATB: Antibiótico, **G-C:** Grupo controle, **AMI:** Amicacina, **CTZ:** Ceftazidima, **CEF:** Cefepime, **CIP:** Ciprofloxacino, **GEN:** Gentamicina, **IMI:** Imipenem, **MER:** Meropenem, **PI-TZ:** Piperaciclina-Tazobactam. Considerando p<0,05: *controle, [#]465nm 4J, [£]465nm 5J, [§]465nm 6J, [¥]630nm 3J.

Tabela 8. Perfil de sensibilidade (VITEK®2 Compact), média e desvio padrão das medidas do halo de inibição por meio do Disco-difusão para bactéria *E. coli* (ATCC 25922).

ATB	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
AMP							
VITEK®	S	R	S	S	S	R	R
DD	24,6 (1,1)	24,6 (1,1)	43,9 (1,6)	37,8 (1,7)	34,9 (0,8)	34,6 (1,0)	35,0 (1,0)
AM/SB							
VITEK®	S	S	I	S	S	S	S
DD	36,1 (0,5)	37,0 (0,8)	39,7 (2,4)	39,0 (1,1)	36,9 (1,3)	36,0 (0,6)	37,3 (0,7)
GEN							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	27,9 (1,9)	30,6 (0,5)	31,1 (0,6)	29,3 (0,7)	29,1 (0,5)	29,6 (0,4)	30,2 (0,7)
IMI							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	35,3 (0,3)	36,5 (0,3)	37,3 (1,1)	36,1 (1,3)	36,5 (1,0)	35,9 (2,1)	36,3 (1,9)
CEF							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	36,6 (0,4)	39,2 (0,7)	38,8 (0,2)	41,0 (0,9)	39,1 (0,2)	36,7 (0,6)	37,0 (0,8)
PIP-TZ							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	31,7 (0,8)	33,2 (1,7)	32,2 (1,3)	32,4 (0,6)	30,9 (0,5)	28,5 (0,5)	31,2 (0,3)
POL							
VITEK®	S	S	S	S	S	S	S
DD	17,2 (0,2)	18,6 (0,2)	18,3 (0,1)	18,6 (0,3)	16,9 (0,4)	16,4 (0,4)	17,1 (0,2)

ATB: Antibiótico, G-C: Grupo controle, R: Resistente, S: Sensível. I: Intermediário, AMP: Ampicilina, AM/SB: Ampicilina-Sulbactam, GEN: Gentamicina, IMI: Imipenem, CEF: Cefepime, PIP-TZ: Piperaciclina-Tazobactam, POL: Polimixina. Considerando $p < 0,05$ para comprimento de onda e energia comparando ao controle: $p = 0,942$.

Como forma de verificar a inibição do crescimento bacteriano por meio da contagem de unidade formadora de colônia (UFC), foram comparados nos comprimentos de onda 465nm as energias de 4,5 e 6J e para 630nm energias de 3, 4e 5J para os grupos controle (G-C) e irradiados (G-LED), nas bactérias *S. aureus* (ATCC®BAA-977), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). As comparações são apresentadas nas Figuras 9 e 10.

Figura 9: Considerando $p < 0,05$ com *post-hoc* de Tukey: Considerando $p < 0,05$: *controle, #465nm 4J, £465nm 5J, §465nm 6J, ¥630nm 3J.

Para *S. aureus* (ATCC 977) é possível observar menor crescimento bacteriano no comprimento de onda 465nm quando comparado ao 630nm, e os grupos 465nm (5J) e 630nm (5J) apresentam maior variação quando comparados ao grupo controle. Na espécie *E. coli* (ATCC 25922) a inibição do crescimento bacteriano é semelhante entre os dois comprimentos de onda, sendo nos grupos 465nm (5J) e 630nm (3J) as maiores variações quando comparados ao grupo controle. Os resultados para a espécie *P. aeruginosa* (ATCC 27853) apontam maior inibição do crescimento bacteriano para o λ 465nm, sendo que a maior variação quando comparado ao grupo controle foi nos grupos irradiados a 5J em ambos os comprimentos de onda (465nm e 630nm). Nessa espécie observa-se ainda variação significativa entre os grupos 630nm (3J) e 465nm (4, 5 e 6J) e também no grupo 630nm (3J) diferença significativa para o grupo 465nm (4, 5 e 6J).

Figura 10: Modelo de dispersão das médias das três bactérias ATCC pesquisadas, quanto as áreas de inibição do crescimento bacteriano no eixo Y (UFC), comparando os grupos controle e irradiados, nos comprimentos de onda 465nm (Azul) a 4, 5 e 6J, e 630nm (Vermelho) com 3, 4 e 5J.

Observa-se na Figura 10 que a ocorrência de UFC por probabilidade, apresentada por tendência exponencial, categorizou-se uma área gráfica em azul que representa a dispersão do crescimento bacteriano, para cada bactéria, comprimento de onda e energia. Por meio da tendência da área azul, quanto maior inibição, menor dispersão, (menor a área gráfica em azul). Portanto, as maiores inibições foram observadas para o *S. aureus* e *P. aeruginosa* no comprimento de onda de 465nm (5J) e *E. coli* com 630nm (3J).

As bactérias extraídas das queimaduras cutâneas também foram analisadas no comprimento de onda 465nm (4, 5 e 6J) e 630nm (3, 4 e 5J) comparando os grupos controle (G-C) e irradiados (G-LED). Os resultados estão apresentados separadamente, sendo *Staphylococcus aureus* na Tabela 9 para os casos C1 e C2, e na Tabela 10 para a *Pseudomonas aeruginosa* (C3).

Tabela 9: Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) de UFC para a bactéria *Staphylococcus aureus* extraída da queimadura cutânea dos casos 1 e 2 (C1 e C2) comparando grupos controle e irradiados (G-LED).

	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
		C1	C1	C1	C1	C1	C1
Média	68,78	23,83*	42,33	43,00	44,17	51,00	60,67
DP	18,24	19,05	22,70	25,51	33,24	28,23	10,15
LS	77,85	43,83	66,16	69,78	79,05	80,63	71,32
LI	59,70	3,84	18,51	16,22	9,28	21,37	50,01
		C2	C2	C2	C2	C2	C2
Média	75,17	59,67	32,50	25,67*	37,17	36,33	40,67
DP	34,74	32,02	18,45	18,40	34,11	19,37	28,43
LS	92,45	93,27	51,87	44,98	72,97	56,67	70,51
LI	57,89	26,06	13,13	6,35	1,37	16,00	10,82

G-C: Grupo controle, **DP:** Desvio Padrão, **LS:** Limite superior, **LI:** Limite Inferior. **C1:** Caso 1, **C2:** Caso 2. Considerando $p < 0,05$: *controle.

Tabela 10: Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) de UFC da bactéria *P. aeruginosa* extraída da queimadura cutânea do caso 3 (C3) comparando grupos irradiados e controle.

	G-C	465nm	465nm	465nm	630nm	630nm	630nm
		(4J)	(5J)	(6J)	(3J)	(4J)	(5J)
		C3	C3	C3	C3	C3	C3
Média	116,61	26,67*	17,50*	10,67*	32,00*	41,83*	42,67*
DP	56,91	7,00	16,33	10,93	14,84	27,41	21,76
LS	144,92	34,02	34,64	22,14	47,58	70,61	65,51
LI	88,31	19,32	0,36	-0,80	16,42	13,06	19,82

G-C: Grupo controle, **DP:** Desvio Padrão, **LS:** Limite superior, **LI:** Limite Inferior. Considerando $p < 0,05$: *controle.

Nos experimentos foram também controlados e analisados os resultados das variações de pH da solução salina, comparando o grupo controle (G-C) e os grupos irradiados (G-LED), das bactérias *S. aureus* (ATCC®BAA-977), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) - Tabela 11, e das extraídas das queimaduras cutâneas (Tabelas 12 e 13).

Tabela 11: Valores médios, desvio padrão e limites (IC 95%) de pH pré e pós irradiação das bactérias *S. aureus* (ATCC®BAA-977), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa*. (ATCC 27853).

	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
<i>S. aureus</i>							
Média	5,03	4,5	4,3	4,6	4,7	4,8	4,7
DP	0,46	0,7	0,8	0,6	0,6	0,6	0,5
LS	6,19	5,3	5,2	5,2	5,4	5,4	5,3
LI	3,87	3,8	3,4	3,9	4,0	4,1	4,1
<i>E. coli</i>							
Média	4,26	5,2	5,1	5,3	4,9	5,3	5,1
DP	0,13	0,4	0,5	0,4	0,4	0,6	0,4
LS	4,60	5,7	5,7	5,8	5,4	6,0	5,5
LI	3,93	4,7	4,5	4,8	4,4	4,6	4,6
<i>P. aeruginosa</i>							
Média	4,62	5,1	5,4	5,5*	5,5*	5,4*	5,4
DP	0,28	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3
LS	5,31	5,6	5,8	5,8	6,0	5,8	5,7
LI	3,92	4,6	5,0	5,1	5,1	5,0	5,1

G-C: Grupo controle, **DP:** Desvio Padrão, **LS:** Limite superior, **LI:** Limite Inferior. Considerando $p < 0,05$: *controle.

Tabela 12. Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) do pH pré (controle) e após irradiação da bactéria *S. aureus* extraída da queimadura cutânea dos casos 1 e 2 (C1 e C2) comparando grupos controle e irradiados.

	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
Média	6,52	6,73	6,74	6,98*	6,88	7,07*	7,05*
DP	0,27	0,18	0,10	0,22	0,12	0,11	0,31
LS	7,20	6,93	6,85	7,21	7,01	7,19	7,37
LI	5,84	6,53	6,63	6,75	6,75	6,94	6,72
	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
Média	6,66	6,53	6,61	6,75	6,64	6,75	6,85
DP	0,14	0,60	0,57	0,57	0,44	0,47	0,61
LS	7,02	7,17	7,22	7,35	7,11	7,24	7,49
LI	6,29	5,90	6,01	6,14	6,17	6,26	6,20

G-C: Grupo controle, **DP:** Desvio Padrão, **LS:** Limite superior, **LI:** Limite Inferior. **C1:** Caso 1, **C2:** Caso 2. Considerando $p < 0,05$: *controle.

Tabela 13: Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior de pH (IC 95%) pré e pós irradiação da bactéria *P. aeruginosa* extraída da queimadura cutânea do caso 3 (C3) comparando grupos controle e irradiados.

	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
Média	4,46	5,55*	5,72*	6,08*	5,75*	5,71*	5,40
DP	0,47	0,51	0,59	0,25	0,43	0,35	0,36
LS	5,65	6,08	6,34	6,35	6,21	6,08	5,78
LI	3,27	5,01	5,09	5,81	5,29	5,34	5,02

G-C: Grupo controle, **DP:** Desvio Padrão, **LS:** Limite superior, **LI:** Limite Inferior. Considerando $p < 0,05$: *controle.

Outra variável controlada nesta investigação foi a temperatura pré e pós irradiação da solução salina comparando o grupo controle (G-C) e os grupos irradiados (G-LED), das bactérias *S. aureus* (ATCC®BAA-977), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) - Tabela 14, e das extraídas das queimaduras cutâneas dos pacientes queimados (Tabelas 15 e 16).

Tabela 14: Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) da temperatura (°C) pré e pós irradiação das bactérias *S. aureus* (ATCC®BAA-977), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa*. (ATCC 27853).

	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
<i>S. aureus</i>							
Média	21,2	25,4*	26,7*	26,9*	23,4*#£§	23,9*##£§	23,8*##£§
DP	1,1	0,6	0,4	1,3	0,4	0,0	0,7
LS	22,1	26,0	27,2	28,3	23,8	24,0	24,5
LI	21,1	24,8	26,2	25,4	22,9	23,8	23,0
<i>E. coli</i>							
Média	18,8	24,4*	27,6*#¥∞€	25,5*¥	22,1*£§	22,9*£	23,4*£
DP	1,7	1,1	1,7	1,7	1,6	1,2	1,6
LS	19,1	25,7	29,4	27,3	23,8	24,2	25,1
LI	17,7	23,2	25,8	23,7	20,3	21,5	21,7
<i>P. aeruginosa</i>							
Média	19,7	25,5*£¥∞€	29,1*##¥∞€	26,9*¥∞€	21,6#£§	22,8*##£§	22,8*##£§
DP	1,8	0,9	1,6	1,4	1,4	1,4	0,3
LS	20,6	26,5	29,7	28,4	23,1	24,3	23,1
LI	19,1	24,5	28,5	25,4	20,2	21,3	22,4

G-C: Grupo controle, **DP:** Desvio Padrão, **LS:** Limite superior, **LI:** Limite Inferior. Considerando p<0,05: *controle, #465nm 4J, £465nm 5J, §465nm 6J, ¥630nm 3J, ∞630nm 4J, €630nm 5J.

Tabela 15: Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) da temperatura (°C) pré (controle) e pós irradiação da bactéria *Staphylococcus aureus* extraída da queimadura cutânea dos casos 1 e 2 (C1 e C2) comparando grupos controle e irradiados.

	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
Média	23,0	31,5 ^{*¥∞€}	32,8 ^{*¥∞€}	31,3 ^{*¥∞€}	27,5 ^{*#£§€}	25,6 ^{*#£§}	24,8 ^{*#£§¥}
DP	1,14	0,95	0,30	1,04	1,01	1,53	2,13
LS	23,41	32,49	33,20	32,47	28,61	27,22	27,12
LI	22,63	30,50	32,56	30,28	26,48	24,00	22,64
	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
Média	23,02	31,7 ^{*¥∞€}	31,6 ^{*¥∞€}	32,3 ^{*¥∞€}	28,4 ^{*#£§}	27,5 ^{*#£§}	28,6 ^{*#£§}
DP	1,14	0,76	1,80	1,85	0,35	2,28	2,93
LS	23,41	32,49	33,20	32,47	28,61	27,22	27,12
LI	22,58	30,95	29,73	30,42	28,05	25,15	25,53

G-C: Grupo controle, **DP:** Desvio Padrão, **LS:** Limite superior, **LI:** Limite Inferior. **C1:** Caso 1, **C2:** Caso 2. Considerando p<0,05: ^{*}controle, [#]465nm 4J, [£]465nm 5J, [§]465nm 6J, [¥]630nm 3J, [∞]630nm 4J, [€]630nm 5J.

Tabela 16: Valores médios, desvio padrão e limite superior e inferior (IC 95%) da temperatura (°C) pré (controle) e pós irradiação da bactéria *P. aeruginosa* extraída da queimadura cutânea do caso 3 (C3) comparando grupos controle e irradiados.

	G-C	465nm (4J)	465nm (5J)	465nm (6J)	630nm (3J)	630nm (4J)	630nm (5J)
	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
Média	25,40	30,88 [*]	32,45 [*]	31,96 [*]	28,38 ^{*#£§}	30,18 ^{*£}	29,08 ^{*£§}
DP	0,78	1,33	1,86	2,06	1,93	0,79	0,81
LS	25,67	32,28	34,41	34,13	30,41	31,01	29,93
LI	25,14	29,47	30,48	29,79	26,35	29,34	28,23

G-C: Grupo controle, **DP:** Desvio Padrão, **LS:** Limite superior, **LI:** Limite Inferior. Considerando p<0,05: ^{*}controle, [#]465nm 4J, [£]465nm 5J, [§]465nm 6J.

7. Discussão

7. Discussão

A literatura pesquisada até o momento registra que há estudos que exploram a interação de recursos eletrofísicos e antibióticos, contudo, estes estudos são raros, e representados por meio de corrente elétrica ^[24] e ultrassom terapêutico ^[25].

No que diz respeito as evidências sobre os efeitos da fotobiomodulação por meio do LED na inativação bacteriana em diferentes espécies, inúmeros são os estudos que apresentam resultados positivos ^[16,17,18,19,21,45,46,48,49,51,52], como também são encontrados estudos que utilizaram o laser de baixa potência ^[43,44,61,62,63].

No entanto, apesar de evidências do uso do LED sobre a inibição de bactérias, este cenário é representado por estudos que aplicaram exclusivamente a luz, não associando a antibióticos. Por esta razão, a investigação sobre a interação da fotobiomodulação por meio do LED com os antibióticos se faz necessária.

7.1. *Staphylococcus aureus*

Ao analisar os resultados das avaliações do perfil de sensibilidade da *Staphylococcus aureus* (ATCC®BAA-977) por meio do método quantitativo, foi possível verificar que houve mudança para dois antibióticos, a Clindamicina e Eritromicina, que de sensível, se mostraram resistentes em todos os grupos irradiados, e em todas as repetições, no entanto, esta mudança não foi confirmada pelo método qualitativo no qual nenhuma mudança significativa foi observada entre os grupos controle e irradiados pelo Disco-difusão.

Os resultados da *S. aureus* coletada nas queimaduras cutâneas dos pacientes, indicam que ambas as culturas apresentaram resistência a Clindamicina e Eritromicina nos grupos controle, e após as irradiações, o caso 1 apresentou diminuição do halo de inibição para a Eritromicina no grupo irradiado por 630nm (3J) com significativa

diferença com o grupo controle, e ainda, diferença significativa entre todos os grupos irradiados, porém, sem alterações no método quantitativo, diferindo dos resultados apresentados pelo *S. aureus* ATCC.

Ainda no caso 1, independente se o *S. aureus* era resistente ou sensível a irradiação com LED nos dois comprimentos de onda e na maioria das energias promoveu uma diminuição do halo no disco de difusão, quando comparado ao grupo controle, indicando uma maior resistência. No entanto a análise quantitativa não foi capaz de mudar essa categoria em nenhum comprimento de onda ou energia irradiada.

Os achados sobre a Clindamicina relatam elevação de seu uso por volta dos anos 70 ^[64]. Sua ação específica é inibir a síntese de ácidos nucleicos no ribossomo, inibindo o início no processo da cadeia de peptídeos diminuindo a síntese proteica. Apesar pouca resistência descrita em estudos *in vitro* para *Staphylococcus aureus*, sua atuação é principalmente em bactérias anaeróbias Gram-negativas, sendo clinicamente importante, mas não mais efetiva que a Eritromicina ^[65].

A *S. aureus* do caso 2 apresentou diferença significativa no método qualitativo para o antibiótico Vancomicina e Gentamicina, com diferença apenas para os grupos irradiados a 465nm (6J) e 630nm (4J) para Gentamicina e para Vancomicina 465 nm (6J) e 630nm (5J) no halo de inibição. No método quantitativo foi encontrada alteração do perfil sensível para resistente para Vancomicina com 465nm (5J).

A Vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo bacteriostático, que permanece sendo o antibiótico mais frequentemente usado em pacientes criticamente enfermos para o tratamento de infecções bacterianas devido à resistência à Meticilina, por exemplo, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ^[66].

Os agentes antimicrobianos glicopeptídeos possuem uma estrutura química complexa comum, e seu principal modo de ação é a inibição da síntese da parede celular

num sítio diferente dos beta-lactâmicos. A atividade desse grupo é dirigida principalmente contra as bactérias Gram-positivas, sendo útil na terapia de infecções causadas por cepas resistentes aos agentes beta-lactâmicos, como, por exemplo, a *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) ^[60].

A avaliação da resistência à Vancomicina em *enterococos* conduzida por métodos genotípicos e fenotípicos, têm mostrado a resistência adquirida para glicopeptídeos corresponde a seis diferentes fenótipos ^[67,68], e foi investigada por Jakovac et al. ^[69] a transferência desses genes resistentes a Vancomicina, sendo observado na *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), a origem da espécie *S. aureus* resistente à Vancomicina (VRSA) ^[70,71,72].

Portanto, é difícil afirmar qual o exato mecanismo de ação responsável pelo desenvolvimento de resistência à Vancomicina, o comprimento de onda 465nm a 5J, podendo sugerir, que pode haver algum estímulo aos fatores genéticos relacionados a esse medicamento, alterando sua característica genética. Leva-se em conta também, as variações individuais de cada pessoa.

Uma vez no citoplasma, o mecanismo de ação da Gentamicina e outros aminoglicosídeos é se ligar a um rRNA específico no ribossomo, afetando a tradução do mRNA (RNA mensageiro), provocando a formação de proteínas incompletas ou não funcionais ^[73]. Há autores que propõem ainda que além das alterações proteicas, a utilização da luz pode também gerar uma impermeabilidade na membrana celular ou acúmulo de espécies reativas de oxigênio, e como consequência, há a depleção de proteínas envolvidas nas reações de oxidação-redução gerando a morte bacteriana ^[74]. A sua alteração de sensível para resistente pode ser devido a inativação enzimas modificadoras de aminoglicosídeos ^[75].

Este medicamento passa pela membrana Gram-negativa por transporte ativo dependente de oxigênio, e como o oxigênio é necessário, os aminoglicosídeos não são eficazes nas bactérias anaeróbias. Não diferente de outros antibióticos este promove morte bacteriana dependente da concentração, sendo as mais altas, com maior morte antimicrobiana. Os efeitos sinérgicos dos aminoglicosídeos em bactérias Gram-positivas quando combinados com outros medicamentos ainda apresentam mecanismo desconhecido, e embora com aumento na taxa de resistência, ainda é uma opção para infecções por Gram-negativas [76].

Observa-se que a variação nas respostas encontradas no perfil de sensibilidade nas espécies estudadas foram submetidas a diferentes métodos de avaliação, e cada método apresenta diferentes concentrações inibitórias mínimas, o que pode refletir esses achados.

Sustentado pelos achados desta pesquisa pode-se observar que há mudanças no perfil de sensibilidade de bactérias ATCC, e que, o LED pode ser capaz de alterar de alguma forma o metabolismo ou algum componente da membrana da parede celular bacteriana, de forma que a bactéria possa desenvolver algum mecanismo de proteção a luz.

Todavia, vale ressaltar que a inibição do crescimento bacteriano para esta espécie foi encontrada, mas, até o momento não é possível afirmar o real mecanismo tanto para diminuição das colônias de bactérias quanto para as mudanças de perfil do antibiótico, ou relacioná-los aos comprimentos de onda e energias aqui pesquisados. Quanto aos outros antibióticos analisados foi possível observar que mesmo apresentando halo de inibição, os valores não foram suficientes para se afirmar mudança no perfil de sensibilidade, conforme padrões da CLSI, ratificado pelo método quantitativo que não apresentou alterações.

A verificação de UFC para os grupos apontou que os melhores resultados para inibição do crescimento bacteriano foi a 5J para ambos os comprimentos de onda (465nm e 630nm) para ATCC e de 465nm (4 e 6J) para as colônias extraídas dos pacientes, sendo então observado que o menor comprimento de onda apresentou maior inibição do crescimento bacteriano.

Com variações de temperatura significantes para todos os grupos irradiados entre si e entre o grupo controle nos dois tipos de bactérias, a máxima temperatura média foi de 32,8°C para o comprimento de onda 465nm em comparação ao 630nm, o que pode se dizer que o aumento de temperatura poderia gerar aumento de UFC, no entanto, em nenhum dos grupos irradiados houve crescimento de UFC quando comparado ao grupo controle. O que não descarta a possibilidade de que poderia ter havido uma inibição ainda maior caso o aumento de temperatura fosse menor. Considera-se ainda que o tempo de crescimento bacteriano é de 24 horas em estufa a 37°C e o maior tempo de irradiação a 465nm foi de 23,14 minutos.

Comportamento semelhante foi observado no pH, sem variação entre os grupos de ATCC, entretanto, foi observado aumento nos grupos irradiados a 465nm (6J) e 630nm (4 e 5J) para as bactérias coletadas nas queimaduras cutâneas.

7.2 *Escherichia coli*

Os experimentos com a *Escherichia coli* foram realizados somente na espécie ATCC. Na comparação entre os grupos foram encontradas mudanças associadas ao antibiótico Ampicilina com variação de sensível para resistente nos grupos 465nm (5J) e 630nm (4 e 5J) em todas as repetições, e de perfil sensível para intermediário a Ampicilina-Sulbactam no comprimento de onda 465nm (5J) e 630nm (4 e 5J), porém,

esta, em uma única repetição do método quantitativo, não sendo confirmadas pelo método qualitativo para todas as repetições.

A Ampicilina é um antimicrobiano *beta-lactamase* e o Sulbactam um inibidor da *beta-lactamase*, que inibe a ação de qualquer bactéria produtora da enzima após se ligar a ela, não permitindo sua ação sobre o antimicrobiano ^[77]. A combinação de Ampicilina e Sulbactam mostra sinergia como alternativa para cepas resistentes à Ampicilina ^[78].

Entre os antibióticos, os beta-lactâmicos têm sido amplamente usados contra a maioria das infecções bacterianas, e, devido ao seu uso generalizado, bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* desenvolveram meios complexos de resistência a antibióticos ^[79].

O modo de ação dos antimicrobianos beta-lactâmicos em organismos sensíveis pode ser considerado um processo de duas etapas: Na primeira a droga se liga a receptores primários, as proteínas de ligação à penicilina ligadas à membrana (PBPs), e essas proteínas são importantes para formação morfogênética do ciclo celular da estrutura do peptidoglicano da parede celular, assim, a inativação destas, pelo antimicrobiano promove interrupção de sua função. A segunda etapa corresponde aos efeitos fisiológicos causados por essa interação receptor-ligante e as PBPs na parede celular, uma vez que as PBPs são responsáveis pela integridade da parede celular, e esta, está situada em um ambiente hipotônico, sua ruptura causa lise e morte celular ^[80,81].

Há pesquisas que exploram sobre como os beta-lactâmicos induzem várias rupturas de membrana nas superfícies de cepas de *E. coli* suscetíveis ^[82,83,84]. Por exemplo, Perry et al. ^[83] compararam os efeitos da Ampicilina na ultraestrutura da membrana e na elasticidade de uma cepa de *E. Coli*, e encontraram alterações morfológicas na bactéria. Yang et al. ^[85] estudaram vários efeitos da Amoxicilina e

Penicilina na membrana bacteriana, e verificaram nanoporos induzidos pelos dois antibióticos, ou seja, houve dano a membrana, este dano foi maior pela Amoxicilina.

Uzoechi e Abu-Lail ^[86] decorreram uma investigação sobre as mudanças na elasticidade e propriedades conformacionais da *E. coli*, identificando certo grau de rigidez na membrana, associada ainda a uma baixa permeabilidade. Os autores afirmam que estes achados indicam que, em longas exposições à Ampicilina, as células utilizam sua maior rigidez e menor permeabilidade da membrana externa para reduzir a difusão do antibiótico.

As mudanças ocorridas na parede da membrana celular da bactéria *E. coli* apresenta mecanismos complexos de entendimento, sendo necessárias análises mais específicas quanto a suas propriedades mecânicas e morfológicas da membrana celular, bem como seu perfil bioquímico. É possível que o LED possa influenciar em algum momento o metabolismo celular ou haver uma importante variação na produção de oxigênios reativos que também podem causar danos a parede da bactéria.

A menor inibição bacteriana foi encontrada no grupo 465nm (5J) e 630nm (3J), enquanto que as variações de temperatura foram significantes para todos os grupos, com maior média de 27,6°C a 465nm (5J) e sem variações significativas no pH.

7.3. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* foi investigada tanto na bactéria ATCC quanto na coletada de queimadura cutânea – caso 3. Quanto ao perfil de sensibilidade nenhuma modificação foi observada pelos métodos quantitativo e qualitativo para todos os grupos ATCC. Já a bactéria extraída do paciente apresentou alterações para o antibiótico Imipenen com diferença significativa nos grupos 465nm (5J) e 630nm (3 e 5J), e para o

antibiótico Piperacilina-Tazobactam também com diferença significativa para todos os grupos irradiados no método qualitativo, ambos antibióticos em comparação ao grupo controle, todavia, sem alteração de perfil no método quantitativo para os dois antibióticos.

Envolvido no mecanismo de ação do Imipenem está uma possível mutação em uma porina (OprD) e em reguladores de AMPc (T680), ainda não catalogado, responsável pelo aumento da resistência ao antibiótico ^[87].

Resultados positivos no controle microbiológico da *E. coli* foram encontrados com a Piperacilina/Tazobactam, todavia, em espécies sensíveis com baixa concentração inibitória mínima ^[88,89] outra vertente neste contexto é a possibilidade destes antibióticos exercerem uma capacidade hidrolítica ^[90,91].

As variações de temperatura ocorreram em todos os grupos, com maior média de 29,1°C para 465nm (5J), e as variações de pH foram representativas nos grupos 465nm (6J) e 630nm (3 e 4J) para ATCC e nos grupos 465nm (4, 5 e 6J) e 630nm (3 e 4J) para o caso do paciente, quando comparados ao controle. Mesmo havendo variação do pH, os valores não foram suficientes para mudança de perfil, permanecendo ácido como no grupo controle.

7.4. Aspectos gerais dos experimentos

Nos experimentos conduzidos por esta pesquisa foi possível verificar algumas alterações no perfil de sensibilidade a antibióticos e inibição do crescimento bacteriano nas três espécies investigadas.

As diferenças entre os métodos utilizados para comparação do perfil de sensibilidade entre as bactérias podem justificar a não afirmação das mudanças no perfil de sensibilidade tanto para as bactérias ATCC quanto para as bactérias extraídas dos

pacientes, uma vez que os métodos são amplamente diferenciados tanto em sua execução, quanto na forma de interpretação dos resultados.

O método qualitativo atua por estimativa da concentração inibitória mínima, e os resultados no Disco-difusão são de acordo com concentrações inibitórias fixas, o que pode refletir a não unanimidade dos resultados. Quanto ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos, são três os mecanismos, destruição do antibiótico, ausência de alguma etapa susceptível ao antibiótico ou impermeabilidade ao medicamento ^[92].

Quanto a afirmação dos reais mecanismos que ocorrem para obtenção desses achados, as nossas análises não são capazes de indicar qualquer mecanismo de ação, sendo necessárias maiores investigações.

No geral, as pesquisas que aplicaram LED e realizaram análises mais complexas (bioquímicas e de fluorescência), a inibição bacteriana pode ser explicada pelo dano à membrana. Os resultados de McKenzie et al. ^[93] demonstraram vazamento de componentes intracelulares e passagem de corantes fluorescentes, que forneceram evidências de permeação da membrana na *E. coli*. Por outro lado, os autores utilizaram coloração diferente para análise bioquímica da *S. aureus*, o que pode ter gerado resultados de difícil interpretação, não podendo afirmar que ocorreram alterações de dano à membrana celular na *S. aureus* induzida pelo LED.

As bactérias ATCC são utilizadas como padrão para pesquisas e controle de qualidade em laboratórios de microbiologia, e ainda assim, aqui apresentaram variações. Uma razão é que pode haver o desenvolvimento de algum mecanismo de resistência frente a exposição ao LED que, mesmo ainda não totalmente esclarecido, instiga verificações futuras quanto ao perfil bioquímico, genético, bem como do *stress* oxidativo e análises microscópicas.

O estudo de McKenzie et al. ^[93] descreve densidade de energia de 243J/cm² para *E. coli* e 117J/cm² para *S. aureus*, juntamente com Kim et al. ^[48] que realizaram aplicações de até 486J/cm². Avaliando a viabilidade da luz azul (405nm) foram comparadas a suscetibilidade das bactérias *S. aureus*, *E. Coli* e *P. Aeruginosa*, com densidades de energia de 36J/cm² com 100% na inativação das bactérias ^[102].

Outra exploração da inativação das bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*, com aplicação de LED (405 e 808nm) em diferentes fluências (1, 3, 5, 10 e 20J/cm²) evidenciou a fluência de 20J/cm² como a mais eficaz para ambas as espécies, reproduzindo redução de 93% para a *P. aeruginosa* e 72% para a *S. aureus* na combinação dos dois comprimentos de onda ^[52].

Nesta pesquisa a densidade de energia variou de 6 a 12 J/cm², mostrando que densidades de energia menores também são capazes de gerar mudanças no crescimento bacteriano.

McKenzie et al. ^[93] transcrevem ainda que a irradiação que também ocorreu a distância (5cm), com diferença na quantidade de solução irradiada que foi de 3ml vs 300μl desta pesquisa.

Quanto ao controle de temperatura, os autores McKenzie et al. ^[93] relatam uma variação máxima entre 2 e 3°C, resultado divergente desta pesquisa, que obteve maior variação, mas, observa-se que o maior valor médio de temperatura atingida foi de 32,8°C na *S. aureus*, 465nm (6J) sendo esta, a energia que necessitou maior tempo de aplicação para este comprimento de onda. Considerando que a incubação das bactérias para verificação do crescimento de UFC é em estufa a 37 °C por 24 horas, acredita-se que a temperatura atingida nas irradiações não produziu calor suficiente para interferir nos resultados. Outro ponto, é que no estudo supracitado não é mencionada a potência do LED aplicado.

Apesar de várias repetições realizadas, seguindo o mesmo protocolo para irradiação nas três espécies, não foi encontrado uma confluência quanto a energia de irradiação, mas sendo observadas maiores inibições no comprimento de onda de 465nm, conforme informações descritas por Kim et al. ^[94]. Os comprimentos de onda menores são capazes de gerar maior produção de energia e fótons, pois estão próximos ao violeta e ultravioleta, podendo sugerir a razão de resultados semelhantes, também observados por McKenzie et al. ^[93] que relatam que os menores comprimentos de onda tendem a apresentar melhor resposta a inibição bacteriana.

A luz azul (400-470nm) excita cromóforos fotossensibilizantes endógenos de ocorrência natural (porfirinas e/ou flavinas livres de ferro) em células microbianas e há ainda a produção das EROs que é citotóxica ^[55,95], causando danos aos componentes celulares ^[16].

Comparando os efeitos do LED e do laser de 405nm com fluências que variaram de 40 a 121J/cm² em bactérias MRSA, Masson-Meyers et al. ^[96] concluíram que ambas as fontes luminosas são capazes de gerar efeito antimicrobiano, não havendo efeito superior quando comparada uma fonte a outra.

Biener et al. ^[97] acrescentam ainda possível aumento da permeabilidade de íons pela membrana, e especula-se ainda que a luz azul seja capaz de gerar EROs pela excitação de oxidases contendo flexinas dentro dos peroxissomos e mitocôndrias das células de mamíferos ^[98,99,100,101].

É possível que 405nm a exposição à luz pode induzir danos a vários locais dentro da célula, aumento da liberação de ácido nucleico (espectrofotômetro) e aumento na concentração de DNA no meio extracelular ^[93].

Guffey et al. ^[103] sugerem que há mudanças nas propriedades *redox* dos componentes respiratórios das bactérias e aumento da produção de ânion superóxido com

subsequente aumento na concentração de H_2O_2 , fator este que deve ser considerado quando se elege aplicações com a terapia fotodinâmica.

Investigando a faixa espectral de 405 e 470nm e fluências de 1 a 220J/cm² em bactérias MRSA, Bumah et al. ^[104] relatam não haver diferenças no crescimento bacteriano quando comparou-se os dois comprimentos de onda, pois ambos foram capazes de gerar inibição, acrescentando que a densidade de energia é o fator mais importante para este resultado.

Os nossos resultados indicam uma maior inibição no comprimento de onda de 465nm (5J), da mesma forma como encontrado na literatura, na qual, menores comprimentos geram maior inibição, porém, também observamos inibição no comprimento de onda de 630nm com energia de 5J.

O controle do pH não foi realizado por nenhum dos estudos aqui reunidos que utilizaram o LED na inativação de bactérias, resultando, portanto, em um impasse para possível discussão com outros achados. Entretanto, esta pesquisa mostra que há variações de pH, sendo representadas por diminuição do pH na espécie Gram-positiva (*S. aureus*), e aumento nas espécies Gram-negativa (*E. coli* e *P. aeruginosa*) quando comparados aos grupos controle. Essa variação do pH pode estar relacionada as alterações nas membranas com consequente extravasamento do conteúdo celular para a solução irradiada.

Estas variações não foram tão expressivas como, por exemplo, em pesquisa que investigou correntes polarizadas nas mesmas espécies bacterianas ^[42], já que a própria corrente é capaz de alterar o pH do meio estimulado. Assim, maiores investigações devem ser realizadas para rastrear possíveis interferências do pH na inativação de bactérias por meio do LED.

É laboriosa a comparação de parâmetros aplicados em culturas bacterianas que visam sua inativação, pois é percebida uma ampla variação desses dados, principalmente

no que diz respeito a dosimetria. Vale ainda ressaltar que os achados dessa pesquisa se perfizeram em aplicações únicas do LED, e que em aplicações clínicas, as aplicações são múltiplas e sequenciais.

8. Conclusão

8. Conclusão

A irradiação com LED foi capaz de gerar inibição do crescimento bacteriano nas espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, tanto nas espécies ATCC, quanto nas espécies coletadas em queimaduras cutâneas de pacientes. O comprimento de onda mais efetivo foi o 465nm, não seguindo um padrão para todas as espécies ou energias aplicadas.

A fotobiomodulação foi capaz de gerar mudanças no perfil de sensibilidade de antibióticos, bem como alterar o halo do Disco-difusão, o que pode alterar a resposta da terapia medicamentosa.

9. Referências

9. Referências

1. Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco OL. Bacterial contribution in chronicity of wounds. *Microb Ecol.* 73(3):710–721, 2017.
2. Smyth ET, McIlvenny G, Enstone JE, Emmerson AM, Humphreys H, Fitzpatrick F, Davies E, Newcombe RG, Spencer RC Hospital Infection Society Prevalence Survey Steering Group. Four country healthcare associated infection prevalence survey 2006: overview of the results. *J Hosp Infect.* 69: 230–48, 2008.
3. Lima AMCT, Sergio LPS, Trajano LASN, Souza BP, Mendes JPM, Cardoso AFR, Figueira CP, Tavares B, Figueira DS, Mencalha AL, Trajano ETL, Fonseca AS. Photobiomodulation by dual-wavelength low-power laser effects on infected pressure ulcers. *Lasers in Medical Science.* 35: 651–660, 2020. doi.org/10.1007/s10103-019-02862-w
4. Cuddigan J, Berlowitz DR, Ayello EA. Pressure ulcers in America: prevalence, incidence, and implications for the future. *Adv Skin Wound Care.* 14: 208, 2001.
5. Chicano S, Drolshagen C. Wound care: reducing hospital acquired pressure ulcers. *J Wound Ostomy Cont Nurs.* 36:45–50, 2009.
6. Armour-Burton T, Fields W, Outlaw L, Deleon E. The healthy skin project: changing nursing practice to prevent and treat hospital-acquired pressure ulcers. *Crit Care Nurse.* 33:32–40, 2013.
7. Demetriou M, Papanas N, Panopoulou M, Papatheodorou K, Maltezos E. Determinants of microbial load in infected diabetic foot ulcers: a pilot study. *Int J Endocrinol.* Article ID 858206, 5 pages, 2013. doi.org/10.1155/2013/858206
8. Jockenhöfer F, Gollnick F, Herberger K, Isbary G, Renner R, Stücker. Bacteriological pathogen spectrum of chronic leg ulcers: Results of a multicenter trial in dermatologic wound care centers differentiated by regions. *J Dtsch Dermatol Ges.* 11(11):1057-63, Nov, 2013. doi: 10.1111/ddg.12170.
9. Oncul O, Yuksel F, Altunay H, Açikel C, Çeliköz B, Çavuslu S. The evaluation of nosocomial infection during 1-year period in the burn unit of a training hospital in Istanbul, Turkey. *Burns.* 28(8): 738-44, 2002.
10. Lari AR, Alaghenbandan R. Nosocomial infections in an Iranian burn care center. *Burns.* 26(8): 737-40, 2000.
11. Macedo JLS, Rosa SC, Macedo KCS, Santos JB. Sepsis no paciente queimado: estudo microbiológico e da sensibilidade antimicrobiana. *Rev Soc Bras Cir Plast.* 20: 220-4, 2005.
12. Nasser S, Mabrouk A, Maher A. Colonization of burns wounds in Ain Shams University Burn Unit. *Burns.* 29(3): 229-33, 2003.
13. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC. Infection in burns. *Surg Infect.* 17(2): 250-255, 2016.
14. Song Z, Sun H, Yang Y, Jing H, Yang L, Ting, Y, et al. Enhanced efficacy and anti-biofilm activity of novel nanoemulsions against skin burn wound multi-drug resistant MRSA infections. *Nanomedicine.* 12(6):1543-55, Aug, 2016.

15. Gefen A, Ousey K. Update to device-related pressure ulcers: SECURE prevention. COVID-19, face masks and skin damage. J Wound Care. 29(5): 245-259, May, 2020. doi: 10.12968/jowc.2020.29.5.245.
16. Kumar V, Ghatge MJ, Kim W, Zhou GH, Khoo HG. Antibacterial efficacy of 405, 460 and 520 nm light emitting diodes on *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Applied Microbiology. 120: 49-56, 2015. DOI:10.1111/jam.12975.
17. Maclean M, Macgregor SJ, Anderson JG, Woolsey G. Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array. Appl Environ Microbiol. 75: 1932–1937, 2009.
18. Murdoch LE, Maclean M, Endarko E, Macgregor SJ, Anderson JG. Bactericidal effects of 405 nm light exposure demonstrated by inactivation of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, and *Mycobacterium* species in liquid suspensions and on exposed surfaces. Scientific World Journal. Article ID 137805, 137805. 8 pages, 2012. doi:10.1100/2012/137805
19. Maclean M, Murdoch LE, Macgregor SJ, Anderson JG. Sporicidal effects of high-Intensity 405 nm visible light on endospore-forming bacteria. Photochem Photobiol. 89: 120–126, 2013.
20. Petrini M, Tentini P, Tripodi D, Spoto G, D'Ercole S. in vitro antimicrobial activity of led irradiation on *Pseudomonas aeruginosa*. J Photochem Photobiol B. 168: 25-29, Jan, 2017. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.01.020.
21. Lanzarini-Lopes M, Zhao Z, Perreault F, Garcia-Segura S, Westerhoff P. Germicidal glowsticks: Side-emitting optical fibers inhibit *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* on surfaces. Water Research. 184: 116191, 2020. doi.org/10.1016/j.watres.2020.116191
22. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiol Spectrum 4(2):VMBF-0016-2015. 2016. doi:10.1128 /microbiolspec.VMBF-0016-2015.
23. Nesme J, Cécillon S, Delmont TO, Monier JM, Voge TM, Simonet P. Large-Scale Metagenomic-Based Study of Antibiotic Resistance in the Environment. Current Biology. 24 (10), 19 May 2014: 1096-1100. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.036.
24. Jass J, Lappin-Scott HM. The efficacy of antibiotics enhanced by electrical currents against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. J Antimicrob Chemother. 38(6): 987-1000, 1996.
25. Guirro ECO, Angelis DF, Sousa NTA, Guirro RRJ. Combination of the therapeutic ultrasound with antibiotics interfere with the growth of bacterial culture that colonizes skin ulcers: An in-vitro study. Ultrasonics Sonochemistry. 32: 284-289, 2016.
26. Miftahul AL, Taiichiro C, Momoko S, Takaaki S, Ji-AE K, Yoshiaki K, Takemasa S, Akira O. Antimicrobial action from a novel porphyrin derivative in photodynamic antimicrobial chemotherapy in vitro. Lasers Med Sci. 30: 383–387, 2015. DOI 10.1007/s10103-014-1681-6
27. Halili F, Arboleda A, Durkee H, Taneja M, Miller D, Alawa KA, Aguilar MC, Amescua G, Flynn JR, Parel JM. Rose bengal and riboflavin mediated photodynamic therapy to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis isolates. American Journal of Ophthalmology. 166: 194-202, Mar, 2016. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.03.01

28. Chengcheng L, Min H, Dandan M, Jin' EL, Jiru X. Photodynamic inactivation of antibiotic-resistant bacteria and biofilms by hematoporphyrin monomethyl ether. *Lasers Med Sci.* 31: 297–304, 2016.
29. Huang ST, Wu CY, Lee NY, Cheng CW, Yang MJ, Hung YA. Effects of 462 nm Light-Emitting Diode on the Inactivation of *Escherichia coli* and a Multidrug-Resistant by Tetracycline Photoreaction. *J. Clin. Med.* 7: 278, 2018. doi:10.3390/jcm7090278
30. Dharmaratne P, Sapugahawatte DN, Wang B, Chan CL, Lau KM, Lau CB, Fung KP, Ng DK, Ip M. Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A systematic review. *Eur J Med Chem.* 200 (15): 112341, Aug, 2020. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112341.
31. Jiang QEF, Tian J, Yang J, Zhang J, Cheng Y. Light-Excited Antibiotics for Potentiating Bacterial Killing via Reactive Oxygen Species Generation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 12(14):16150-16158, Apr, 2020. doi: 10.1021/acsami.0c02647.
32. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro H C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab.* 43(6): 413-423, 2007.
33. Cavalcanti SMM, França ER, Cabral C, Vilela MA, Montenegro F, Menezes D, Medeiros ACR. Prevalence of *staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. *Braz J Infect Dis.* 9(1): 56-63, 2005.
34. Noskin GA, Rubin RJ, Schentag JJ, Kluytmans J, Hedblom EC, Smulders M, Lapetina E, Gemmen E. The Burden of *Staphylococcus aureus* Infections on Hospitals in the United States An Analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. *Arch Intern Med.* 165(15): 1756-1761, 2005. DOI:10.1001/archinte.165.15.1756
35. Macedo JLS, Santos JB. Complicações infecciosas em pacientes queimados. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.* 21 (2): 108-11, 2006.
36. Edwards-Jones V, Greenwood JE. What's new in burn microbiology? *Burns*; 29(1): 15-24, 2003.
37. Kanno E, Tanno H, Suzuki A, Kamimatsuno R, Tachi M. Reconsideration of iodine in wound irrigation: the effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Wound Care.* 25(6): 335-9, 2016. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.6.335.
38. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 5: 200-214, 2001.
39. Livermore D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 234: 634-640, 2002.
40. McGowan JEr. Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control.* 34(1): S29-S37, 2006.
41. Moura CEM, Silva LLM, Godoy JRP. Úlceras de pressão: prevenção e tratamento. *Universitas Ciências da Saúde.* 3(2): 275-286, Jul/Dez, 2005.
42. Gomes RC, Brandino HE, Sousa NTA, Santos MF, Martinez R, Guirro RRJ. Polarized currents inhibit in vitro growth of bacteria colonizing cutaneous ulcers. *Wound Repair Regen.* 23(3): 403-11, May-Jun, 2015. doi: 10.1111/wrr.12296. Epub 2015 Jun 19.

43. Sousa NTA, Santos MF, Gomes RC, Brandino HE, Martinez R, Guirro RRJ. Blue laser inhibits bacterial growth os Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa. Photomed Laser Surg. 33(5): 278-282, 2015.
44. Sousa NTA, Gomes RC, Santos MF, Brandino HE, Martinez R, Guirro RRJ. Red and infrared laser therapy inhibits in vitro growth of major bacterial species that commonly colonize skin ulcers. Lasers Med Sci. 31: 549–556, 2016. DOI 10.1007/s10103-016-1907-x
45. Maclean MSJ, Macgregor JG, Anderson GA, Woolsey JE, Coia K, Gettinby G. Environmental decontamination of a hospital isolation room using highintensity narrow-spectrum light. J. Hosp. Infect. 76: 247–251, 2010.
46. Messina G, Burgassi S, Messina D, Montagnani V, Cevenini GA. new UV-LED device for automatic disinfection of stethoscope membranes. American Journal of Infection Control. 43: 61-66, 2015. DOI: 10.1016/j.ajic.2015.06.019.
47. Carvalho DPL, Pinto JG, Sorge CPC, Benedito FRR, Khouri S, Strixino JF. Study of photodynamic therapy in the control of isolated microorganisms from infected wounds—an in vitro study. Lasers Med Sci. 29: 113–120. 2014.
48. Kim MJ, Mikš-Krajnik M, Kumar A, Ghaté V, Yuk HG. Antibacterial effect and mechanism of high-intensity 405 ± 5 nm light emitting diode on Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus under refrigerated condition. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. 153: 33–39, 2015. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.032 1011-1344.
49. Xiaotong S, Chaowen X, Fang F, Xiangwei S, Fen Y, Miaoqing L, Zhipeng W, Xuan F, Dongxu Z, Hongbo X, Xiaolei W. Full Spectrum Visible LED Light Activated Antibacterial System Realized by Optimized Cu₂O Crystals. ACS Appl. Mater. Interfaces 8: 8386–839, 2016. DOI:10.1021/acsami.6b00914
50. Gold MH. Lasers and light treatments for Acne Vulgaris promising therapies; in therapeutic and aesthetic uses of photodynamic therapy part two of a five-part series. J. Clin. Aesthet. Dermatol. 1: 28–34, 2008.
51. Ghaté V, Zhou W, Yang H, Khoo GH, Yoon WB, Yuk HG. Antibacterial effect of light emitting diodes of visible wavelengths on selected foodborne pathogens at different illumination temperatures. Int J Food Microbiol. 166: 399–406, 2013.
52. Guffey JS, Wilborn J. Effects of combined 405-nm and 880-nm light on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in vitro. Photomed Laser Surg. 24: 680–683, 2006.
53. Haddad MC, Bruschi LC, Martins EAP. Influência do açúcar no processo de cicatrização de incisões cirúrgicas infectadas. Rev latino-am enfermagem. 8(1): 57-65, 2000.
54. Calin, MA, Ion RM. Optical method for monitoring of photodynamic inactivation of bacteria. J Biol Phys. 37(1):107–116, 2011.
55. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 436-50, 2004.
56. Luksiene Z. Photosensitization for food safety. Chemine Technologija. 4: 62 –65, 2009.

57. Luksiene Z, Brovko L. Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety. *Food Eng Rev.* 5: 185–199, 2013.
58. Sejas LM, Silbert S, Reis AO, Sader HS. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 39(1): 27-35, 2003.
59. BrCAST - Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos Versão 6.0 (Janeiro de 2017) <http://brcast.org.br/>
60. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
61. Silva DCG, Plapler H, Costa MM, Silva SRG, Sá MCA, Silva BSL. Low level laser therapy (AlGaInP) applied at 5J/cm² reduces the proliferation of *Staphylococcus aureus* MRSA in infected wounds and intact skin of rats. *An Bras Dermatol.* 88(1): 50-5, 2013.
62. Barboza LL, Campos VMA, Magalhães LAG, Paoli F, Fonseca AS. Low-intensity red and infrared laser effects at high fluences on *Escherichia coli* cultures. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 48(10): 945–952, 2015.
63. Ranjbar R, Takhtfooladi MA. The effects of photobiomodulation therapy on *Staphylococcus aureus* infected surgical wounds in diabetic rats. A microbiological, histopathological, and biomechanical study. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 31 (8):498-504, 2016. doi.org/10.1590/S0102-865020160080000001
64. Phillips I. Past and current use of clindamycin and lincomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 7 Suppl. A: 11-18, 1981.
65. Leigh DA. Antibacterial activity and pharmacokinetics of clindamycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 7, Suppl. A: 3-9, 1981.
66. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis.* 52(3): e18-55, Feb, 2011. doi: 10.1093/cid/ciq146.
67. Woodford N. Epidemiology of genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in entero-cocci. *Microb. Drug Resist.* 7: 229–236, 2001.
68. Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42: S25–S34, 2006.
69. Jakovac S, Bojic´ EF, Ibris´imovic MA, Tutis B, Ostojic´ M, Hukic´ M. Characteristics of Vancomycin-Resistant Enterococcus Strains in the West Balkans: A First Report. *Microbial Drug Resistance.* 00: 00, 2016. 10.1089/mdr.2015.0355
70. Chang S, Sievert DM, Hageman JC. Infection with vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N. Engl. J. Med.* 348:1342–1347, 2003.
71. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Tenover FC. Ge-netic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science.* 5650: 1569–1571, 2003.

72. Yang J, Yuan Y, Tang M, Liu L, Yang K, Liu J. Phenotypic and genetic characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Microb Pathog*. 128: 131-135, Mar, 2019. doi: 10.1016/j.micpath.2018.12.046.
73. Beganovic M, Luther MK, Rice LB, Arias CA, Rybak MJ, LaPlante KL. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and endocarditis. *Clin. Infectar. Dis*. 67(2): 303-309, Jul, 2018.
74. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. 130 (5): 797-810, Sept, 2007. doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049
75. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents*. 33: 264–265, 2009.
76. Chaves BJ, Tadi P. Gentamicin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jul, 2020.
77. Peechakara BV, Gupta M. Ampicillin/Sulbactam. StatPearls [Internet], 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526117/>
78. González C, García A, Urrea R, del Solar E, Bello H, Zemelman R. A combination of ampicillin and sulbactam: effect on aerobic and anaerobic gram-negative bacteria. *Rev Med Chil*. 118(5):548-54. May; 1990.
79. Shaikh S, Jamale F, Shakil S, Mohd S, Rizvi D, Kamal MA. Risk factors for acquisition of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in North-Indian hospitals. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22(1): 37-41, Jan, 2015.
80. Tipper DJ. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol. Ther*. 27(1): 1-35, 1985.
81. Ghooi RB, Thatte SM. Inhibition of cell wall synthesis--is this the mechanism of action of penicillins? *Med. Hypotheses*. 44(2): 127-31, Feb, 1995.
82. Braga PC, Ricci D. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to Cefodizime Dow. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42(1): 1–6, 1998.
83. Perry CC et al., Atomic force microscopy study of the antimicrobial activity of aqueous garlic versus ampicillin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Sci. Food Agric*. 89 (6): 958–964, 2009. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3538>
84. Laskowski D et al. Effect of ampicillin on adhesive properties of bacteria examined by atomic force microscopy. *Micron*. 112: 84–90, May, 2018. doi.org/10.1016/j.micron.2018.05.005
85. Yang L. et al. Atomic force microscopy study of different effects of natural and semisynthetic β -lactam on the cell envelope of *Escherichia coli*. *Anal. Chem*. 78(20): 7341–7345, 2006. doi.org/10.1021/ac0604890
86. Uzoechi SC, Abu-Lail NI. Changes in cellular elasticities and conformational properties of bacterial surface biopolymers of multidrug-resistant *Escherichia coli* (MDR-

E. coli) strains in response to ampicillin. *The Cell Surface* 5: 100019, 2019. doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100019

87. Gomis-Font MA, Cabot G, Sánchez-Diener I, Fraile-Ribot PA, Juan C, Moya B, Zamorano L, Oliver A. In vitro dynamics and mechanisms of resistance development to imipenem and imipenem/relebactam in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 75 (9): 2508-2515, Sept, 2020. doi: 10.1093 / jac / dkaa206.

88. Picón E, Pascual Á; Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Red Española de Investigación en Patología Infecciosa/Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria Group. β -lactam/ β -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis.* 54: 167-74, 2012. doi: 10.1093/cid/cir790

89. Retamara P, López-Cerero L, Muniaina MA, Pascuala A, Rodríguez-Baño J, the ESBL-REIPI/GEIH Group. Impact of the MIC of piperacillin-tazobactam on the outcome of patients with bacteremia due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 3402-4, 2013. doi: 10.1128/AAC.00135-13. Epub 2013 Apr 22.

90. Canton R, Coque T. The CTX-M betalactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 9: 466-75, 2006.

91. Delgado-Valverde M, Sojo-Dorado J, Pascual A, Rodríguez-Baño J. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Ther Adv Infect Dis.* 1(2): 49-69, 2013.

92. Pollock MR. Drug resistance and mechanisms for its development. *Brit. Med. Bull.* 16:16-22, 1960.

93. McKenzie K, Maclean M, Grant MH, Ramakrishnan P, MacGregor SJ, Anderson JG. The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling. *Microbiology.* 162: 1680–1688, 2016. DOI 10.1099/mic.0.000350

94. Kim TK, Kim T, Cha Y, Zoh KD. Energy-efficient erythromycin degradation using UV-LED (275 nm)/chlorine process: Radical contribution, transformation products, and toxicity evaluation. *Water Research.* 185: 116159, Jul, 2020. doi.org/10.1016/j.watres.2020.116159

95. Dai T, Gupta A, Murray CK, Vrahas MS, Tegos GP, Hamblin MR. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? *Drug Resist Updat.* 15: 223–236, 2012.

96. Masson-Meyers DS, Bumah VV, Biener, G. *et al.* The relative antimicrobial effect of blue 405 nm LED and blue 405 nm laser on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. *Lasers Med Sci* 30, 2265–2271 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1799-1>.

97. Biener G, Masson-Meyers DS, Bumah VV, Hussey G, Stoneman MR, Enwemeka CS, Raicu V. Blue/violet laser inactivates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by altering its transmembrane potential. *J Photochem Photobiol B.* 170:118-124, May, 2017.

98. Losi A. Flavin-based Blue-Light photosensors: a photobiophysics update. *Photochem Photobiol.* 83(6): 1283-300, Nov-Dec, 2007.

99. Vandersee S, Beyer M, Lademann J, Darvin ME. Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals. *Oxid Med Cell Longev*. Article ID 579675, 7 pages, 2015. doi.org/10.1155/2015/579675
100. Yoshida A, Shiotsu-Ogura Y, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Toyama T, Yoshino F. Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue. *J Photochem Photobiol B*. 151: 48-53, Oct, 2015.
101. Del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Osborne NN. Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. *Neurochem Res*. 41(9): 2324-35, Sep, 2016.
102. Ramakrishnan P, Maclean M, MacGregor SJ, Anderson JG, Grant MH. Cytotoxic responses to 405nm light exposure in mammalian and bacterial cells: Involvement of reactive oxygen species. *Toxicol In Vitro*. 33: 54-62, Jun, 2016.
103. Guffey JS, Payne WC, Greenway J, Buchanan B, Dodson CM, Lancaster K. Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* by visible and near-IR radiation. *Eur J Acad Essays*. 1:1–5, 2014.
104. Bumah VV, Masson-Meyers DS, Cashin SE, Enwemeka CS. Wavelength and Bacterial Density Influence the Bactericidal Effect of Blue Light on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Photomedicine and Laser Surgery*. 31(11): 547-553, Nov 2013.547-553. <http://doi.org/10.1089/pho.2012.3461>.

Anexos

Anexos

Anexo 1- Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Terapia por LED (Light Emitting Diode) em cultura bacteriana associada a antibiótico e em lesão cutânea. Estudo in vitro e in vivo.

Pesquisador: Rinaldo Roberto de Jesus Guirro

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 79415617.4.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.554.371

Apresentação do Projeto:

Outros pesquisadores envolvidos:

1. Roberto Martinez – professor associado do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRPUSP);
2. Jayme Adriano Farina Junior – professor doutor do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP;
3. Luciano Bachmann – professor doutor da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP;
4. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro – professora associada do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, FMRPUSP;
5. Flávia Fernanda de Oliveira Assunção – doutoranda do Programa de Pós-graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional, FMRPUSP.

Projeto de pesquisa a ser desenvolvido junto ao Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor (FMRPUSP). Será desenvolvido em duas frentes – um estudo in vitro e um ensaio clínico randomizado controlado e cego. As hipóteses são de que a terapia com LED em diferentes comprimentos de onda e fluências (a) pode alterar o status de resistente para sensível da *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* a determinados antibióticos, potencializando a sua eficácia e (b) pode favorecer o processo de reepitelização de áreas doadoras de enxerto em

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Apêndices

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Coleta de Material Biológico

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO / USP PPG - REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FUNCIONAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Subprojeto 1

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) do projeto de pesquisa intitulado **“Terapia por LED (*Light Emitting Diode*) em cultura bacteriana e em lesão cutânea associada a antibiótico. Estudos *in vivo* e *in vitro*”**, coordenado pelo Prof. Dr. Rinaldo R. J. Guirro e desenvolvido pela aluna do curso de doutorado Flávia Fernanda de Oliveira Assunção. Este estudo tem por objetivo avaliar a terapia por LED na inativação de bactérias que contaminam a pele. Antes de nos fornecer seu consentimento solicitamos que leia estas informações cuidadosamente. Este documento tem como finalidade informá-lo(a) do que precisa saber com relação ao estudo. É importante que leia e compreenda os procedimentos propostos.

Após sua confirmação em participar do estudo, você concederá que seja realizada uma coleta de material na sua lesão de pele. Esta coleta será rápida e não causará dor, e será realizada no local onde você está internado.

É importante deixar claro que você não terá gastos com a realização desta coleta, como também não receberá qualquer ajuda de custo financeiro ao aceitar ser voluntário(a) do projeto.

Esta coleta do seu material será importante para conhecermos as bactérias que contaminam a pele, e assim pesquisarmos o tratamento com o LED no tratamento das lesões da pele. Seguem abaixo algumas informações gerais:

- A coleta não gera nenhuma sensação ou desconforto ao voluntário. O risco de contaminação será evitado com a utilização de material estéril e descartável a fim de evitarmos danos à sua saúde;
- Você tem garantia que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento quanto aos procedimentos, riscos ou benefícios da pesquisa;
- Em qualquer fase do estudo, você poderá retirar o termo de consentimento e com isso deixar de fazer parte do estudo, sem que isto leve a qualquer penalidade;
- Os pesquisadores asseguram a sua privacidade quanto a sua identidade e aos dados envolvidos com o estudo, os quais serão utilizados exclusivamente para fins de estudo;
- O local da coleta e será no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (UE-HCFMRP/USP) Unidade de Emergência;
- Na eventualidade de qualquer dano, o(a) senhor(a) será indenizado(a) segundo as leis vigentes, e os pesquisadores asseguram o seu tratamento integral sem nenhum custo financeiro;
- Uma cópia do projeto de pesquisa estará a sua disposição para consulta e/ou esclarecimentos de dúvidas no local dos exames.
- Após as assinaturas, você receberá uma cópia de igual teor desse termo de consentimento.

Entendi todas as informações contidas neste documento e concordo em participar dessa pesquisa. Ao mesmo tempo, assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores. Dou pleno direito da utilização desses dados e informações para uso no ensino, pesquisa e divulgação científica.

_____, RG nº _____
Assinatura do(a) voluntário(a)

Coordenador: Prof. Dr. Rinaldo R. J. Guirro
E-mail: rguirro@fmrp.usp.br
Telefone: (16) 3315-4584

Pesquisadora: Ms. Flávia F. O. Assunção
Telefone: (16) 99710-8798

No caso de dúvidas éticas sobre o projeto procurar: Comitê de Ética em Pesquisa FMRP-USP
Telefone: (16) 3602-2228

Nova versão 09/03/2018

Apêndice 2: Demostrativo ATCC – *Staphylococcus aureus*

Grupo de Isolados: SA30/0918-1		*** Alerta aplicado ***	Bancada de Trabalho: COPROCULTURA
Tipo de carta: GP Aparelho de teste: 00001899F72F (16391)			
Tipo de carta: AST-P612 Aparelho de teste: 00001899F72F (16391)			

Informações de Sensibilidade	Carta:	AST-P612	Nº de Lote:	4920389403	Data de Validade:	20/Dez/2018 12:00 CST
	Concluído:	4/Out/2018 21:53 CDT	Estado:	Final	Hora da Análise:	9,25 Horas
Antibiótico	CMI	Interpretação	Antibiótico	CMI	Interpretação	
Teste de screening de cefoxitina	NEG.	-	Linezolid	2	S	
Benzilpenicilina	>= 0,5	R	Daptomicina	0,25	S	
Ampicilina			Teicoplanina	<= 0,5	S	
Oxacilina	0,5	S	Vancomicina	1	S	
Gentamicina Alto Nível (Sinergia)			Tetraciclina	<= 1	S	
Gentamicina	<= 0,5	S	Nitrofurantoína	<= 16	S	
Ciprofloxacina	<= 0,5	S	Ácido Fusídico	<= 0,5	S	
Resistência induzida a clindamicina	POS.	+	Mupirocina	<= 2		
Eritromicina	>= 8	R	Rifampicina	<= 0,5	S	
Clindamicina	<= 0,25	*R	Trimetoprim/Sulfametoxazol	<= 10	S	

+ = Antibiótico Deduzido * = Modificação do AES ** = Modificado pelo Utilizador

Resultados AES:		Última 22/Jun/2016 Modificação: 18:25 CDT	Conjunto de Parâmetros:	HCRP - Copy of Global+ Natural Resistance
Nível de Confiança:	Consistente			
Fenótipos assinalados para revisão:	MUPIROCINA	RESISTÊNCIA DE BAIXO NÍVEL		
	MACRÓLIDOS/LINCOSAMIDAS/ES TREPTOGRAMINAS	MLSB INDUTÍVEL		

Apêndice 3: Demonstrativo ATCC – *Escherichia coli*

Hosp. das Clínicas - Ribeirão Preto		
Cliente bioMérieux: 609 Nº do Sistema:	Relatório do Laboratório	Impresso a 8/Out/2018 12:57 CDT Impresso por: labsuper
Nome do Doente: <input type="text"/> Grupo de Isolados: <input type="text"/>		ID do Doente: Bancada de Trabalho: COPRO CULTURA
Tipo de carta: AST-N239 Aparelho de teste: 00001899F72F (16391)		

Quantificação de microrganismos:
 Microrganismo Seleccionado: *Escherichia coli*

Comentários:	

Informações da Identificação	
Microrganismo Seleccionado	<i>Escherichia coli</i>
Introduzido:	4/Out/2018 12:49 CDT Por: labsuper
Mensagem da Análise:	

Informações de Sensibilidade	Carta: AST-N239		Nº de Lote: 6390555103		Data de Validade: 4/Jun/2019 13:00 CDT
	Concluído: 4/Out/2018 20:52 CDT		Estado: Final		Hora da Análise: 8,00 Horas
Antibiótico	CMI	Interpretação	Antibiótico	CMI	Interpretação
BLSE	NEG.	-	Cefepima	<= 1	S
Ampicilina	>= 32	R	Ertapenem	<= 0,5	S
Ampicilina/sulbactam	>= 32	R	Imipenem	<= 0,25	S
Piperacilina/Tazobactam	<= 4	S	Meropenem	<= 0,25	S
Cefuroxima	4	S	Amikacina	<= 2	S
Cefuroxima Axetil	4	S	Gentamicina	<= 1	S
Cefoxitina	<= 4	S	Ciprofloxacina	<= 0,25	S
Ceftazidima	<= 1	S	Tigeciclina	<= 0,5	S
Ceftriaxona	<= 1	S	Colistina	<= 0,5	S

↔ Antibiótico Deduzido * = Modificação do AES ** = Modificado pelo Utilizador

Resultados AES:	Última: 22/Jun/2016 18:25 Modificação: CDT	Conjunto de Parâmetros: HCRP - Copy of Global+Natural Resistance
Nível de Confiança:	Consistente	
Fenótipos assinalados para revisão:	BETA-LACTÁMICOS FASE RESISTENTE AO INIBIDOR (IRT OU OXA)	

Apêndice 4: Demonstrativo ATCC – *Pseudomonas aeruginosa*

Hosp. das Clínicas - Ribeirão Preto

Cliente bioMérieux: 609

Nº do Sistema:

Relatório do Laboratório

Impresso a 8/Out/2018 12:52 CDT

Impresso por: labsuper

Nome do Doente:

Grupo de Isolados: PA40/0918-1

ID do Doente:

Bancada de Trabalho: COPROCULTURA

Tipo de carta: AST-N239 Aparelho de teste: 00001899F72F (16391)

Quantificação de microrganismos:

Microrganismo Seleccionado: *Pseudomonas aeruginosa*

Comentários:	

Informações da Identificação	
Microrganismo Seleccionado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Introduzido: 5/Out/2018 12:38 CDT Por: labsuper
Mensagens da Análise:	
O(s) Antibiótico(s) seguinte(s) não estão pedidos: BLSE,	

Informações de Sensibilidade	Carta: AST-N239		Nº de Lote: 6390555103		Data de Validade: 4/Jun/2019 13:00 CDT
	Concluído: 5/Out/2018 22:22 CDT		Estado: Final		Hora da Análise: 9,75 Horas
Antibiótico	CMI	Interpretação	Antibiótico	CMI	Interpretação
BLSE			Cefepima	<= 1	S
Ampicilina	<= 2	S	Ertapenem		
Ampicilina/sulbactam	<= 2	S	Imipenem	0,5	S
Piperacilina/Tazobactam	<= 4	S	Meropenem	<= 0,25	S
Cefuroxima	<= 1	S	Amicacina	<= 2	S
Cefuroxima Axetil	<= 1	S	Gentamicina	<= 1	S
Cefoxitina	<= 4	S	Ciprofloxacina	<= 0,25	S
Ceftazidima	4	S	Tigeciclina	<= 0,5	S
Ceftriaxona	2	S	Colistina	>= 16	R

+ = Antibiótico Deduzido * = Modificação do AES ** = Modificado pelo Utilizador

Apêndice 5: Demostrativo C1 – *Staphylococcus aureus*

HC - Ribeiro Preto

bioMérieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Oct 16, 2019 13:25 CDT
Printed by: Denissani

Patient:
Isolate:

Patient ID:
Bench: Pesquisa Clinica

Card Type: GP Bar Code: 2421096403245170 Testing Instrument: 0000181439B1 (16095)
Card Type: AST-P637 Bar Code: 7371116403310367 Testing Instrument: 0000181439B1 (16095)
Setup Technologist: Denissani(Denissani)

Bionumber: 050402022662231
Organism Quantity:

Selected Organism: *Staphylococcus aureus*

Susceptibility Information	Card: AST-P637		Lot Number: 7371116403		Expires: Dec 16, 2020 12:00 CST	
	Completed: Oct 15, 2019 23:59 CDT		Status: Final		Analysis Time: 9.45 hours	
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation	
Cefoxitin Screen	POS	+	Erythromycin	>= 8	R	
Benzylpenicillin	>= 0.5	R	Clindamycin	>= 4	R	
Ampicillin			Linezolid	2	S	
Oxacillin	>= 4	R	Daptomycin	1	S	
Ceftaroline	0.5	S	Teicoplanin	<= 0.5	S	
Gentamicin High Level (synergy)			Vancomycin	<= 0.5	S	
Streptomycin High Level (synergy)			Tigecycline	<= 0.12	S	
Gentamicin	<= 0.5	S	Nitrofurantoin	<= 16	S	
Levofloxacin	>= 8	R	Rifampicin	<= 0.03	S	
Inducible Clindamycin Resistance	NEG	-	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<= 10	S	

*= Deduced drug **= AES modified ***= User modified

Apêndice 6: Demonstrativo C2 – *Staphylococcus aureus*

HC - Ribeiro Preto

bioMérieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Oct 16, 2019 13:26 CDT
Printed by: Denissani

Patient
Isolate:

Patient ID:
Bench: Pesquisa Clínica

Card Type: GP Bar Code: 2421096403245147 Testing Instrument: 0000181439B1 (16095)
Card Type: AST-P637 Bar Code: 7371116403310374 Testing Instrument: 0000181439B1 (16095)
Setup Technologist: Denissani(Denissani)

Bionumber: 071422162763231
Organism Quantity:

Selected Organism: *Staphylococcus aureus*

Susceptibility Information	Card: AST-P637		Lot Number: 7371116403		Expires: Dec 16, 2020 12:00 CST
	Completed: Oct 16, 2019 08:20 CDT		Status: Final		Analysis Time: 17.97 hours
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Cefoxitin Screen	POS	+	Erythromycin	>= 8	R
Benzylpenicillin	>= 0.5	R	Clindamycin	>= 4	R
Ampicillin			Linezolid	2	S
Oxacillin	>= 4	R	Daptomycin	1	S
Ceftaroline	0.5	S	Teicoplanin	<= 0.5*	*R
Gentamicin High Level (synergy)			Vancomycin	>= 32	R
Streptomycin High Level (synergy)			Tigecycline	<= 0.12	S
Gentamicin	<= 0.5	S	Nitrofurantoin	<= 16	S
Levofloxacin	>= 8	R	Rifampicin	>= 4	R
Inducible Clindamycin Resistance	NEG	-	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<= 10	S

*= Deduced drug **= AES modified ***= User modified

Apêndice 7. Demonstrativo C3 – *Pseudomonas aeruginosa*

Accession Report (Default)	
Nome Completo, FN: <input type="text"/>	Data de Nascimento: <input type="text"/>
Registro do Paciente: <input type="text"/>	Sexo: M
Numero de Registro: <input type="text"/>	Admitting Physician: <input type="text"/>
Admission Date: <input type="text"/>	Nursing Unit: <input type="text"/>
	Specimen Site: <input type="text"/>
	Clinica: CIRURGIA PLASTICA
Data de Coleta: 22/02/2020 12:49	Data de Recebimento: 22/02/2020 12:49
Numero Cartao: 3309/0220	Teste Solicitado: Cultura Geral
Smear Observation: <input type="text"/>	

Isolate Number: 1 *Pseudomonas aeruginosa* <pseaer>

	1 pseaer		
	MIC	Diam.	Cat.
Amikacin	>=64		R
Cefepime	>=64		R
Ceftazidime	16		R
Ciprofloxacin	>=4		R
Gentamicin	>=16		R
Imipenem	1		S
Meropenem	1		S
Piperacillin/Tazobactam	>=128		R

*= Deduced, **= Manually