



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

RAUHAN GOMES DE QUEIROZ

Suscetibilidade de *Acinetobacter baumannii* multidroga-resistente à Terapia Fotodinâmica  
Antimicrobiana e à Ozonioterapia

FORTALEZA

2023

RAUHAN GOMES DE QUEIROZ

Suscetibilidade de *Acinetobacter baumannii* multidroga-resistente à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e à Ozonioterapia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos.

FORTALEZA  
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- Q47s Queiroz, Rauhan Gomes de.  
Suscetibilidade de *Acinetobacter baumannii* multidroga-resistente à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e à Ozonioterapia / Rauhan Gomes de Queiroz. – 2023.  
61 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Ma. Iriana Carla Junqueira Zanin.
1. Infecções nosocomiais. 2. *Acinetobacter baumannii*. 3. Ozonioterapia. I. Título.
- CDD 617.6
-

À Deus, nosso Senhor.  
À minha família, que desde o início desse sonho  
foi alicerce e apoio.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, por meio do seu Magnífico Reitor Prof. José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque e do vice-reitor Prof. José Glauco Lobo Filho.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, na pessoa de sua diretora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage e vice-diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Karina Bezerra Pinheiro.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Federal do Ceará, Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia e seu vice-coordenador Prof. Dr. Fabio Wildson Gurgel Costa.

À Coordenadora do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará Fortaleza, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thyciana Rodrigues Ribeiro e seu vice-coordenador Prof. Dr. Romulo Rocha Regis.

À Coordenadora do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará Sobral, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Kelly de Sousa Santiago Barbosa e sua vice-coordenadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracema Matos de Melo.

Aos funcionários da coordenação do PPGO, Joana Karla de Assis Pinheiro e Rafael Maia Reis, pela dedicação e disponibilidade em ajudar no que for preciso.

A todos os funcionários e servidores do Curso de Odontologia da UFC Fortaleza e Sobral, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos técnicos de laboratório de pesquisa de Odontologia da UFC Sobral e do LAMP (Laboratório de Microbiologia e Parasitologia).

À Pesquisadora Izabelly Linhares Ponte Brito e ao Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa por terem cedido as amostras de isolados bacterianos, meu muito obrigado.

À banca, composta pelos professores Dr. Francisco César Barroso Barbosa e Dr<sup>a</sup>. Ramille Araújo Lima por terem aceitado o convite, pelo tempo dedicado e pelas considerações.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente à Deus, o Criador de todas as coisas, Ele que sempre foi tão maravilhoso em minha vida, me mostrando sempre que tudo era possível, mesmo com as dificuldades e barreiras.

Aos meus pais, a minha mãe Francisca Gomes, que durante toda minha vida foi meu exemplo de pessoa, determinada, trabalhadora, dona de casa, mãe, conselheira, paciente, acolhedora. Mãe muito obrigado por me ajudar a construir e realizar mais um sonho, sem a senhora sei que nada disso seria possível. Meu pai Roberto Lustosa, agradeço por sempre acreditar em mim, por ser um pai presente sempre que possível, pelos conselhos e ensinamentos.

Aos meus irmãos, Rafaelly e Rayff que sempre me ajudam, são meus companheiros e amigos, sei que nossa ligação é forte e que somos sustento um para o outro sempre. Obrigado por estarem realizando mais um sonho junto comigo.

Aos meus familiares, agradeço a todos vocês que de perto ou de longe estão torcendo por mim e acreditaram sempre que seria possível, muito obrigado por mandarem energias positivas.

Aos meus amigos, Paraibanos e Cearenses que estiveram juntos comigo acreditando na realização desse sonho e de mais uma conquista na minha vida pessoal e profissional.

À minha querida Orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos, por todos os ensinamentos, apoio, conhecimento transmitido, paciência, amizade. Foram momentos enriquecedores ao lado da senhora.

Ao professor Dr. Francisco César Barroso Barbosa por ter cedido as amostras bacterianas para o desenvolvimento do estudo, e por todos os ensinamentos transmitidos.

À Professora Dr<sup>ª</sup>. Poliana Lima Bastos pelo apoio e auxílio na pesquisa e por ceder o equipamento para realização da Ozonioterapia em nosso estudo.

Às amigas de laboratório Maria Tayara Marques de Freitas e Hellén Súzany Freire Silva, por todo apoio, ensinamento e ajuda em vários momentos durante esses anos de mestrado.

Aos amigos do grupo de orientandos Pedro Diniz Rebouças e Jessica Rodrigues Mendes Carneiro, pelo apoio e toda ajuda.

Agradeço em especial a todos os profissionais envolvidos no funcionamento da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará dos *campi* de Fortaleza e Sobral, aos auxiliares de serviços gerais, seguranças, porteiros, diretoria, coordenação, técnicos de laboratórios, auxiliares e professores.

Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade (Albert Einstein).

## RESUMO

Ambientes com risco de contaminação biológica, como é o caso da maioria dos hospitais, são favoráveis a infecções hospitalares. Os números de infecções hospitalares têm crescido em todo o mundo, principalmente associadas a microrganismos (MO) multidroga-resistentes, representando um problema de saúde pública por aumentar as taxas de mortalidade, morbidade, o período de permanência dos pacientes no hospital e os gastos do tratamento. O desenvolvimento de terapias antimicrobianas alternativas para o tratamento desses MO se destaca pela necessidade de reduzir os problemas e agravos à saúde. Nesse sentido, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) e a Ozonioterapia (OZ) surgem como tratamentos alternativos e/ou coadjuvantes ao uso dos antibióticos convencionais. O estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade de uma cepa de *A. baumannii* multidroga-resistente isolada de um paciente na unidade de terapia intensiva do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Sobral – CE à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e à Ozonioterapia. O azul de orto-toluidina preparado com água destilada ou com água ozonizada foi utilizado como sensibilizador e a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima desses sensibilizadores sob o isolado clínico de *A. baumannii* foi inicialmente testado. Adicionalmente, um modelo de formação de biofilme com 24h, 72h e 120h sobre discos de PVC estéril, com 6mm de diâmetro, foi utilizado. Foram testados grupos tratados apenas com a luz (S-L+), apenas com o corante (S+L-) e submetidos a TFA (S+L+). Esses mesmos grupos foram testados com o sensibilizador preparado com água ozonizada, a saber apenas com a luz (S-L+ OZ), apenas com o corante (S+L- OZ) e submetidos a TFA (S+L+ OZ). O tempo de irradiação foi de 3 minutos com densidade de energia de  $71 \text{ Jcm}^{-2}$ . Foram realizadas três repetições para cada experimento. Os resultados demonstraram que biofilmes de *A. baumannii* com 24h, 72h e 120h de formação foram susceptíveis a TFA e a TFA + OZ ( $p < 0,05$ ), sendo que o grupo de TFA sem associação com a OZ foi o que apresentou os melhores resultados. Conclui-se que a TFA isolada ou associada a OZ apresentam efeito inibitório em biofilmes de *A. baumannii* multidroga-resistente.

**Palavras-chave:** Infecções nosocomiais; *Acinetobacter baumannii*; Ozonioterapia; Terapia Fotodinâmica.



## ABSTRACT

Environments with a risk of biological infection, as is the case in most hospitals, are considered hospitable. The numbers of hospitalized people have grown all over the world, mainly associated with multidrug-resistant microorganisms (OM), representing a public health problem by increasing mortality rates, morbidity, the length of stay of patients in the hospital and treatment costs. The development of alternative antimicrobial therapies for the treatment of these OM is highlighted by the need to reduce problems and health problems. In this sense, Antimicrobial Photodynamic Therapy (APT) and Ozone Therapy (OT) appear as alternative and/or adjuvant treatments to the use of conventional antibiotics. The study aimed to evaluate the susceptibility of *A. baumannii* strains multiresistant to pediatric drugs of a patient in the intensive care unit of Hospital Santa Casa de Misericórdia of Sobral to antimicrobial photodynamic therapy and ozone therapy. Ortho-toluidine blue prepared with distilled water or ozonized water was used as a minimal sensitizer and the inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of these sensitizers under the clinical isolate of *A. baumannii* was initially tested. Additionally, a model of biofilm formation with 24h, 72h and 120h of formation on sterile PVC disks, with 6mm in diameter, was used. Groups treated with light only (S-L+), dye only (S+L-) and TFA confirmed (S+L+) were tested. These same groups were tested with the sensitizer prepared with ozonated water, namely with light only (S-L+OZ), with the dye only (S+L-OZ) and TFA expressed (S+L+OZ). The irradiation time was 3 minutes. Three replicates were performed for each experiment. The results confirmed that *A. baumannii* biofilms with 24h, 72h and 120h of formation were susceptible to TFA and TFA + OZ ( $p < 0.05$ ), and the TFA group without association with OZ was the one that presented the better results. It is concluded that TFA instructed or associated with OZ has an inhibitory effect on multidrug-resistant *A. baumannii* biofilms.

**Keywords:** Nosocomial Infections; *Acinetobacter baumannii*; Ozonotherapy; Photodynamic Therapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Microrganismos multidrogra-resistentes (CDC, 2019) .....	19
Quadro 2 – Grupos de tratamento nos discos de PVC .....	39
Figura 1 – Demonstração de movimento por espasmos .....	25
Figura 2 – Demonstração de movimento de superfície através do complexo de adesão ....	25
Figura 3 – Gerador de Ozônio e Coluna de vidro .....	34
Figura 4 – Equipamento para Terapia Fotodinâmica.....	35
Figura 5 – Placa de 96 poços para microdiluição em caldo .....	37
Figura 6 – Disco de PVC .....	38
Figura 7 – Placa de 24 poços .....	40
Gráfico 1 – Análise da susceptibilidade de biofilmes de <i>A. baumannii</i> com 24h .....	44
Gráfico 2 – Análise da susceptibilidade de biofilmes de <i>A. baumannii</i> com 72h .....	45
Gráfico 3 – Análise da susceptibilidade de biofilmes de <i>A. baumannii</i> com 120h .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHX	Clorexidina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRE	<i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a carbapenênicos
DAP	1,3-diaminopropano
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
FS	Fotossensibilizador
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
LAMP	Laboratório de Microbiologia e Parasitologia
LOS	Lipo-oligosacarídeo.
MDR	Multidroga resistência
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NPs	Produtos naturais microbianos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinas
OZ	Ozonioterapia
TB	Tuberculose resistente a medicamentos
TF	Terapia Fotodinâmica
TFA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
UFC	Universidade Federal do Ceará
Ufc	Unidades formadoras de colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
g	Gramas
L	Litro
mL	Mililitro
h	Horas
°C	Grau Celsius
mg	Miligrama
μL	Microlitro
®	Marca registrada
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
p	Significância estatística
<	Menor que
≤	Menor ou igual
μg	Micrograma
±	Desvio padrão

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Resistência a antimicrobianos.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.1 <i>Mecanismos de resistência à dessecação, à desinfecção e ao estresse oxidativo</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2 <i>Formação e manutenção do biofilme</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.3 <i>Motilidade</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Ozonioterapia.....</b>	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>30</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Desenho do estudo.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Aspectos éticos.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Locais de realização do estudo.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Coleta de dados.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5 Perfil de resistência da amostra testada.....</b>	<b>32</b>
<b>4.6 Reativação do isolado clínico bacteriano.....</b>	<b>32</b>
<b>4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana em biofilmes em diferentes fases de crescimento.....</b>	<b>33</b>
<b>4.7.1 <i>Preparo do Fotossensibilizador</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>4.7.2 <i>Preparo da água ozonizada</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>4.7.3 <i>Fonte de luz</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>4.7.4 <i>Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>4.8 Avaliação da atividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Ozonioterapia na inibição de <i>A. baumannii</i> em discos de tubo endotraqueal.....</b>	<b>38</b>
<b>4.8.1 <i>Preparo dos discos</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>4.8.2 <i>Grupos experimentais</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.8.3 <i>Crescimento do biofilme</i>.....</b>	<b>39</b>

4.8.4 Tratamento dos biofilmes/discos.....	40
4.8.5 Análise microbiológica do biofilme formado.....	41
4.8.6 Determinação do peso seco do biofilme.....	41
4.9 Análise estatística dos dados.....	42
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – <i>A. baumannii</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – Ozonioterapia.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ambientes com risco de contaminação biológica, como é o caso da maioria dos hospitais, são favoráveis a infecções hospitalares por contaminação cruzada, atualmente denominada como Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde – IRAS. Estas podem ocorrer quando um paciente, visitante ou profissional, transporta e/ou transfere microrganismos de fora para dentro dos hospitais e vice-versa ou ainda através do ar e da água (BLOT *et al.*, 2022).

Os números de IRAS têm crescido em todo o mundo, principalmente associadas a microrganismos multidroga-resistentes (KIARI; MEDDAH; MEDDAH, 2018), devido ao uso indiscriminado de antibióticos e a capacidade que as bactérias possuem de transmitir seu material genético (BORAL *et al.*, 2019) representando um problema de saúde pública, por aumentar as taxas de mortalidade, morbidade, o período de permanência dos pacientes no hospital e os gastos do tratamento (PROTANO *et al.*, 2019). A resistência de bactérias aos antibióticos e outras drogas antimicrobianas é um fenômeno natural e de pressão seletiva, mas que devido ao uso indiscriminado e recorrente de antibióticos, tornou-se um problema de saúde pública (BLOT *et al.*, 2022).

Dentre os mecanismos de resistência, destacam-se a reduzida permeabilidade da membrana externa, perda de porinas, alteração nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão de bombas de efluxo e produção de  $\beta$ -lactamase. No entanto, o mecanismo que mais contribui para a rápida disseminação de cepas multirresistentes dentro de ambientes hospitalares é a aquisição de genes de resistência e produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, as quais se propagam principalmente por plasmídeos, transposons ou integrons, e do elemento de inserção ISAbal1 localizado entre os genes de resistência como *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub> que vem sendo associados a um aumento na resistência aos carbapenêmicos (HAMIDIAN; NIGRO, 2019; BRTIO *et al.*, 2021).

O uso generalizado de antimicrobianos de amplo espectro tem desempenhado um papel importante no aparecimento de carbapenemases de classe D com capacidade de hidrolizar  $\beta$ -lactâmicos que tem sido amplamente identificadas em *Acinetobacter baumannii*. Recentemente, o gene que codifica essa enzima foi identificado em plasmídeos, o que permite que ele se espalhe entre as várias espécies de *Acinetobacter* (BORAL *et al.*, 2019). A propagação clonal de carbapenemases do tipo OXA tem ocorrido dentro de vários hospitais, enquanto a disseminação inter-hospitalar de *A. baumannii*, que carregam os genes OXA,

também tem sido observada em vários países incluindo o Brasil (TARTARI *et al.*, 2016; BRITO *et al.*, 2018).

Uma gama crescente de patógenos clinicamente relevantes é reconhecida na cavidade oral. Patógenos respiratórios e sistêmicos que foram isolados de pacientes com periodontite crônica e periodontite agressiva incluem *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, juntamente com *A. baumannii* (KIARI; MEDDAH; MEDDAH, 2018). Além disso, *A. baumannii* foi identificado com uma prevalência significativamente maior em pacientes com periodontite crônica ou agressiva em comparação com indivíduos saudáveis ou pacientes com gengivite (PRIYADHARSINI; GIRIJA; PARAMASIVAM, 2018), principalmente em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (KIARI; MEDDAH; MEDDAH, 2018). Embora o papel de *A. baumannii* na doença periodontal ainda não tenha sido investigado, a presença do organismo em conjunto com os patógenos periodontais tradicionais *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* juntamente com *P. aeruginosa* aumenta a probabilidade de periodontite agressiva e as chances de um indivíduo ser refratário ao tratamento periodontal aumentam quando *A. baumannii* está presente (PRIYADHARSINI; GIRIJA; PARAMASIVAM, 2018).

A cavidade oral pode servir de reservatório de microrganismos que causam infecções sistêmicas, como o *A. baumannii*. Este microrganismo bem equipado para sobreviver em comunidades polimicrobianas na forma de biofilmes, especial atenção deve ser dada a presença de *A. baumannii* na cavidade bucal. e sua associação com doenças do trato respiratório inferior devido principalmente a presença dessa bactéria nos aerossóis produzidos durante a ventilação mecânica de pacientes hospitalizados. Além disso, devido à proximidade anatômica, bactérias aerossolizadas podem entrar na corrente sanguínea e causar septicemia (LE *et al.*, 2020).

Portanto, o desenvolvimento de terapias antimicrobianas alternativas que tornem o surgimento de cepas resistentes improvável tem ganhado grande interesse na comunidade científica. Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) e a Ozonioterapia (OZ) surgem como tratamentos alternativos e/ou coadjuvantes ao uso dos antibióticos convencionais devido a sua baixa toxicidade e efeitos colaterais, e efeito antimicrobiano de amplo espectro (YIN *et al.*, 2022).

A TFA consiste na associação de um agente fotossensibilizador e uma luz de comprimento de onda complementar. Durante esse processo, componentes celulares



fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a essa luz, onde ocorre a passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de uma espécie de oxigênio altamente reativo, o oxigênio singlete, esse processo é denominado Fotoproceto Tipo II. Quando o fotossensibilizador interage com outras moléculas como os aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos ocorre o Fotoproceto Tipo I. (POLAT, KANG 2021). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte bacteriana, bem como, danificar componentes essenciais das células (POLAT, KANG 2021).

A utilização de um agente cromóforo que atraia a luz para si e inicie a formação de radicais livres é necessária pois a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, e esse é um mecanismo importante para a eficácia da Terapia Fotodinâmica. Com esse mecanismo as células que não apresentam componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se coradas com fotossensibilizadores exógenos como os derivados das porfirinas, compostos de cloro conjugado ou azul de orto-toluidina (ROLIM *et al.*, 2012). A TFA apresenta algumas vantagens em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais, dentre elas, temos que a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna improvável o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos. Além disso, a TFA mostrou resultados efetivos contra microrganismos que apresentavam resistência a antibióticos e foi observado que repetidas aplicações não resultam em seleção de cepas resistentes (DIAS *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, a Ozonioterapia, uso do gás O<sub>3</sub> como elemento químico, tem se destacado como coadjuvante para controle antimicrobiano em diversas áreas. Devido ao seu alto poder oxidante se destaca como composto útil para desinfecção e/ou esterilização, sem gerar subprodutos tóxicos (SEN; SEN, 2020). Na oxidação de materiais biológicos, o efeito bactericida do O<sub>3</sub> é maior que o do cloro. O O<sub>3</sub> atua sobre bactérias, vírus, helmintos e fungos, por meio da oxidação da parede celular, membrana citoplasmática e demais constituintes da estrutura celular microbiana, ocasionando a sua destruição e resultando em morte celular (MARTINS; KOZUSNYANDREANI; MENDES, 2015; TORMIN *et al.*, 2016; DI MAURO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020).

Nas Ciências Médicas existem diferentes métodos de aplicação de ozônio, seja de forma local, para agir sobre uma condição em uma determinada área, ou sistêmico para corrigir

uma condição que afeta todo o corpo. As aplicações locais incluem injeção de gás de ozônio (subcutâneo, muscular, intra-articular, auricular e intravaginal), utilização de bolsas, óleos ozonizados e água ozonizada. As aplicações sistêmicas incluem a injeção no próprio sangue do paciente (auto-hemoterapia principal), injeção retal com gás (insuflação retal) ou ozonização de 2-3 ml de sangue retirado do paciente no músculo como vacina de ozônio (auto-hemoterapia secundária). Portanto, é necessário planejar a via, dose e concentração adequadas no tratamento (BAS; YULA, 2018).

Existem ainda outros tipos de aplicação da Ozonioterapia, incluindo a utilização de água ozonizada (ZENG; LU, 2018); através da utilização do gás, em ambientes e superfícies de serviços hospitalares (RANGEL *et al.*, 2022), na odontologia (NOGALES *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020; BASTOS *et al.*, 2022; BRASIL, 2022) e no combate à disseminação da COVID-19 (BARBOSA *et al.*, 2021).

Nesse estudo utilizou-se uma cepa de *A. baumannii* multidroga-resistente que carrega o gene de resistência *bla*<sub>OXA-23</sub>, que foi anteriormente isolado de um paciente internado na unidade de terapia intensiva do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Sobral – CE e avaliou-se sua susceptibilidade à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e à Ozonioterapia.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Resistência a antimicrobianos

A resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos pode variar entre países, regiões e de acordo com a origem do microrganismo, que pode ser hospitalar ou comunitária e pode ser um fenômeno genético ou não (SAVOLDI *et al.*, 2019). Os fenômenos genéticos estão relacionados com a existência de genes ou elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) presentes nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos impedindo a ação das drogas sendo conhecido como resistência adquirida (BREIJYEH, JUBEH, KARAMAN, 2020).

O fenômeno não genético é aquela resistência que ocorre de forma natural dentro de uma espécie ou gênero bacteriano, sendo a chamada resistência intrínseca ou natural. Em alguns casos, a resistência natural a um determinado antibacteriano é uma característica indispensável à autodefesa e proteção dos microrganismos produtores de antibióticos, sendo esses produzidos frente à competição com outras bactérias pelo mesmo habitat (BREIJYEH, JUBEH, KARAMAN, 2020).

Há três principais formas estratégicas que os microrganismos podem desenvolver resistência às drogas: 1) produzindo uma enzima que destrua o antimicrobiano; 2) alterando o alvo molecular de ligação do antimicrobiano; 3) evitando a chegada do antimicrobiano ao alvo (através de bombas de efluxo ou permeabilidade de membrana). De forma geral, após o microrganismo encontrar a sua melhor estratégia, os novos genes que conferem resistência, são disseminados entre aqueles de sua espécie e até mesmo para microrganismos de outras espécies, caso o gene esteja localizado dentro de um elemento móvel como o plasmídeo. Em bactérias Gram-negativas o mais comum é uma combinação das estratégias 1 (através da produção de enzimas) e 3 (bomba de efluxo ou permeabilidade de membrana) (OLIVEIRA, 2016).

Alguns fatores contribuem para o surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana, estes incluem a alta incidência de doenças infecciosas; sistemas de saúde e vigilância deficientes; quadros regulatórios inadequados; má prevenção e controle de infecção em estabelecimentos de saúde; capacidades limitadas dos laboratórios de microbiologia; falta de acesso a medicamentos antimicrobianos de qualidade garantida para humanos e animais; condição socioeconômica; acesso inadequado à água, saneamento e higiene; e programas

limitados de manejo antimicrobiano (TALAAT, *et al.*, 2022). Além disso, os medicamentos antimicrobianos estão disponíveis sem receita e a automedicação é uma prática comum na maioria dos países, práticas de prescrição inapropriadas entre os médicos também são comuns (AYUKEKBONG, NTWGWAWA, ATABE, 2017). Os medicamentos antimicrobianos, por vezes, são usados para compensar a falta de infraestrutura básica de saúde pública (AYUKEKBONG, NTWGWAWA, ATABE, 2017).

Outros aspectos envolvidos na resistência aos antimicrobianos estão descritos no conceito “*One Health One World*” que integra aspectos epidemiológicos e moleculares que contribuem para a compreensão da evolução ou parentesco genético da resistência antimicrobiana em patógenos/vetores, hospedeiro (humano/animal) e o ambiente associado em escala global. Os fatores socioeconômicos, como comércio mundial, conflitos, deslocamentos, viagens, migração humana e animal, são importantes impulsionadores da disseminação global da resistência antimicrobiana (ASLAM *et al.*, 2021).

Nesse sentido a resistência antimicrobiana vem sendo discutida e estudada amplamente na comunidade científica, em um relatório publicado no ano de 2013 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2013), trazendo dados sobre a ameaça dos microrganismos multirresistentes nos Estados Unidos, foi possível mensurar a dimensão dos danos à saúde e as dificuldades enfrentadas para combater essas bactérias. Ainda que com dados escassos estimou-se que cerca de 2 milhões de pessoas foram infectadas por esses patógenos e que dessas, 23.000 pessoas vieram à óbito como resultado dessas infecções. Mais tarde, no ano de 2019 esses dados foram atualizados e trouxeram um número de óbitos ainda maior, cerca de 44.000 pessoas (CDC, 2019). Além disso o CDC elaborou uma lista com 18 microrganismos que apresentam resistência antimicrobiana e os dividiu em categorias, demonstradas no quadro a seguir:

Quadro 1 – Microrganismos multidroga-resistentes (CDC, 2019)

Ameaças urgentes	Ameaças graves	Sobre ameaças	Em observação
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>Acinetobacter</i> resistente a carbapenêmicos</li> <li>■ <i>Cândida auris</i> (<i>C. auris</i>)</li> <li>■ <i>Clostridioides difficile</i> (<i>C. difficile</i>)</li> <li>■ <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a carbapenêmicos (CRE)</li> <li>■ <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a medicamentos (<i>N. gonorrhoeae</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>Campylobacter</i> resistente a medicamentos</li> <li>■ <i>Cândida</i> resistente a medicamentos</li> <li>■ <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)</li> <li>■ <i>Enterococos</i> resistentes à vancomicina (VRE)</li> <li>■ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente (<i>P. aeruginosa</i>)</li> <li>■ <i>Salmonella</i> não tifoide resistente a medicamentos</li> <li>■ <i>Salmonella</i> resistente a medicamentos sorotipo Typhi</li> <li>■ <i>Shigella</i> resistente a medicamentos</li> <li>■ <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)</li> <li>■ <i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a medicamentos (<i>S. pneumoniae</i>)</li> <li>■ Tuberculose resistente a medicamentos (TB)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>Streptococcus</i> do grupo A resistente à eritromicina;</li> <li>■ <i>Streptococcus</i> do grupo B resistente à clindamicina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>Aspergillus fumigatus</i> resistente a azol (<i>A. fumigatus</i>)</li> <li>■ <i>Mycoplasma genitalium</i> resistente a medicamentos (<i>M. genitalium</i>)</li> <li>■ <i>Bordetella pertussis</i> resistente a medicamentos (<i>B. pertussis</i>)</li> </ul>

Dentre os microrganismos multirresistentes destacam-se aqueles que apresentam resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, que é uma ampla classe de antibióticos, que inclui os Carbapenens, Penicilinas, Monobactâmicos e as Cefalosporinas, sendo a classe mais utilizada nos dias de hoje em alguns casos. Esta resistência pode estar associada à diminuição da permeabilidade da membrana externa com superexpressão de  $\beta$ -lactamases ou a expressão de carbapenemases (SAVOLDI *et al.*, 2019). A disseminação de resistência aos carbapenêmicos ocorre devido à produção de enzimas carbapenemases. Essas diferentes enzimas estão muito relacionadas com organismos com perfil de resistência a múltiplas drogas, como é o caso da *P. aeruginosa* e *Acinetobacter sp.*, que ao adquirirem uma carbapenemase, podem se tornar vetores de transmissão dessas enzimas a alguns membros da família Enterobacteriaceae (BRITO *et al.*, 2020).

As  $\beta$ -lactamases de classe D têm estrutura baseada em serina e podem ser codificadas por genes localizados em plasmídeos ou no cromossomo bacteriano. São tradicionalmente conhecidas como Oxacilinases (OXA), sendo a *A. baumannii* a principal espécie bacteriana envolvida com a produção dessas enzimas. Algumas dessas enzimas não possuem a capacidade de hidrolisar carbapenêmicos. Já as que possuem esta atividade são principalmente: OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA 27, OXA-58, OXA-153. (HAMIDIAN, NIGRO 2019).

*A. baumannii* pode ser citado como exemplo de microrganismo que possui resistência intrínseca a uma ampla variedade de antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos, e ainda demonstra um grande potencial para a aquisição de novos determinantes de resistência, dessa forma responde rapidamente à pressão seletiva do meio ambiente. A essa espécie de microrganismo são conferidos perfis extensivamente resistentes às drogas, os quais são mediados por uma diversidade de mecanismos de resistência (CALDART, 2020).

## **2.2 *Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo, gram-negativo, não flagelado, catalase positivo, oxidase-negativo e não fermentador, classificado como integrante da família *Moraxellaceae*, da ordem *Gammaproteobacteria* (BRITO *et al.*, 2021) comumente isolada do meio ambiente. Esse patógeno oportunista é responsável por infecções hospitalares e adquiridas na comunidade, infectando predominantemente pacientes que apresentam imunodeficiência em

ambientes hospitalares (WHITEWAY *et al.*, 2022; FELDMAN *et al.*, 2017). Antes considerado um patógeno comum, o *A. baumannii* agora é considerado uma ameaça à saúde pública, isso se deve, principalmente à sua propensão em adquirir resistência a diferentes tipos de drogas, tornando-se conhecido como um microrganismo multirresistente (GIAMMANCO *et al.*, 2017).

As infecções causadas por *A. baumannii* representam 2% de todas as infecções associadas aos cuidados de saúde nos Estados Unidos e Europa (CDC, 2013); no entanto, essas taxas são duas vezes maiores na Ásia e no Oriente Médio (HARDING, HENNON, FELDMAN 2018). Embora as taxas de infecção sejam mais baixas em comparação com outros patógenos Gram-negativas, 45% de todos os isolados são considerados multidroga-resistentes (MDR), com taxas de até 70% na América Latina e no Oriente Médio (GIAMMANCO *et al.*, 2017). Esses dados alarmantes mostram que as taxas são quase quatro vezes maiores do que as observadas para outros patógenos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (GIAMMANCO *et al.*, 2017). Diante disso, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) categorizou *A. baumannii* como uma ameaça séria, levando assim atividades contínuas de monitoramento e prevenção da saúde pública (CDC, 2019). Além disso, a Organização Mundial da Saúde incluiu *A. baumannii* resistente a carbapenem no grupo crítico na lista de bactérias que representam a maior ameaça à saúde humana, priorizando a pesquisa e esforços de desenvolvimento para novos tratamentos antimicrobianos (OMS, 2017).

*A. baumannii* causa uma variedade de infecções nosocomiais e pode ser encontrado em amostras de diferentes locais do corpo. Mais comumente, as infecções por *A. baumannii* se manifestam como pneumonia associada à ventilação mecânica ou infecções da corrente sanguínea, infecções na pele e tecidos moles, em feridas cirúrgicas, bem como em infecções associadas a cateteres e infecções do trato urinário (NGUYEN, JOSHI, 2021). Algo que é comum a cada um desses locais onde são encontradas contaminação por esse patógeno é a injúria de uma dessas estruturas tornando-se porta de entrada de *A. baumannii* diretamente no local da infecção. Infecções adquiridas na comunidade causadas por *A. baumannii* também foram relatadas (BRIGO, YAMAMOTO, MOLIANA, 2022). Os casos de infecções adquiridas na comunidade geralmente só são relatados em pacientes com comorbidades pré-existentes, como alcoolismo, diabetes mellitus ou outras doenças, como câncer e distúrbios pulmonares obstrutivos (CHEN *et al.*, 2018).

Harding, Hennon e Feldman (2018) dedicaram-se a estudar os mecanismos excepcionais e complexos que levaram ao surgimento de multiresistência a drogas por *A.*

*baumannii*, além dos mecanismos de resistência a drogas que já vinham sendo amplamente estudados. Para tanto os pesquisadores apontam características e discutem o perfil de virulência que permitiram que o *A. baumannii* se tornasse persistente em ambientes inóspitos para muitos patógenos bacterianos tais como mecanismos de resistência à desinfecção, à dessecação e ao estresse oxidativo; formação e manutenção do biofilme e motilidade.

### **2.2.1 Mecanismos de resistência à dessecação, à desinfecção e ao estresse oxidativo**

Em ambientes de saúde para limpeza de materiais e superfícies, são adotados protocolos que incluem períodos prolongados de dessecação e de desinfecção, na tentativa de inibir ou levar a morte patógenos que colonizam esses ambientes. *A. baumannii* se adaptou ao estresse causado por esses métodos desenvolvidos, semelhante ao que ocorreu com a resistência a antibióticos (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

A dessecação é um estresse ambiental comum que representa muitos desafios para as células bacterianas (AVERHOFF *et al.*, 2021). A perda de água leva à diminuição da distensão da camada plasmática e da parede celular e a alterações bioquímicas que podem danificar as membranas celulares, e a secagem também pode causar desnaturação de proteínas intracelulares e alterações conformacionais no DNA (CHIANG *et al.*, 2017). A resistência à dessecação em *A. baumannii* é multifatorial e ainda não foi totalmente definida (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018). No entanto, a resistência à dessecação depende da capacidade de *A. baumannii* de manter a viabilidade em condições de limitação hídrica (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

Além da perda de água durante os períodos de dessecação, a dessecação-reidratação pode causar várias lesões no DNA. Para ajudar a prevenir alguns dos danos ao DNA induzidos pela reidratação por dessecação, *A. baumannii* conta com o papel protetor da proteína RecA, que é uma enzima necessária para recombinação homóloga e reparo por recombinação. Além disso, o estresse oxidativo também é induzido em períodos de dessecação. Como resultado, *A. baumannii* aumenta significativamente as proteínas que estão associadas com a desintoxicação reativa de espécies de oxigênio (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

Ainda nos ambientes hospitalares a clorexidina é bastante utilizada como antisséptico para desinfecção de objetos, superfícies e tecidos da pele, esta, por sua vez, é bastante eficaz contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo capaz de danificar e



romper as membranas citoplasmáticas (ZHU, *et al.*, 2019). No entanto a *A. baumannii* demonstrou, em estudos recentes, ser capaz de bombear ativamente clorexidina para fora da célula usando o efluxo de clorexidina (AceI) através de uma proteína, possivelmente promovendo a sobrevivência da bactéria em condições de estresse (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

### **2.2.2 Formação e manutenção do biofilme**

Os biofilmes microbianos, que são comunidades envoltas em uma matriz extracelular e aderidas a uma superfície sólida, são produzidos por muitas, senão todas as bactérias (GEDEFIE *et al.*, 2021). É provável que os biofilmes tenham um papel importante na interação de *A. baumannii* com seu hospedeiro e a formação de biofilme contribui para infecções associadas a dispositivos (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

Populações de *A. baumannii* em infecções de pele e tecidos moles formam biofilmes robustos, ambos dentro da ferida e em curativos oclusivos (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018). *A. baumannii* também forma comunidades de biofilme em grande parte das superfícies abióticas; incluindo equipamentos associados aos cuidados de saúde, como tubos endotraqueais, bem como policarbonato e aço inoxidável. É bem estabelecido na comunidade científica que as bactérias dentro das comunidades de biofilme, incluindo *A. baumannii*, têm maior tolerância a estresses extracelulares e, portanto, maior resistência aos antimicrobianos. Tal como acontece com muitos organismos produtores de biofilme, a superfície de *A. baumannii* apresenta apêndices, adesinas e estruturas superficiais protetoras, como polissacarídeos capsulares, que contribuem de forma significativa para a formação e manutenção de biofilmes (GEDEFIE *et al.*, 2021).

*A. baumannii* também produz proteínas associadas ao biofilme (BapAb), que são secretadas e medeiam a formação de biofilme. Uma proteína específica, a Bap, tem um papel na adesão célula-célula e é necessária para o desenvolvimento de estruturas de ordem superior em materiais clinicamente relevantes como poliestireno e titânio. Algumas cepas de *A. baumannii* também codificam proteínas semelhantes a Bap-like, BLP1 e BLP2, que contribuem coordenadamente para a maturação e formação de biofilme de forma semelhante ao BapAb (GEDEFIE *et al.*, 2021).

Isolados clínicos de *Acinetobacter* incluindo *A. baumannii* e *A. nosocomialis*, secretam abundantemente uma proteína contendo características semelhantes ao RTX-like através do sistema de secreção tipo I, presente em *Pseudomonas putida*, que medeiam desenvolvimento de biofilme. Outros fatores notáveis na *A. baumannii* que podem ser cruciais para formação de biofilme incluem a produção de poli-beta-(1-6)-N-acetilglucosamina (PNAG), que é produzido por muitas espécies Gram-negativas.. Outros fatores que contribuem para formação de biofilme, são polissacarídeos capsulares, e um sistema auto transportador (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

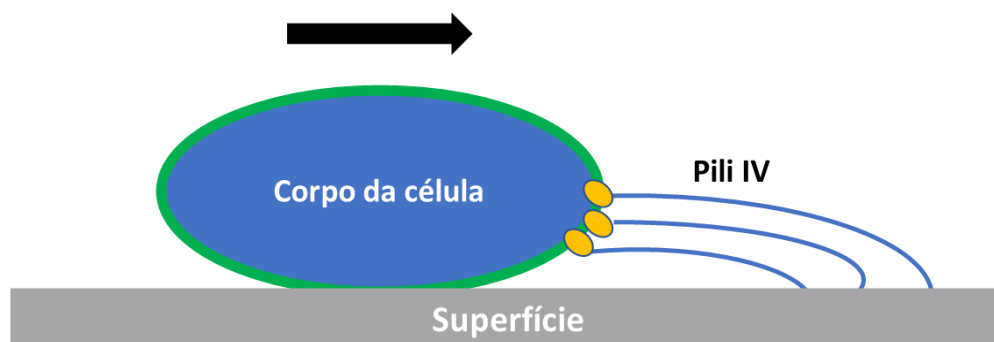
### **2.2.3 Motilidade**

Em diferentes bactérias, a motilidade apresenta relação direta com a capacidade de um microrganismo de causar doença e se tornar mais virulenta como é o caso da *A. baumannii* (CORRAL *et al.*, 2020). Estudos epidemiológicos recentes de isolados clínicos de amostras sanguíneas de *A. baumannii* demonstraram ser mais móveis quando comparados com isolados de escarro, indicando que a motilidade pode fornecer uma vantagem de aptidão a depender do tipo de isolado clínico (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

A motilidade das bactérias é regulada com precisão por um sistema de quimiotaxia que permite que as células detectem substâncias químicas específicas e, em seguida, direciona o movimento para elas ou para longe delas (MEA, YONG, WONG, 2021). Apesar do gênero *Acinetobacter* ser considerado um bastonete imóvel, *A. baumannii* tem se mostrado capaz de realizar duas formas independentes de locomoção bacteriana: motilidade associada à superfície e motilidade por espasmos ou contração (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

A motilidade por espasmos (Figura 1) é uma forma de locomoção bacteriana desenvolvida por muitos gêneros de bactérias (HENRICHSEN, 1972), estando presente em *A. baumannii* e *A. nosocomialis* e depende do funcionamento completo do Pili IV, que são finos e flexíveis filamentos encontrados na superfície de uma ampla gama de bactérias Gram-negativas, realizando movimentos repetidos de extensão e retração para puxar as células bacterianas para frente (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

Figura 1 – Demonstração de movimento por espasmos

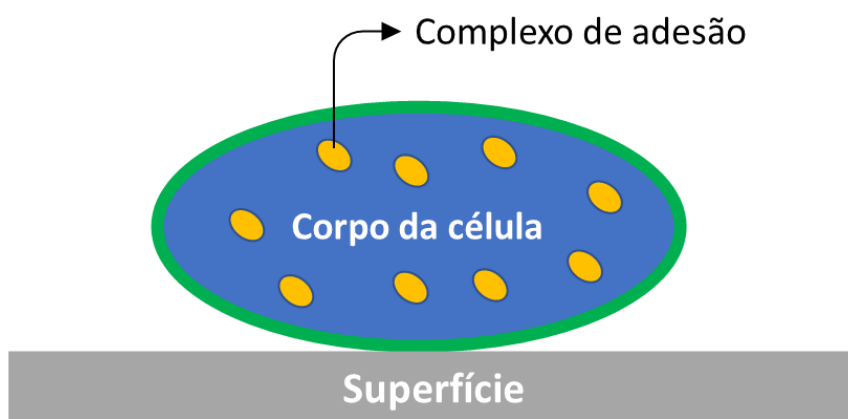


Fonte: adaptado de Santos, 2011.

Movimento de superfície da bactéria que é alimentado pela extensão do Pili, que em seguida anexa à superfície e, posteriormente é recolhido puxando a célula para ficar mais próxima do local de fixação.

Outra forma de motilidade, denominada motilidade de superfície por adesão (Figura 2) ou deslizamento (HENRICHSEN, 1972), também foi observada em isolados clínicos de *A. baumannii* (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

Figura 2 – Demonstração de movimento de superfície através do complexo de adesão



Fonte: adaptado de Santos, 2011.

Movimento de superfície ativa que não necessita de flagelos ou pili e envolve adesão focal complexa.

A motilidade associada à superfície de *A. baumannii* demonstrou depender da síntese de 1,3-diaminopropano (DAP), sensor de superfície e produção de lipo-oligosacarídeo (LOS). Dessa forma, é possível que a síntese de DAP ou um derivado de DAP funcione como

uma molécula de sinalização importante para regular a motilidade associada à superfície via detecção por sensor (HARDING, HENNON, FELDMAN, 2018).

### 2.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

O desenvolvimento de novas terapêuticas para tratar infecções resistentes a drogas, especialmente aquelas causadas por patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*) tem sido prioridade da Organização Mundial da Saúde e uma grande necessidade na atualidade. Terapias alternativas como uso de antibióticos em combinação ou com adjuvantes, bacteriófagos, peptídeos antimicrobianos, nanopartículas e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana tem sido extensivamente estudado. Para combater a crise de resistência aos medicamentos, além de prosperar no desenvolvimento de antibióticos multialvo altamente eficientes e da descoberta de novos produtos naturais microbianos (NPs) (HUTCHINGS *et al.*, 2019), os fotoantimicrobianos parecem ser uma saída instantânea promissora para esta questão particularmente para infecções locais da pele e tecidos moles.

Originalmente descoberta e desenvolvida como uma tecnologia terapêutica anticancerígena relativamente nova, a Terapia Fotodinâmica (TF) evoluiu desde então e agora é usada em muitas tecnologias terapêuticas. Por exemplo, é usado contra vírus, bactérias, fungos e parasitas, no tratamento de doenças neurovasculares, no controle de pragas, e em muitas outras aplicações (SONGCA, ADJEI, 2022). A TFA é um método minimamente invasivo que tem sido relatado como um tratamento alternativo de infecções causadas por vários patógenos tanto na forma de células planctônicas como em biofilmes formados. Além disso, tem se mostrado um promissor efeito antimicrobiano sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e fungos, por apresentar um método com múltiplos alvos enquanto apresenta um baixo efeito contra as células hospedeiras (YOUF, *et al.*, 2021).

Basicamente, a TFA envolve a combinação sinérgica de um fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz visível de comprimento de onda apropriado, a fim de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), o que leva à oxidação de vários componentes celulares e à rápida inativação celular. Os fotossensibilizadores não apresentam toxicidade ou efeitos colaterais e tem como primeiro e principal alvo agregados as estruturas externas, ou seja, à parede celular das bactérias, a membrana celular ou capsídeo e envelope do vírus. Em seguida,

as bactérias são irradiadas com a luz visível, ativando os fotossensibilizadores e fazendo com que sejam produzidas ERO, que são citotóxicas e inativam as bactérias (MARTINS ANTUNES DE MELO, *et al.*, 2021). Esta terapia apresenta algumas vantagens que podem superar os problemas de resistência antimicrobiana, incluindo um amplo espectro de ação, a inativação eficiente de cepas multirresistentes a antibióticos, o baixo potencial mutagênico e a falta de seleção de células microbianas foto resistentes (SONGCA, ADJEI, 2022).

De acordo com Cieplik e colaboradores (2018), um sistema TFA “ideal” deve atender ao seguinte conjunto de requisitos gerais: (i) propriedades físico-químicas do FS: FSs eficientes para TFA possuem mais frequentemente um alto índice de hidrofiliabilidade e pelo menos uma carga catiônica promovendo interações com patógenos, especialmente bactérias Gram (-); (ii) fotossensibilidade do FS: após a irradiação, um bom FS produz uma alta taxa de espécies citotóxicas de oxigênio, dependendo notadamente de seu rendimento de O<sub>2</sub>, sua estabilidade e ao meio ambiental; (iii) parâmetros da fonte de luz: uma irradiação eficiente de FS deve levar em conta uma exposição coerente à luz garantindo uma boa eficiência de transmitância sem efeitos colaterais; (iv) segurança: o FS deve ser específico para o(s) microrganismo(s)-alvo, induzindo poucos ou insignificantes efeitos colaterais para o hospedeiro, incluindo nenhuma ou poucas respostas de imunidade; e (v) facilidade de implementação na prática clínica: a TFA deve ser relativamente fácil de usar (devido à aplicação rápida, não agressiva e não invasiva da luz), econômica e acessível.

Nesse sentido, nos últimos anos, a aplicação da TFA no ambiente clínico se expandiu de tumores malignos para doenças mais benignas. A TFA é considerada um método eficaz para inativar vários microrganismos, e exerce um efeito bactericida em bactérias resistentes a medicamentos e biofilme bacteriano. Devido à sua ação robusta, baixa toxicidade e efeitos colaterais, amplo espectro antibacteriano, resposta rápida, tratamento repetível e falta de resistência a medicamentos tem sido amplamente utilizado para tratar infecções localizadas superficiais (MAHMOUDI *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2020).

## **2.4 Ozonioterapia**

O ozônio, um gás composto por três átomos de oxigênio com uma estrutura cíclica, foi inicialmente descoberto como oxidante e desinfetante em 1834, exercendo eficácia médica primeiramente para gangrena por arma de fogo (WEN, *et al.*, 2022). A Ozonioterapia na

Medicina e Odontologia atualmente já é bastante propagada em alguns países como Alemanha, Cuba, França, Itália e Suíça. Inúmeras pesquisas comprovaram propriedades do ozônio, como ação antimicrobiana, anti-inflamatória, imunestimulante, oxigenadora, indutora de proliferação tecidual e neoangiogênese (BORDIN *et al.*, 2022).

Sabe-se que, devido ao seu alto poder oxidativo, o ozônio apresenta ação rápida contra bactérias, fungos, vírus e protozoários, com ação desinfetante e esterilizante, além de apresentar fácil manipulação e baixo índice mutagênico (IORIO *et al.*, 2016). Atualmente, o mecanismo terapêutico do ozônio possivelmente está associado à regulação de fatores de crescimento endógenos, capacidade antioxidante, modulações hemodinâmicas, inativação de patógenos, mas ainda sem mecanismo de precisão (WEN, *et al.*, 2022).

O mecanismo de ação antimicrobiana do ozônio atinge bactérias, fungos e vírus. Nas bactérias, age através da indução da perda da integridade da sua membrana através da oxidação das lipoproteínas e fosfolipídios, com perda da função da organela. Também impede o crescimento celular em alguns estágios nos fungos. Além disso, atua sobre os vírus, causando danos ao capsídeo viral, dessa forma impossibilita o ciclo reprodutivo através da interrupção do contato do vírus com a célula. O frágil revestimento das células que as tornam susceptíveis a invasão dos vírus, as tornam expostas à oxidação e expulsão do organismo (SILVA *et al.*, 2021).

O ozônio medicinal pode ser aplicado de diferentes formas e são basicamente três: tópica, infiltrativa e sistêmica. As aplicações tópicas (i) aproveitam o poder germicida do ozônio e seu efeito positivo nos processos de cicatrização; geralmente é aplicado diretamente, com o uso de bolsas ou sacos zip-lock, ou usando água ozonizada ou óleos ozonizados. O ozônio infiltrado (ii) em concentrações entre 4 e 30  $\mu\text{g/ml}$  é útil no tratamento de doenças musculoesqueléticas, como artrite, tendinite, miosite, fascite, neurite ou dor miofascial. A Ozonioterapia sistêmica (iii) consiste na administração da mistura de gases principalmente por duas vias: a via intravenosa indireta (também conhecida como auto-hemoterapia) e a insuflação retal. A administração intravenosa indireta consiste na extração de uma determinada quantidade de sangue que, dentro de um circuito fechado, é colocada em contato com o gás, que se dissolverá e reagirá em poucos segundos, sendo imediatamente reinfundido, esse processo é realizado em alguns países através de dispositivos médicos certificados que são utilizados para este procedimento. A insuflação retal consiste em administrar o gás com uma sonda no reto, onde reage com o muco retal e gera peróxidos. Estes são absorvidos pela mucosa, atingindo o

plexo hemorroidário e o sistema de circulação venosa geral como qualquer outro tratamento retal (HIDALGO-TÁLLON *et al.*, 2022).

Na Odontologia o ozônio já foi empregado como antisséptico em cirurgias bucais, na irrigação de feridas cirúrgicas e na hemostasia transoperatória, favorecendo o processo de reparo através do estímulo à vascularização e maior oxigenação local (SILVA *et al.*, 2021).

Fitzpatrick, Holland e Vanderlelie (2018) realizaram um estudo de revisão sistemática acerca do tratamento de feridas crônicas através da Ozonioterapia. Como resultado observaram que não há evidências conclusivas da terapia com ozônio como um tratamento superior para feridas crônicas em comparação com os tratamentos já padronizados. No entanto, os resultados do estudo foram consistentes o suficiente para afirmar e favorecer a aplicação do ozônio como tratamento para feridas crônicas, sugerindo potencial para a prática clínica convencional.

A água ozonizada surgiu como um importante agente antibacteriano oral e adjuvante à terapia periodontal (URAZ, *et al.*, 2019; DENGIZEK *et al.*, 2019; DEEPHIE, BILICHODMATH, 2020; RAPONE *et al.*, 2022). Além disso, na Odontologia, existem diversas formas de aplicação, na limpeza de preparos cavitários, aplicação de ozônio gasoso pós exodontias ou para controle de dor e trismo, por exemplo (BASTOS, *et al.*, 2022).

Nesse sentido a aplicação da Ozonioterapia nas diversas áreas da Odontologia, além da Periodontia, tem demonstrado resultados satisfatórios e promissores, como por exemplo no tratamento da dor e trismo em cirurgias de 3º molar (GLÓRIA *et al.*, 2020); no tratamento de canais radiculares e na periodontite apical (SINHA *et al.*, 2021) e em microrganismos encontrados em canais radiculares (MORAES *et al.*, 2021), em contra partida o uso de terapias para tratar a cárie dentária ainda necessita de mais estudos para ser indicada (SANTOS *et al.*, 2020).

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar *in vitro* o efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e da Ozonioterapia na inibição de formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii* multidroga-resistente.



## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Desenho do estudo**

Este estudo trata-se de uma pesquisa experimental *in vitro* para investigação da atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Ozonioterapia em uma cepa de *A. baumannii* multidroga-resistente e com gene de resistência *bla*<sub>OXA-23</sub>.

### **4.2 Aspectos éticos**

Por se tratar de um estudo com utilização de material biológico e respeitando os aspectos éticos, conforme resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Estadual Vale do Acaraú (Parecer 1.843.504/2016 – Anexo A/ Parecer 4.138.244 – Anexo B). As amostras da bactéria foram cedidas pela pesquisadora Izabelly Linhares Ponte Brito e Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral.

### **4.3 Locais de realização do estudo**

Laboratório de Pesquisa do curso de graduação em Odontologia, e Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) ambos da Universidade Federal do Ceará - *Campus* Sobral, Brasil.

### **4.4 Coleta dos dados**

A cepa era proveniente de um paciente do sexo masculino, 57 anos de idade, internado na unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Sobral – CE com diagnóstico clínico de pneumonia, submetido a traqueostomia, colocado em ventilação mecânica e sendo a causa da morte insuficiência respiratória. A cepa utilizada foi gentilmente cedida pela pesquisadora Izabelly Linhares Ponte Brito e Prof. Dr. Francisco César

Barroso Barbosa. A identificação e o perfil de sensibilidade dos microrganismos foram realizados no LAMP. O isolado bacteriano passou por teste no laboratório de microbiologia do hospital de internação do paciente através do sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Através do sistema citado anteriormente os microrganismos foram testados para os seguintes antimicrobianos ampicilina/sulbactam, amicacina, ampicilina, ceftriaxona, cefoxitina, ceftazidima, cefuroxima, cefuroxima axetil, ciprofloxacina, colistina, gentamicina, cefepima, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam e a multidroga resistência (MDR) foi definida como resistência a três ou mais classes dos fármacos testados (CASTILHO *et al.*, 2017). Adicionalmente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), para os isolados resistentes à tigeciclina.

Após isolamento, identificação e análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana realizados no hospital de origem, o espécime foi armazenado e enviado em tubos contendo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Himedia®, Mumbai, Índia) com glicerol a 20% ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Universidade Federal do Ceará (UFC) onde foram armazenados em freezer a -80°C para posterior análise.

#### **4.5 Perfil de resistência da amostra testada**

O isolado clínico de *A. baumannii* proveniente de um paciente internado no setor de UTI da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, carregava o gene de resistência *bla*<sub>OXA-23</sub>, se mostrou resistente clinicamente aos seguintes antimicrobianos: vancomicina, cefepima, meropenem, teicoplanina, polimixina.

#### **4.6 Reativação do isolado clínico bacteriano**

Todas as etapas laboratoriais desta pesquisa foram realizadas no Laboratório de Microbiologia em estação de trabalho com fluxo laminar, grau de segurança classe II, mediante desinfecção prévia com álcool a 70% e 15 minutos em luz UV. A reativação dos espécimes armazenados em freezer a -80°C foi realizada acrescentando-se uma alíquota de 50µl da cultura em glicerol em um tubo de ensaio contendo 5,0ml de caldo BHI (Himedia®, Mumbai, Índia) e mantido em estufa bacteriológica por 18 horas a 37°C em anaerobiose, sendo dois tubos para

cada amostra e mais um tubo de controle negativo. Após crescimento, o inóculo foi semeado em placa de Petri contendo Ágar MacConkey (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) utilizando-se uma alça bacteriológica descartável estéril e colocado em estufa a 37°C, por 24h, juntamente com uma placa sem estriagem como controle negativo de contaminação dos meios ou da própria estufa. Em seguida, utilizando-se de uma alça bacteriológica estéril foram transferidas 4 ou 5 colônias isoladas da placa de Ágar MacConkey para novos tubos de ensaio contendo 5,0 ml de BHI caldo, em duplicata, mais um tubo de controle negativo, e colocados na estufa a 37°C, durante 18 horas. Após crescimento, foi confirmada a pureza da amostra com a observação das características morfo-tintoriais através da coloração de Gram.

#### **4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana em biofilmes em diferentes fases de crescimento**

##### ***4.7.1 Preparo do Fotossensibilizador***

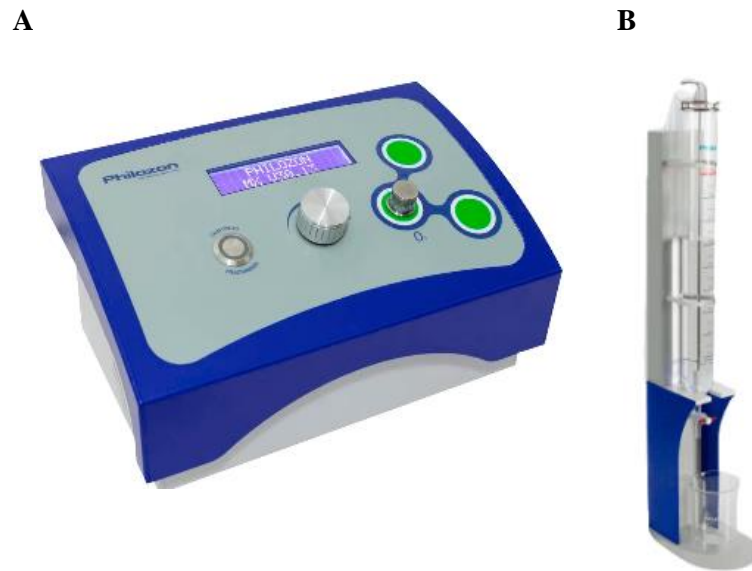
O fotossensibilizador utilizado no estudo foi o azul de orto-toluidina (Sigma, CI 52040). O sensibilizador foi diluído na concentração padrão inicial de 0,002mg/ml em água de osmose reversa estéril para o grupo de estudo TFA e 0,002mg/ml em água ozonizada para o grupo TFA+OZ. A partir dessa concentração padrão, foram feitas diluições seriadas de 0,2µg a 0,000002µg em tubos Falcon de 15ml estéril, envolvido com papel alumínio, em fluxo laminar sem iluminação. Em seguida as diluições do grupo TFA foram armazenadas em temperatura ambiente longe do alcance de iluminação. Devido a estabilidade do ozônio de apenas algumas horas, o fotossensibilizador do grupo TFA+OZ foi preparado em cada dia de experimento. Ambas as preparações do azul de orto-toluidina foram utilizados nos ensaios experimentais para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e nos testes do experimento.

##### ***4.7.2 Preparo da água ozonizada***

Para a água com ozônio foram utilizados dois equipamentos da Empresa Philozon®, denominados Aparelho Gerador de Ozônio Medplus MX; e Coluna de Ozonização de Água 1L (Figuras 3A e 3B, respectivamente). Para ozonização, foi utilizado 1 L de água de osmose reversa refrigerada estéril e o tempo de 5 minutos com concentração de 60µg/mL de

oxigênio. A ozonização foi realizada para cada dia teste de microdiluição em caldo e para cada dia de tratamento, sendo a água ozonizada o diluente do agente sensibilizador (azul de ortotoluidina) nos grupos experimentais contendo ozônio e este material foi utilizado na primeira hora após a ozonização.

Figura 3 – Gerador de Ozônio e Coluna de vidro



Fonte: <https://www.philozon.com.br>

A – Aparelho Gerador de Ozônio Medplus MX; B – Coluna de Ozonização de Água 1L.

#### **4.7.3 Fonte de luz**

A luz utilizada para a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana foi o Lince (Figura 4), construído com tecnologia nacional pelo Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, com comprimento de onda predominante de 630 nm, intensidade luminosa: 150 mW/cm<sup>2</sup>±10% e área de irradiação de 20mm. O tempo de irradiação escolhido foi de 3 minutos (estabelecido após teste piloto). O equipamento possui Braço flexível com suporte para o aplicador de tratamento.

Figura 4 – Equipamento para Terapia Fotodinâmica



Fonte: <https://mmo.com.br/lince>

Equipamento comercial da MMO Tecnologia para Saúde®, com comprimento de onda predominante em 630 nm (620-640 nm), potência de saída fixa em 150 mW/cm<sup>2</sup> com tempos de irradiação de 3 minutos (71 Jcm<sup>-2</sup>). A distância entre a luz e a amostra foi de 3mm.

#### ***4.7.4 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima***

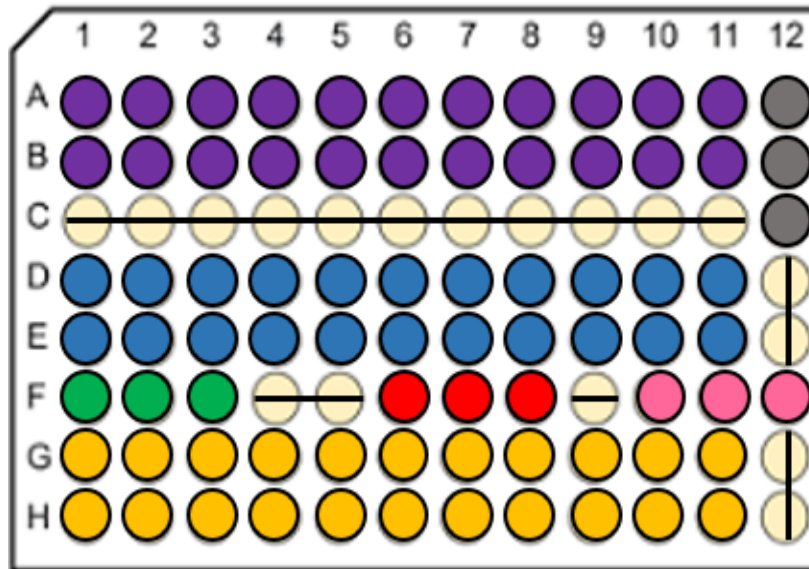
Após 18h de crescimento, o caldo de cultura de *A. baumannii* foi ajustado a fim de obter uma cultura na concentração de  $1-2 \times 10^{-6}$  células. Esse cálculo foi obtido por espectrofotometria baseados nos dados prévios de uma curva de crescimento bacteriano para esse microrganismo e o teste de microdiluição em caldo foi realizado em placas de poliestireno estéril de 96 poços de fundo em “U” (CLSI, 2018).

Para o referido teste, foram realizadas diluições seriadas na base de dois para obtenção de diferentes concentrações. Cada poço da placa foi preenchido com 100 µL do meio de cultivo, 20 µL da bactéria e 80 µL da droga teste nas diferentes concentrações testadas. Poços contendo 80 µL meio de cultivo sem bactéria e 120 µL de sensibilizador nas diferentes concentrações foram utilizados como controles.

Adicionalmente, foram feitos controles positivos e negativos do crescimento bacteriano utilizando respectivamente meios de cultivos inoculados e não inoculados. O

esquema da placa preparada pode ser visualizado na Figura 5. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após incubação, foi realizada a medida de turbidez de cada poço com o auxílio do espectrofotômetro (Biotrak II Place, American Biosciences, Cambridge, Inglaterra) a 620 nm. Foi considerado a CIM, a menor concentração de sensibilizador capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano (CLSI, 2020) e que apresentassem crescimento inferior a 0,05 em espectrofotômetro a 620 nm. Após a medição feita com o espectrofotômetro, os poços sem crescimento no teste de CIM foram plaqueados em duplicata em placas de Ágar Sangue (HiMedia, Mumbai, Índia) suplementado com sangue desfibrinado de ovelha a 5% e enriquecido com vitamina K-hemin (BHI) para contagem de microrganismos totais e estabelecimento da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Figura 5 – Placa de 96 poços para microdiluição em caldo



**LEGENDA**

- Meio+droga teste:** 100µL BHI + 20µL bactéria + 80µL TBO
- Controle de turbidez:** 120µL BHI + 80µL TBO
- Controle de contaminação:** 200µL BHI
- Controle de crescimento:** 180µL BHI + 20µL bactéria
- Controle turbidez CHX :** 120µL BHI + 80µL clorexidina
- Controle positivo:** 100µL BHI + 20µL bactéria + 80µL clorexidina
- Controle negativo:** 100µL BHI + 20µL bactéria + 80µL diluente (água de osmose reversa estéril)
- Poço não utilizado**

Fonte: Elaboração própria

Esquema de distribuição de poços para teste de microdiluição em caldo. Legenda com informações acerca dos grupos.

Os resultados da CIM e CBM foram considerados a partir de dados obtidos no estudo, sendo determinada a concentração de 0,2 µg/ml. Sabendo que a concentração de 0,2 µg/ml é a CIM e CBM e para evitar que o sensibilizador e a água ozonizada apresentassem efeito antimicrobiano, optou-se por trabalhar com a concentração de 0,02 µg/ml para que o

fotossensibilizador sozinho não tivesse efeito sobre a viabilidade do isolado de *A. baumannii* testado.

#### **4.8 Avaliação da atividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Ozonioterapia na inibição de *A. baumannii* em discos de tubo endotraqueal**

##### ***4.8.1 Preparo dos discos***

Para os testes de susceptibilidade em biofilme foram confeccionados discos a partir de tubos endotraqueal utilizado nos procedimentos de traqueostomia (COMPER-MEDIX, N7.0 COM BALÃO). Os espécimes foram pré-cortados, em formato de disco com 6 mm de diâmetro, com o auxílio de um perfurador de metal (Jocar Office) e utilizados para aderência das bactérias, com a finalidade de simular uma situação mais próxima à encontrada na situação clínica onde a amostra foi coletada. Além disso o material do tubo (PVC) é considerado um material compatível com o ozônio, diminuindo os riscos de modificação (OZONESOLUTION, 2021).

Antes dos testes, os discos foram autoclavados a 121 °C em tubo Falcon de 50ml, contendo 15ml de água de osmose reversa estéril.

Figura 6 – Discos de PVC





#### 4.8.2 Grupos experimentais

Os grupos de tratamento dos discos estão descritos no quadro a baixo (Quadro 2).

Quadro 2 – Grupos de tratamento nos discos de PVC

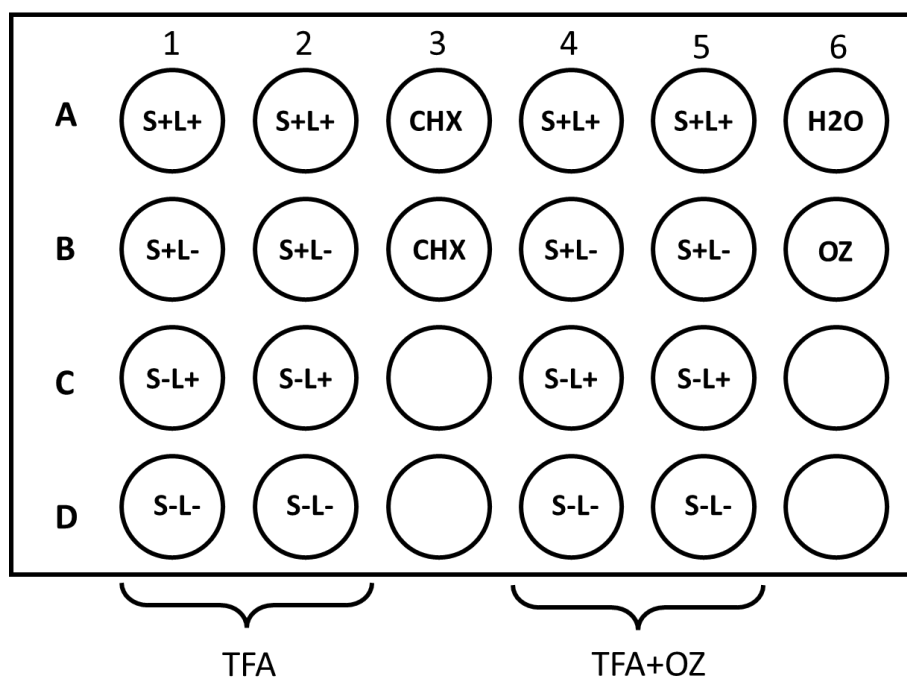
<b>Código</b>	<b>Tratamento realizado</b>
S+L+ (TFA +OZ)	Tratado 5 minutos em sensibilizador com O <sub>3</sub> e 3 minutos em fonte de luz
S-L+ (TFA+OZ)	Tratado 5 minutos em água ozonizada e 3 minutos em fonte de luz
S+L- (TFA+OZ)	Tratado 5 minutos em sensibilizador com O <sub>3</sub>
S-L- (OZ)	Tratado 5 minutos em água ozonizada
S+L+ (TFA)	Tratado 5 minutos em sensibilizador e 3 minutos em fonte de luz
S-L+ (TFA)	Tratado 5 minutos em H <sub>2</sub> O e 3 minutos em fonte de luz
S+L- (TFA)	Tratado 5 minutos em sensibilizador
S-L- (TFA)	Tratado 5 minutos em H <sub>2</sub> O
CHX	Tratado 5 minutos em Clorexidina 0,12%
H <sub>2</sub> O	Controle do meio
OZ	Controle do meio

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.8.3 Crescimento do biofilme

Para o crescimento do biofilme 50µl da bactéria *A. baumannii*, foram inoculadas em 5ml de BHI caldo em duplicata com um controle negativo. Em seguida foram incubadas em estufa bacteriológica durante 18 horas, a 37°C. Após 18h, foi utilizado para o inóculo inicial dos discos de tubo endotraqueal na proporção de 100µL para cada 45mL de meio de cultivo. Esse caldo preparado foi agitado e 2ml da suspensão foram adicionados em cada poço em placa de 24 poços de poliestireno estéril (Figura 6). Foram feitos controles de contaminação sem o inóculo. Em seguida os discos estéreis foram transferidos do tubo Falcon para cada poço com o auxílio de pinça clínica estéril.

Figura 7 - Placa de 24 poços



Fonte: elaboração própria.  
 poços demonstrando os grupos de tratamento TFA (S+L+, S+L-, S-L+, S-L-) e TFA+OZ (S+L+, S+L-, S-L+, S-L-), além dos controles positivo e controle do meio.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Nova Instruments, NI 1523i) a 37°C em anaerobiose durante 24h, 72h e 120h em repouso considerando os estágios de crescimento e maturação do biofilme. O meio de cultivo foi trocado diariamente sem adição do inóculo.

#### 4.8.4 Tratamento dos biofilmes/discos

Após a formação inicial do biofilme sobre os discos (24h, 72h e 120h) as placas foram retiradas da estufa e submetidas aos diferentes tratamentos dentro da câmara de fluxo laminar (Filtracom, Valinhos, SP, Brasil). Os tratamentos foram iniciados pelos discos dos grupos de tratamento com água ozonizada – S+L+ (OZ), S-L+ (OZ), S+L- (OZ) e S-L- (OZ), OZ – seguido dos grupos S+L+ (TFA), S-L+ (TFA), S+L- (TFA), S-L- (TFA), CHX, H<sub>2</sub>O. Antes dos tratamentos os espécimes de tubo endotraqueal foram lavados 3 vezes em solução de NaCl a 0,89% com o auxílio de pinça clínica estéril, a fim de remover o biofilme fracamente aderido. A seguir cada amostra foi submersa em novo poço contendo 1 ml da solução do seu

respectivo tratamento por 5 minutos, após isso os discos foram transferidos para uma tampa de vidro estéril com 5mm de altura para serem submetidos a luz. Os grupos com tratamento pela luz foram irradiados com o aparelho Lince com comprimento de onda predominante de 630 nm, intensidade luminosa:  $150 \text{ mW/cm}^2 \pm 10\%$  e área de irradiação de 20mm por 3 minutos e em seguida o biofilme de cada disco foi coletado com o auxílio de swab estéril (Olen<sup>®</sup>, modelo K41-0201B), e transferido para microtubo eppendorf estéril contendo 1ml de NaCl a 0,89% estéril, tendo a haste cortada com auxílio de tesoura Íris reta (Quinelato<sup>®</sup>) estéril.

#### ***4.8.5 Análise microbiológica do biofilme formado***

Para a contagem microbiológica, as amostras dos biofilmes formados foram coletadas em microtubos eppendfors contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,89% estéril. Esse conteúdo foi vortexado (Vórtex AP-56, Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil) e sonicado a 6 watts (Sonicador Digital Sonifer<sup>™</sup> 450, 50/60Hz, 4A, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA), com 3 pulsos de 15 segundos, com intervalo de 15 segundos em banho de gelo entre eles. A suspensão foi diluída em série decimal (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000) e plaqueada em duplicata em placas de BHI Ágar. Em seguida, foram incubadas em estufa a 37°C, por 12 horas. Decorrido o tempo de incubação, a contagem das unidades formadoras de colônia (Ufc) foi realizada e o número de Ufc/mg de biofilme foi estabelecido após a determinação do peso seco de cada amostra (DUARTE *et al.*, 2006).

#### ***4.8.6 Determinação do peso seco do biofilme***

Para a determinação do peso seco do biofilme de cada tratamento, inicialmente etanol a -20°C foi adicionado à amostra 3 vezes do volume do puro e estes foram armazenados na geladeira -20°C por 18h. Após a precipitação do biofilme, o swab de cada tubo foi descartado e foi realizada a centrifugação a 9000 rpm à 4°C durante 10 minutos (Eppendorf, 5415 R). Os sobrenadantes foram descartados, e os “pellets” resultantes foram lavados com 1 mL de etanol frio e transferidos para microtubos de 2ml identificados e pré-pesados (um para cada unidade experimental). Em seguida, o conteúdo foi novamente centrifugado, o excesso de álcool foi cuidadosamente removido por pipetagem, e os microtubos foram colocados em um dessecador

à vácuo com vacuômetro (Nalcon, R-0810) e bomba de vácuo (Tecnal, TE-058) a vácuo por 48h após isso foram pesados novamente (DUARTE *et al.*, 2006).

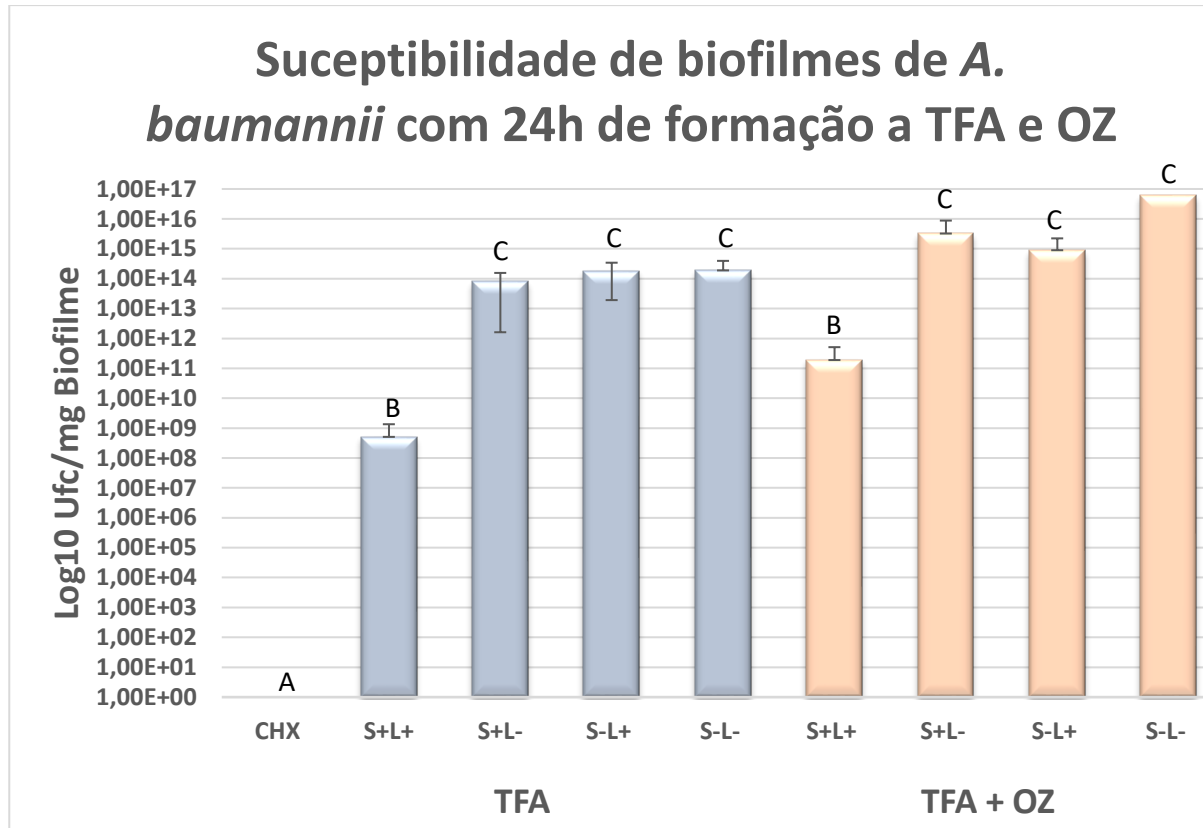
#### **4.9 Análise estatística dos dados**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2019 para Windows). As unidades formadoras de colônias (Ufc) para as análises de biofilme após 24h, 72h e 120h de formação foram transformadas em Ufc  $\log_{10}$ , com o objetivo de reduzir a heterogeneidade de variância. A distribuição de normalidade foi verificada no teste estatístico Kolmogorov-Smirnov. Para a análise de diferenças entre os grupos foi realizado teste de ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

O efeito dos tratamentos na viabilidade de biofilmes de *A. baumannii in vitro* com 24h de formação pode ser observado (Gráfico 1). Os resultados demonstraram que o uso do sensibilizador sozinho nos grupos S+L- (TFA) e S+L- (OZ), ou da luz sozinha nos grupos S-L+ (OZ) e S-L+ (TFA) não apresentaram diferença estatística significativa na formação inicial dos biofilmes por *A. baumannii* multidroga-resistente. Além disso, a redução nas contagens para os grupos submetidos a TFA foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), com contagens no grupo S-L- (TFA) de  $1,9 \times 10^{14} \pm 2,1 \times 10^{14}$  sendo reduzidas para  $5,1 \times 10^8 \pm 8,4 \times 10^8$  no grupo S+L+ (TFA) representando uma redução de mais de 5 logs. De maneira semelhante, o tratamento S+L+ (OZ) promoveu uma contagem de  $1,9 \times 10^{11} \pm 3,2 \times 10^{11}$  representando uma redução de aproximadamente 5 logs com relação ao grupo não tratado S-L- (OZ) que apresentou contagens de  $6,1 \times 10^{16} \pm 9,3 \times 10^{16}$  após 24h de formação dos biofilmes. Além disso, como esperado, o tratamento com clorexidina 0,12% inibiu completamente a formação de biofilme de *A. baumannii* no modelo testado. Adicionalmente não foram encontradas diferença significativa no uso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana utilizando o sensibilizador feito com água ou água ozonizada. Sendo assim, o tratamento da TFA por 3 minutos (S+L+ TFA) foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das bactérias presentes nos biofilmes de 24h.

Gráfico 1 – Análise da susceptibilidade de biofilmes de *A. baumannii* com 24h

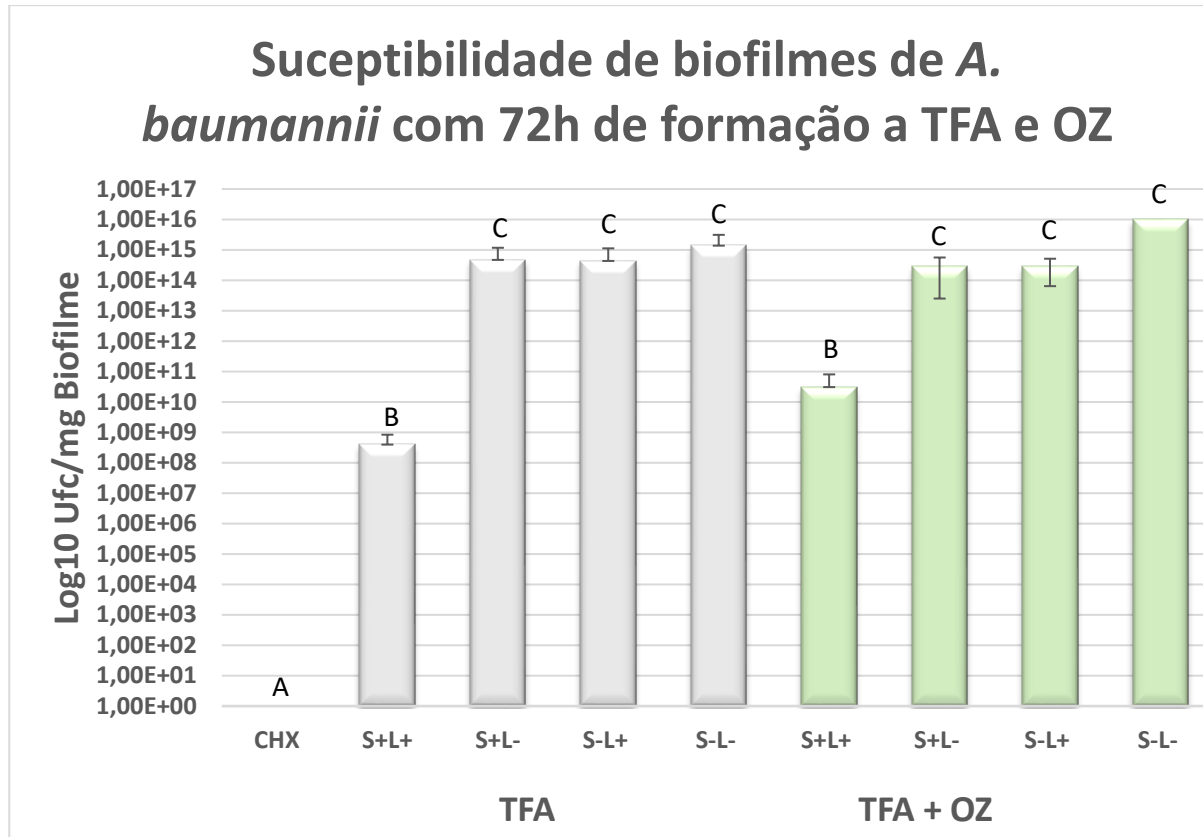


Fonte: elaboração própria.

Efeitos do tratamento da TFA e TFA+ S+L+ (OZ), S-L+ (OZ), S+L- (OZ) e S-L- (OZ), OZ – seguido dos grupos S+L+ (TFA), S-L+ (TFA), S+L- (TFA), S-L- (TFA), e grupo controle CHX, na viabilidade de biofilmes de *A. baumannii* com 24h de formação. Os dados representam valores médios (n =3). As barras de erro representam o desvio-padrão e os dados seguidos por letras diferentes são os que apresentaram diferença estatística (p<0,05).

Os resultados para o teste de TFA e OZ sobre biofilmes de 72h estão representados no Gráfico 2. De maneira semelhante, a redução nas contagens dos biofilmes com 72h de formação para os grupos submetidos a TFA foram estatisticamente significativas (p<0,05). As contagens no grupo S-L- (TFA) de  $1,4 \times 10^{15} \pm 1,7 \times 10^{15}$  foram reduzidas para  $3,9 \times 10^8 \pm 4,4 \times 10^8$  no grupo S+L+ (TFA) representando uma redução de mais de 6 logs. A TFA com Ozonioterapia promoveu uma redução um pouco menor com contagens de  $1,0 \times 10^{16} \pm 1,3 \times 10^{16}$  S-L- (OZ) sendo reduzidas para  $3,1 \times 10^{10} \pm 5,0 \times 10^{10}$  no grupo S+L+ (OZ). O tratamento com clorexidina 0,12% inibiu completamente a formação de biofilme de *A. baumannii* e não foram encontradas diferença significativa no uso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana utilizando o sensibilizador feito em água ou água ozonizada.

Gráfico 2 – Análise da susceptibilidade de biofilmes de *A. baumannii* com 72h

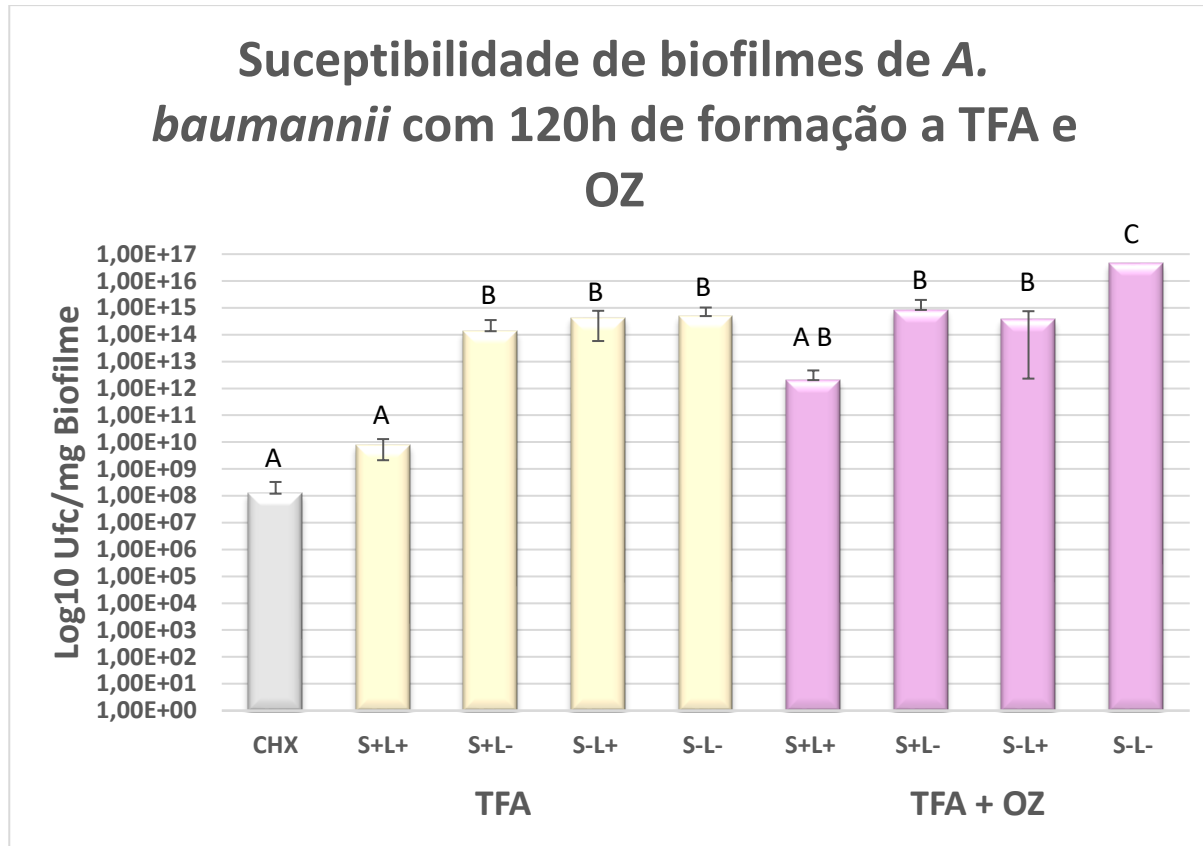


Fonte: elaboração própria.

Efeitos do tratamento da TFA e TFA+ S+L+ (OZ), S-L+ (OZ), S+L- (OZ) e S-L- (OZ), OZ – seguido dos grupos S+L+ (TFA), S-L+ (TFA), S+L- (TFA), S-L- (TFA), e grupo controle CHX, na viabilidade de biofilmes de *A. baumannii* com 72h de formação. Os dados representam valores médios (n =3). As barras de erro representam o desvio-padrão e os dados seguidos por letras diferentes são os que apresentaram diferença estatística (p<0,05).

No gráfico 3 é possível observar os resultados para o teste em biofilmes de *A. baumannii* com 120h de formação. Nesse caso, os grupos que apresentaram melhores resultados na inibição de biofilmes foram os tratamentos com CHX com contagens de  $1,2 \times 10^8 \pm 2,1 \times 10^8$  e o tratamento S+L+ (TFA) com contagens de  $7,5 \times 10^9 \pm 5,4 \times 10^9$ . Embora não tenha sido observada diferença estatística entre esses grupos, ambos representaram uma redução significativa em relação ao controle não tratado S-L- (TFA) que apresentou contagem de  $4,9 \times 10^{14} \pm 5,3 \times 10^{14}$ . Em biofilmes maduros com 120h de formação o tratamento S+L+ (OZ) diferiu apenas do seu controle não tratado, tendo efeito semelhante ao encontrado para a luz e para o sensibilizador utilizados isoladamente.

Gráfico 3 – Análise da susceptibilidade de biofilmes de *A. baumannii* com 120h



Fonte: elaboração própria.

Efeitos do tratamento da TFA e TFA+ S+L+ (OZ), S-L+ (OZ), S+L- (OZ) e S-L- (OZ), OZ – seguido dos grupos S+L+ (TFA), S-L+ (TFA), S+L- (TFA), S-L- (TFA), e grupo controle CHX, na viabilidade de biofilmes de *A. baumannii* com 120h de formação. Os dados representam valores médios (n =3). As barras de erro representam o desvio-padrão e os dados seguidos por letras diferentes são os que apresentaram diferença estatística (p<0,05).



## 6 DISCUSSÃO

As infecções causadas por microrganismos multidroga-resistentes tornaram-se um problema de saúde no mundo, além disso, a necessidade de buscar novos métodos de tratamento para esses microrganismos tem sido discutida frequentemente. Este experimento destinou-se a estudar a ação de terapias alternativas, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Ozonioterapia, para inibição de biofilme de *A. baumannii*, a partir de um isolado clínico, que apresentou resistência à diversos antimicrobianos a saber, vancomicina, teicoplanina, ambos da classe dos glicopeptídeos, cefepima da classe das cefalosporinas, meropenem pertencente a classe dos  $\beta$ -lactâmicos, polimixina, da classe dos polipeptídios, e que culminou no óbito do paciente.

*A. baumannii* é considerado um dos patógenos mais importantes causadores de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), e está na lista de patógenos prioritários do documento Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics, da Organização Mundial da Saúde – OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017), como microrganismo crítico, prioridade 1 para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Os fatores de risco para colonização e infecção por *A. baumannii* incluem: longos períodos de internação, cirurgia recente, internação em UTI, uso de cateteres e outros dispositivos invasivos, traqueostomia, ventilação mecânica, dieta parenteral, prematuridade em recém-nascidos e terapia antimicrobiana prévia com fluoroquinolonas, cefalosporinas de amplo espectro ou carbapenêmicos (CDC, 2019). Esses achados da literatura e dos órgãos de saúde evidenciam a importância de estudos como este.

O isolado de *A. baumannii* utilizado nesse estudo, é proveniente de um paciente que estava em internação hospitalar na UTI, acometido de pneumonia associado a ventilação mecânica e que apresentou resistência a diversas classes de antimicrobianos e carregava o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>. No estudo de revisão de Ayukekbong, Ntemgwa e Atabe (2017) os autores buscaram realizar um levantamento das possíveis causas de resistência antimicrobiana em países em desenvolvimento e estratégias para o controle, sendo apontadas a qualidade das drogas, a falha na regulação do uso, a prescrição incorreta, a auto-medicação e a indústria animal as possíveis causas da resistência das bactérias. Entre as estratégias de controle e prevenção de infecção os autores elencam a educação em saúde, a vacinação, medidas de higiene e saneamento e ainda terapias alternativas como as principais estratégias para esse grande problema de saúde. Dessa

forma podemos considerar a resistência antimicrobiana aos antibióticos do isolado utilizado no estudo estar associado a alguns desses fatores citados anteriormente.

Os isolados do complexo *Acinetobacter* apresentam como os principais grupos de carbapenemases do tipo OXA semelhantes a OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 e a OXA-51. Estes tipos de OXA intrínseco pode ser superexpresso e associado à resistência aos carbapenêmicos. No Brasil os isolados clínicos de *Acinetobacter* resistentes a carbapenêmicos costumam produzir OXA-23, estes dados são apresentados em alguns estudos em hospitais de diferentes regiões do país (CARVALHO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011; CORRÊA *et al.*, 2012; KOBBS *et al.*, 2016; SCHUERTZ *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019), assim como a presença ao gene *bla*<sub>OXA-23</sub> do isolado de *A. baumannii* desse estudo.

Além disso como citado mais acima, a cepa de *A. baumannii* foi proveniente de um paciente internado em UTI, com diagnóstico de pneumonia associado à ventilação mecânica. Duszynska e colaboradores (2020) realizaram um estudo prospectivo em um hospital universitário na Polônia, dentre os dados apresentados no estudo desses pesquisadores o patógeno mais comum em casos de paciente com pneumonia associada à ventilação mecânica e em UTI foi *Acinetobacter baumannii*, compreendendo 53% e 31% do número geral de patógenos, respectivamente. Esses dados corroboram com as condições clínicas do paciente, que foi utilizado o isolado clínico para esse estudo.

No ano de 2017 a OMS divulgou uma lista global com diversas bactérias resistentes a antibióticos. Os microrganismos presentes nessa lista incluem as bactérias ESKAPE, que aparecem no topo, com alta prioridade de atenção e controle. Nesse mesmo documento a OMS chama a atenção para a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e agentes que possam minimizar os problemas causados pela resistência aos antibióticos. Marturano e Lowery (2019), afirmam que os patógenos desse grupo estão diretamente associados a períodos mais longos de internação, aumento do custo de atendimento e mortalidade em comparação com outros patógenos. O CDC estimou que nos Estados Unidos os custos em saúde apenas com casos envolvendo *A. baumannii* chegou a cerca de U\$ 281.000.000 no ano de 2017 (CDC, 2019). Isso justifica a necessidade de busca por terapias alternativas, que é o objetivo principal desse estudo.

Os custos com a TFA e OZ em hospitais pode variar de acordo com a disponibilidade dos equipamentos nos serviços de saúde, haja vista que estes podem fazer parte dos equipamentos disponíveis para uso na rotina clínica. O aparelho de luz Lince (MMO

Tecnologia para Saúde<sup>®</sup>) utilizado nesse estudo, foi desenvolvido para evidenciação e tratamento de câncer de pele, fazendo parte de um dos equipamentos médicos já disponíveis em alguns hospitais. Apresenta um baixo custo quando comparado aos custos utilizados com fármacos e internações causadas por patógenos multidroga-resistentes (CDC, 2019).

Uma outra terapia alternativa que vem sendo estudada e tem apresentado efeitos antimicrobianos em estudos laboratoriais e clínico é a Ozonioterapia (RANGEL, *et al.*, 2022; IZADI, *et al.*, 2022). O interesse pela sua aplicação em ambientes hospitalares se dá pela disponibilidade do gás O<sub>2</sub> para ser ozonizado e pelo baixo custo dos equipamentos geradores do mesmo. Rangel e colaboradores (2022) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar a concentração mínima do gás ozônio (O<sub>3</sub>) necessários para controlar e matar um conjunto de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas crescidas de forma planctônica sensíveis ou multidroga-resistentes. Apesar de não terem observado redução na contagem de colônia das cepas estudadas, foi observada diminuição na viabilidade celular de alguns patógenos, sendo um deles *A. baumannii*. Através dos resultados encontrados por Rangel e colaboradores surge o interesse e a necessidade de utilizar e pesquisar sobre a OZ neste estudo e em estudos futuros.

Em Odontologia o uso da Ozonioterapia vem sendo utilizado nas diversas áreas (BASTOS *et al.*, 2022), um ensaio clínico randomizado de Rapone e colaboradores (2022) com o objetivo de comparar a Terapia Periodontal associada ao tratamento adjuvante com o uso de ozônio gasoso com a Terapia Periodontal tradicional (raspagem e alisamento coronaradicular), para promover uma resposta a cicatrização tecidual, em pacientes saudáveis com periodontite generalizada moderada ou grave, após 3 ou 6 meses de tratamento os resultados demonstraram uma melhora significativa nos indivíduos que foram submetidos à terapia com o ozônio gasoso associado ao tratamento periodontal. Esses dados mostram a possibilidade do uso do ozônio em diferentes apresentações e com resultados clínicos satisfatórios, torna-se importante realizar pesquisas laboratoriais para avaliar o uso da Ozonioterapia em diferentes microrganismos, já que são diversas às bactérias encontradas na cavidade oral, assim como na doença periodontal.

No presente estudo, foi avaliado o efeito da TFA e da OZ na inibição de biofilmes de *A. baumannii*, crescidos sobre discos de PVC oriundos de tubo endotraqueal em diferentes tempos de formação (24h, 72h, 120h). Os resultados do presente estudo mostraram que o grupo de tratamento utilizando apenas o sensibilizador ou apenas a luz não apresenta atividade inibitória contra o biofilme nos parâmetros testados (MARTINS ANTUNES DE MELO, *et al.*, 2021). Adicionalmente, foi possível observar que a TFA associada ou não a OZ apresentou

efeito inibitório em todos os tempos de formação do biofilme, desde os estágios iniciais (24h) até o biofilme maduro (120h). A partir do isolado clínico desse estudo foi possível observar a atividade inibitória da TFA e da TFA associada à OZ, porém a TFA isolada apresentou resultados mais satisfatórios, sendo assim, não há a necessidade de associação das duas terapias para que o efeito antimicrobiano desejável aconteça.

Este é o primeiro estudo utilizando a TFA com azul de orto-toluidina e associando ao uso de água ozonizada, para inibir biofilmes de *A. baumannii*. Figueiredo-Godoi e colaboradores (2022) estudaram o efeito da TFA mediada por fotenticina e azul de metileno no crescimento planctônico, biofilmes e infecções por queimaduras de *Acinetobacter baumannii*, e encontraram resultados satisfatórios para TFA utilizando azul de metileno, que é um corante bastante utilizado para essa finalidade, porém para o grupo de teste com fotenticina sobre os biofilmes os autores observaram que a cepa apresentou resistência. Já para os testes em culturas planctônicas de *A. baumannii* os autores observaram redução na quantidade de células viáveis. Dessa forma é interessante realizar estudos futuros aplicando a mesma metodologia adotada nesse estudo, mas, sobre culturas planctônicas.

É importante lembrar que já existe na literatura estudos que detectaram isolados de *A. baumannii* em amostras da cavidade oral ou da região orofacial (PEREIRA *et al.*, 2019; KIARI, MEDDAH, MEDDAH, 2018). *A. baumannii* surgiu como um patógeno nosocomial oportunista e representa um desafio clínico por causa de sua emergente resistência aos antibióticos, as infecções causadas por esse patógeno podem ocorrer inclusive através da corrente sanguínea. Pereira e colaboradores (2019) apresentam o relato de 2 casos de celulite facial associada a infecção por *A. baumannii*, o mesmo deve ser considerado um patógeno potencialmente multirresistente de interesse também para a Odontologia.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse estudo *in vitro* podemos concluir que:

- A TFA associada ou não à OZ apresentaram efeito inibitório em biofilme de *A. baumannii* em diferentes dias de tratamento, exceto em 120h para o tratamento com OZ;
- A TFA sem associação à OZ apresentou os melhores resultados para inibição de biofilmes de *A. baumannii*;
- Torna-se importante a realização de mais estudos na área, utilizando outros sensibilizadores, diferentes concentrações, que possam contribuir para a discussão abordada nessa pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ASLAM B. *et al.* Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 11, 2021. doi:10.3389/fcimb.2021.771510
- AVERHOFF, B. *et al.* Natural transformation in Gram-negative bacteria thriving in extreme environments: from genes and genomes to proteins, structures and regulation. **Extremophiles**, p. 1-12, 2021.
- AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2017.
- BARBOSA, R. B. *et al.* Ozonioterapia como opção de tratamento contra COVID-19: uma revisão de literatura. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 13, p. 1-8, 18 out. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21228>.
- BAS, S.; YULA, E. Overview of dermatological ozone applications and a rare complication of dermal ozone treatment: Isolated orbital emphysema with cutaneous injection. **Journal of Immunology and Clinical Microbiology**, v. 3, p. 38-49, 2018.
- BASTOS, P. L. *et al.* Ozonioterapia na odontologia: revisão sistemática de literatura. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 4, pág. e46711427474-e46711427474, 2022.
- BLOT, *et al.* Healthcare-associated infections in adult intensive care unit patients: Changes in epidemiology, diagnosis, prevention and contributions of new technologies. **Intensive and Critical Care Nursing**, Bélgica. V. 70, p. 103227, 2022.
- BORAL, B. *et al.* A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2019.
- BORDIN, B. *et al.* Ozonioterapia: uma prática integrativa e complementar na estética. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento.**; v. 6, n. 5, p. 168-196, 2022.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Nota técnica conjunta CGLAB, BrCAST e ANVISA: testes de sensibilidade para *Acinetobacter* spp.** Brasília-DF, 2021.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Ozonioterapia: anvisa esclarece as indicações aprovadas até o momento.** Anvisa esclarece as indicações aprovadas até o momento. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/ozonioterapia-anvisa-esclarece-as-indicacoes-aprovadas-ate-o-momento>. Acesso em: 01 nov. 2022.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.

BRIGO, I. R.; YAMAMOTO, L. R.; MOLINA, R. J. Community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: a rare case in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, 2022.

BRIGOTTI, M. *et al.* Endothelial damage induced by Shiga toxins delivered by neutrophils during transmigration. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 88, n.1, p.201- 210, 2010.

BRITO, I. L. P. **DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES EM HOSPITAIS DE ENSINO DO CEARÁ**. 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará Campus Sobral, Sobral, 2018.

BRITO, I.L.P. *et al.* Sensitivity profile and frequency of oxa-type carbapenemases among *acinetobacter baumannii* strains in teaching hospitals of Ceará, Brazil. **SODEBRAS**, v. 16, n.185, p. 20-25, 2021.

CARVALHO K. R. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 1, p. 25-28, 2009. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.12.009

CAVALCANTE, D. A. *et al.* Uso De Ozônio Gasoso Na Sanitização De Câmaras Frigoríficas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 121, 2014.

CDC - CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotics Resistance Threats in United States, 2019. Acessado em 15 out 2022 Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>>

CHEN, C. *et al.* Community-acquired bloodstream infections caused by *Acinetobacter baumannii*: A matched case–control study. **Journal of microbiology, immunology and infection**, v. 51, n. 5, p. 629-635, 2018.

CHIANG, S. *et al.* Desiccation and ethanol resistances of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* embedded in biofilm: The favorable antiseptic efficacy of combination chlorhexidine gluconate and ethanol. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 6, p. 770-777, 2018.

CIEPLIK F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Crit Rev Microbiol**. 2018;44(5):571–589.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **CLSI Document M100-S30**, 34(1). 2020.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **CLSI document**. Wayne:

CLSI; 2018.

CORRAL, J. *et al.* Direct interaction between RecA and a CheW-like protein is required for surface-associated motility, chemotaxis and the full virulence of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 17978. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 315-326, 2020.

CORRÊA, L. L. *et al.* Detection of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 521-526, 2012.

kobsDEEPTHI, R.; BILICHODMATH, S. Ozone therapy in periodontics: A meta-analysis. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 11, n. 2, p. 108, 2020.

DENGIZEK, E. S. *et al.* Evaluating clinical and laboratory effects of ozone in non-surgical periodontal treatment: a randomized controlled trial. **Journal Of Applied Oral Science**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 1-8, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0108>.

DI MAURO, *et al.* The biochemical and pharmacological properties of ozone: the smell of protection in acute and chronic diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 634, 2019.

DIAS, L. M. *et al.* Use of photodynamic therapy associated with antimicrobial peptides for bacterial control: a systematic review and Meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3226, 2022.

DUARTE, S. *et al.* Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. **Fems Microbiology Letters**, v. 257, n. 1, p. 50-56, 2006.

DUSZYNSKA, W. *et al.* Device associated -health care associated infections monitoring, prevention and cost assessment at intensive care unit of University Hospital in Poland (2015-2017). **BMC Infect Dis.**; v. 20, n.1, p.761, 2020. doi:10.1186/s12879-020-05482-w

FERREIRA, A. E. *et al.* Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 17, n. 2, p. 221-227, 2011. doi:10.1089/mdr.2010.0013

FERREIRA, S. *et al.* OZÔNIO-TERAPIA NO CONTROLE DA INFECÇÃO EM CIRURGIA ORAL. **Revista Odontológica de Araçatuba**, [S. I], v. 5, n. 1, p. 36-38, 2013.

FIGUEIREDO-GODOI, L.M.A. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Fotenticine and Methylene Blue on Planktonic Growth, Biofilms, and Burn Infections of *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics (Basel)**. 2022 May 4;11(5):619. doi: 10.3390/antibiotics11050619.

FITZPATRICK E., HOLLAND O.J., VANDERLELIE J.J. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. **Int Wound J**. 2018;15(4):633-644. doi:10.1111/iwj.12907



GEDEFIE, A. *et al.* *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: a review. **Infection and Drug Resistance**, p. 3711-3719, 2021.

GIAMMANCO, A. *et al.* Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. **Mosphere**, v. 2, n. 1, p. e00310-16, 2017.

GLÓRIA, J. *et al.* Influence of ozonized water on pain, oedema, and trismus during impacted third molar surgery: a randomized, triple blind clinical trial. **BMC oral health**, v. 20, n. 1, p. 41, 2020, doi.org/10.1186/s12903-020-1029-5.

HAMIDIAN, M.; NIGRO, S. J. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbial genomics**. Londres, Vol. 5, n. 10. publicado em 01 de out de 2019. Disponível em <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000306>> acesso em 01 de fev de 2023.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91-102, 2018.

HENRICHSEN, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriological Reviews**. Copenhagen, v. 36, n.4, p. 478–503, Dez. 1972.

HIDALGO-TALLÓN, F. J. *et al.* Updated review on ozone therapy in pain medicine. **Frontiers in Physiology**, p. 194, 2022.

HUANG, K. *et al.* A Comparative Study: superficial shaving combined with photodynamic therapy versus cryotherapy in the treatment of recalcitrant plantar warts. **Lasers In Surgery And Medicine**, [S.L.], v. 52, n. 8, p. 747-752, 10 jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.23212>.

IORIO, F. B. R. D. *et al.* Ozonated Mineral Oil: preparation, characterization and evaluation of the microbicidal activity. **Ozone: Science & Engineering**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 253-260, 21 fev. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2015.1128801>.

IZADI M. *et al.* Reduce the risk of ventilator-associated pneumonia in ICU patients by Ozonated water mouthwash: A double-blind randomized clinical trial. **Am J Infect Control**. 2022 Nov 12:S0196-6553(22)00789-1. doi: 10.1016/j.ajic.2022.10.015.

KIARI, F. Z; MEDDAH, B; MEDDAH, A. T. In vitro study on the activity of essential oil and methanolic extract from Algerian *Nigella sativa* L. Seeds on the growth kinetics of micro-organisms isolated from the buccal cavities of periodontal patients. **The Saudi Dental Journal**, v. 30, n. 4, p. 312-323, 2018.

KOBS, V. C. *et al.* The role of the genetic elements bla<sub>oxa</sub> and IS<sub>Aba 1</sub> in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. **Rev Soc Bras de Med Trop**, v. 49, p. 433-440, 2016.

LE, M. N. *et al.* Oral colonisation by antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria among long-term care facility residents: prevalence, risk factors, and molecular epidemiology. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, p. 1-14, 2020.

MA, Z. *et al.* Investigations on the genomic diversity of OXA from isolated *Acinetobacter baumannii*. **Genetics And Molecular Research**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 14711-14716, 18 nov. 2015. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.november.18.36>.

MAHMOUDI, H. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy: an effective alternative approach to control bacterial infections. **Journal Of Lasers In Medical Sciences**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 154-160, 28 jul. 2018. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.15171/jlms.2018.29>.

MARTINS ANTUNES DE MELO W.C. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for biofilm treatments. Possible synergy between aPDT and pulsed electric fields. **Virulence**. 2021;12(1):2247-2272. doi:10.1080/21505594.2021.1960105

MARTINS C. C.; KOZUSNY, A.; MENDES E.C.B. Ozone in the control of microorganisms in health care waste. **Revista Baiana de Enfermagem**. 2015;29(4):318-327. <http://dx.doi.org/10.18471/rbe.v29i4.13678>.

MARTURANO J.E.; LOWERY, T.J. ESKAPE Pathogens in Bloodstream Infections Are Associated With Higher Cost and Mortality but Can Be Predicted Using Diagnoses Upon Admission. **Open Forum Infect Dis**. 2019 Nov 22;6(12):ofz503. doi: 10.1093/ofid/ofz503.

MEA, H. J.; YONG, P. V. C.; WONG, E. H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. **Microbiological research**, v. 247, p. 126722, 2021.

MORAES, M. M. *et al.* The antimicrobial effect of different ozone protocols applied in severe curved canals contaminated with *Enterococcus faecalis*: ex vivo study. **Odontology**, v. 109, n. 3, p. 696-700, 2021. doi:10.1007/s10266-021-00592-6

NGUYEN, M.; JOSHI, S. G. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: a scientific review. **Journal of applied microbiology**, v. 131, n. 6, p. 2715-2738, 2021.

NOGALES, C. G. *et al.* Ozone therapy: adjuvant to endodontic treatment in a subluxation case – case report. **Ozone Therapy Global Journal**, v. 9, n. 1, p. 161– 169, 2019.

OLIVEIRA, D.V. ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DA FAMÍLIA *Enterobacteriaceae* QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A  $\beta$ - LACTÂMICOS. Dissertação de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande

do Sul, Rio Grande do Sul, 2016.

OLIVEIRA, E. A. *et al.* High rate of detection of OXA-23-producing *Acinetobacter* from two general hospitals in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

OZONESOLUTION. **Ozone Compatible Materials. Hull (IO): OzoneSolutions**. 2021. Disponível em: <https://ozonesolutions.com/blog/ozone-compatible-materials/> (Acessado em 12 de Out, 2022).

PEREIRA, T. S. F. *et al.* *Acinetobacter baumannii* orofacial cellulitis: report of 2 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 127, n. 6, p. e118-e122, 2019.

POLAT, E. KANG, K.. Natural photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, p. 584, 2021.

PRIYADHARSINI, J. V.; GIRIJA, AS S.; PARAMASIVAM, A. An insight into the emergence of *Acinetobacter baumannii* as an oro-dental pathogen and its drug resistance gene profile—An in silico approach. **Heliyon**, v. 4, n. 12, p. e01051, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01051>.

PROTANO, C. *et al.* Hospital environment as a reservoir for cross transmission: cleaning and disinfection procedures. **Ann Ig**, v. 31, n. 5, p. 436-448, 2019.

RANGEL, K. *et al.* Detrimental effect of ozone on pathogenic bacteria. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 40, 2022.

RAPONE, B. *et al.* The Gaseous Ozone Therapy as a Promising Antiseptic Adjuvant of Periodontal Treatment: A Randomized Controlled Clinical Trial. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, p. 985, 2022.

ROLIM, Juliana P.M.L. *et al.* The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 106, p. 40-46, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001>.

SANTOS, G. M. *et al.* Effectiveness and safety of ozone therapy in dental caries treatment: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Evidence Based Dental Practice**, v. 20, n. 4, p. 101472, 2020.

SANTOS, G.L.P. Mecanismos de motilidade bacteriana. Goiânia, Brasil, 2011. Disponível em: <[https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/semi2011\\_Gisely\\_Lazara\\_1.pdf](https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/semi2011_Gisely_Lazara_1.pdf)>.

SAVOLDI, A. *et al.* Gross national income and antibiotic resistance in invasive isolates: analysis of the top-ranked antibiotic-resistant bacteria on the 2017 WHO priority list. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 12, p. 3619-3625, 2019.

SCHUERTZ K. F. *et al.* Bacteremia and meningitis caused by OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* - molecular characterization and susceptibility testing for alternative antibiotics. **Braz J Microbiol.**, v. 49, n. 1, p. 199-204, 2018. doi:10.1016/j.bjm.2018.04.002

SEN, S.; SEN, S. Ozone therapy a new vista in dentistry: integrated review. **Medical Gas Research**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 189, 2020. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2045-9912.304226>.

SILVA, E. J. N. L. *et al.* The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. **International Endodontic Journal**, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 317-332, 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13229>.

SILVA, Y. C. *et al.* Ozônio como agente antimicrobiano na odontologia: revisão de literatura. **Revista Da Faculdade De Odontologia Da Universidade Federal Da Bahia**, v. 51, n. 3, p. 97-107, 2021.

SINHA, N. *et al.* Evaluation of Ozone Therapy in Endodontic Treatment of Teeth with Necrotic Pulp and Apical Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. **J Endod.**; v.47, n. 12, p. 1820-1828, 2021. doi:10.1016/j.joen.2021.09.006

SONGCA, S. P.; ADJEI, Y. Applications of antimicrobial photodynamic therapy against bacterial biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3209, 2022.

TALAAT, M. *et al.* Increasing Antimicrobial Resistance in World Health Organization Eastern Mediterranean Region, 2017–2019. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, p. 717, 2022.

TARTARI, D. C. **RASTREIO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Acinetobacter spp.* ISOLADOS DE AMBIENTE HOSPITALAR.** 2016. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

URAZ, A. *et al.* Ozone application as adjunctive therapy in chronic periodontitis: clinical, microbiological and biochemical aspects. **Journal Of Dental Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 27-37, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jds.2018.06.005>.

VITEK® 2. Biomerieux, 2022. Disponível em: < <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-2-0>>. Acesso em: 24, outubro de 2022.

WEN Q., *et al.* A systematic review of ozone therapy for treating chronically refractory wounds and ulcers. **Int Wound J.** 2022;19(4):853-870. doi:10.1111/iwj.13687

WHITEWAY, C. *et al.* *Acinetobacter baumannii*. **Trends in microbiology**, v. 30, n. 2, p. 199-200, 2022.

YIN, X. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy Involving a Novel Photosensitizer Combined With an Antibiotic in the Treatment of Rabbit Tibial Osteomyelitis Caused by Drug-Resistant Bacteria. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 13, p. 1-14, 22 abr. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.876166>.

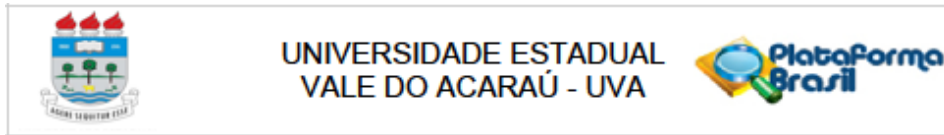
YOUF, R. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: Latest developments with a focus on combinatory strategies. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 1995, 2021.

ZANGRANDO, D. **Ozonioterapia como método auxiliar na terapêutica dos abscessos dentários**. 2022. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, Universidade de São Paulo, Bauru, 2022.

ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International immunopharmacology**, v. 56, p. 235-241, 2018.

ZHU, J. *et al.* Functional synergy of antimicrobial peptides and chlorhexidine acetate against gram-negative/gram-positive bacteria and a fungus in vitro and in vivo. **Infection and Drug Resistance**, p. 3227-3239, 2019.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – *A. baumannii*



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS NOSOCOMIAIS DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTES PRODUTORES DE CARBAPENEMASES

**Pesquisador:** Izabelly Linhares Ponte Brito

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 57095216.0.0000.5053

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

**Patrocinador Principal:** Santa Casa de Misericórdia de Sobral

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.843.504

#### Apresentação do Projeto:

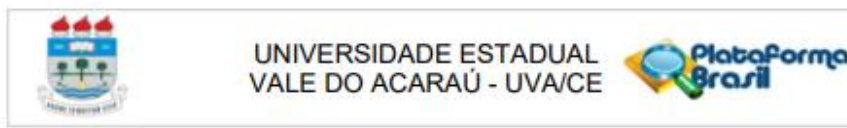
. Coleta de dados: De Novembro de 2016 a Abril de 2017, serão coletadas espécies nosocomiais de *A. baumannii* isolados de amostras clínicas de sangue, de infecções do trato respiratório, ponta de cateter percutâneo, secreção de abscesso e de ferida cirúrgica. Vale ressaltar, que o isolamento das espécies bacterianas será realizado a partir de amostras clínicas de pacientes internados em enfermarias e Unidades de Terapia Intensiva com suspeita de infecção hospitalar, desde que essas amostras já tenham sido previamente solicitadas e coletadas pela equipe médica dos hospitais de ensino envolvidos nesta pesquisa. Portanto, não será feita coleta adicional de sangue e nem de nenhuma outra amostra clínica do paciente. Dessa forma, a quantidade e manipulação das amostras segue o protocolo operacional padrão de cada hospital, assim

como o método de descarte das amostras biológicas segue o plano de gerenciamento de resíduos de serviço de saúde de acordo com a Resolução RDC Nº308 de 07 de dezembro de 2004. Todos os isolados serão previamente identificados no laboratório de microbiologia dos referidos hospitais pelo sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Após, os espécimes serão armazenados e enviados em tubos contendo

BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia ©, Mumbai, Índia) com glicerol a 20% ao Laboratório de

**Endereço:** Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com

## ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – Ozonioterapia



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** OZONIOTERAPIA APLICADA À ODONTOLOGIA: RELATO DE CASOS

**Pesquisador:** POLIANA LIMA BASTOS

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 32833420.5.0000.5053

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.138.244

#### Apresentação do Projeto:

Este estudo será realizado na Universidade Federal do Ceará (UFC) - Campus Sobral. Adotar-se-á um estudo de relato de casos, contendo características sobre sinais, sintomas e outras características do paciente e relatando os procedimentos terapêuticos utilizados, bem como o desenlace do caso. A população será composta pelos indivíduos que residem na cidade de Sobral/CE. Já a amostra será constituída por pacientes atendidos na clínica do curso

de graduação em Odontologia da UFC - Campus Sobral, como também pelos pacientes atendidos na rede pública municipal.

Indivíduos que se recusarem a participar do estudo; Pacientes que possuem alguma contraindicação para aplicação de ozônio;

Os dados serão coletados antes, durante e no pós-operatório dos procedimentos realizados, onde os pacientes serão observados e atendidos, em um momento posterior ocorrerá a interpretação dos dados de acordo com o tratamento oferecido. Serão avaliadas variáveis quantitativas, relacionadas a tempo e ao número, e variáveis qualitativas, relacionadas à sintomatologia e à percepção de qualidade de vida.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Geral:**

Realizar estudo para avaliação dos efeitos da ozonioterapia como meio complementar em

**Endereço:** Av Comandante Maurocêlio Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com